



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**RELACIÓN ENTRE CONCENTRACIONES SÉRICAS DE VITAMINA
25(OH)D Y NIVELES DE ESTRÉS OXIDATIVO EN UNA POBLACIÓN DE
DIABÉTICOS TIPO 2 (2011)**

PAULA MARITZA ROCHA

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIENCIA FISIOLÓGICAS
BOGOTÁ D.C.
2012**

**RELACIÓN ENTRE CONCENTRACIONES SÉRICAS DE VITAMINA 25(OH)D Y
NIVELES DE ESTRÉS OXIDATIVO EN UNA POBLACIÓN DE DIABÉTICOS
TIPO 2 (2011)**

PAULA MARITZA ROCHA

**Tesis presentada como requisito para optar al título de Magister en
Fisiología**

Director

Dra. ISMENA MOCKUS

Línea de Investigación:

Lípidos y Diabetes

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIENCIA FISIOLÓGICAS
BOGOTÁ D.C.
2012**

RESUMEN

RELACIÓN ENTRE CONCENTRACIONES SÉRICAS DE VITAMINA 25(OH)D Y NIVELES DE ESTRÉS OXIDATIVO EN UNA POBLACIÓN DE DIABÉTICOS TIPO 2 (2011)

Objetivo: Determinar si existe una relación entre las concentraciones séricas de vitamina 25 (OH)D y estado de estrés oxidativo en pacientes con DM2 controlada.

Muestra: Se reclutaron 19 pacientes, rango de edad 55 +/-10 años, HG A1c <7%.

Materiales y Métodos: Los niveles plasmáticos de 25(OH)D por método de quimioluminiscencia, el estado prooxidante por ensayo TBARS y el estado antioxidante mediante actividad SOD.

Resultados: El 68% presentó niveles insuficientes de vitamina D. No fue posible establecer una relación de dependencia entre Vitamina D, TBARS y SOD.

Conclusiones: Este estudio realizado en pacientes con DM2, demostró una insuficiencia de vitamina D en proporción elevada. Se recomienda medir el estado oxidativo en el tiempo y relacionarlo con la evolución de las complicaciones de la DM2.

Palabras Clave: Diabetes Mellitus tipo 2, Vitamina D, Estrés oxidativo

ABSTRACT

RELATIONSHIP BETWEEN SERICS CONCENTRACION OF VITAMIN 25(OH) D AND OXIDATIVE STRESS LEVELS IN A POPULATION OF DIABETES MELLITUS TYPE 2 (2011).

Objective: Establish a possible relationship between the seric concentration of vitamin 25 (OH) D and oxidative stress status in controlled DM2 patients.

Sample: 19 patients were recruited, range of 55 +/-10 years, HG A1c < 7%.

Method and Materials: The serics levels of 25(OH) D by the quimioluminiscencia method. The prooxidant state by TBARS and antioxidant status through the superoxide dismutase (SOD) activity.

Results: 68% is below 30ng/mL Vitamin D levels. It does not make possible to establish a relationship of dependency between Vitamin D, TBARS and SOD.

Conclusion: The present study has been done with a DM2 controlled patients who demonstrate a vitamin D insufficiency in a high proportion. The proposal is to measure the evolution of the prooxidant and antioxidant status and the correlation with the complication of DM2.

Key words: Diabetes Mellitus type 2, Vitamin D and oxidative stress.

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	III
LISTA DE GRÁFICOS	V
LISTA DE TABLAS	VI
INTRODUCCIÓN	9
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	10
1.1. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	11
1.2. OBJETIVO GENERAL	11
1.3. OBJETIVO ESPECÍFICOS	11
2. JUSTIFICACIÓN	12
3. MARCO TEÓRICO	13
3.1. VITAMINA D	13
3.1.1. Propiedades	13
3.1.2. Metabolismo	13
3.1.3. Fuentes alimentarias	14
3.1.4. Marcadores	14
3.1.5. Vitamina D insuficiencia/deficiencia	14
3.2. MECANISMO DE ACCIÓN	15
3.2.1. Regulación del sistema inmunológico	16
3.2.1.1. Inmunidad adaptativa	16
3.2.1.2. Inmunidad innata	16
3.3. RELACIÓN ENTRE VITAMINA D Y DIABETES MELLITUS	17
3.4. VITAMINA D Y RIESGO CARDIOVASCULAR	18
3.5. ESTRÉS OXIDATIVO	19
3.5.1. Mediadores de estrés oxidativo	19
3.5.2. Fuentes de estrés oxidativo	20
3.6. MARCADORES ESTADO PROOXIDANTE	21
3.6.1. Peroxidación lipídica	21
3.7. MARCADORES ESTADO ANTIOXIDANTE	21
3.8. DIABETES Y ESTRÉS OXIDATIVO	22

3.9.	VITAMINA D, DIABETES Y ESTRÉS OXIDATIVO	23
4.	METODOLOGÍA	25
4.1.	TIPO DE ESTUDIO	25
4.2.	MUESTRA	25
4.3.	CRITERIOS DE INCLUSIÓN	25
4.4.	CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	25
4.5.	VARIABLES DEL ESTUDIO	25
4.6.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	26
4.7.	CONSIDERACIONES ÉTICAS	26
5.	PROCESO METODOLÓGICO	27
5.1.	TOMA DE MUESTRAS	27
5.2.	DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES CIRCULANTES DE VITAMINA D	27
5.3.	DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE ESTRÉS OXIDATIVO	27
5.3.1.	Estado prooxidante	27
5.3.1.1	Procedimiento TBARS	28
5.3.2.	Estado antioxidante	28
5.3.2.1	Procedimiento SOD	28
6.	RESULTADOS	29
6.1.	VITAMINA D (25 Hidroxi Vitamin D)	29
6.2.	TBARS (ESTADO PROOXIDANTE)	29
6.3.	NIVELES DE SOD (ESTADO ANTIOXIDANTE)	30
6.4.	VALORES DE HEMOGLOBINA GLUCOSILADA	31
6.5.	VITAMINA D Y TBARS	32
6.6.	VITAMINA D Y SOD	33
6.7.	HEMOGLOBINA GLUCOSILADA Y VITAMINA D	34
6.8.	HEMOGLOBINA GLUCOSILADA Y TBARS	34
6.9.	HEMOGLOBINA GLUCOSILADA Y SOD	34
7.	DISCUSIÓN	35
8.	CONCLUSIONES	38
9.	PROYECCIONES DEL TRABAJO	39
10.	NOTA	40
A	ANEXO	41
	REFERENCIAS	45

LISTA DE GRÁFICOS

	Pág
GRÁFICO 1. NIVELES VITAMINA D Vs TBARS	33
GRÁFICO 2. CONCENTRACIONES VITAMINA D Vs ACTIVIDAD SOD	34

LISTA DE TABLAS

		Pág
TABLA 1.	CLASIFICACION DE LOS NIVELES DE 25-HIDROXIVITAMINA D3	29
TABLA 2.	VALORESDE TBARS	30
TABLA 3.	VALORES ACTIVIDAD SOD	31
TABLA 4.	PORCENTAJE DE HEMOGLOBINA GLUCOSILADA	32

INTRODUCCIÓN

La Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) es una entidad patológica que ha venido en aumento a nivel mundial y que es de gran importancia en salud pública. Se estima que más del 8.3% de la población mundial entre los 20 a 79 años de edad sufre de DM2 y que el 12% de este grupo corresponde a población hispana. (Diabetes Atlas 2011).

Para el año 2000 según lo reportado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), la cifra de personas con DM2 en Colombia se encontraba cerca de 883.000 y se proyecta que esta cifra aumente a 2.425.000 personas en el año 2030 (WHO region of Americas. 2004). La DM2 está asociada con el incremento del riesgo de enfermedad cardiovascular. Diversos estudios han demostrado que la hiperglucemia altera diversos mecanismos metabólicos, como son la sensibilidad a la insulina y el metabolismo lipídico, favoreciendo reacciones de oxidación que aumentan la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y activación de vías de señalización que aumentan la respuesta inflamatoria (Evans et al. 2002, Liang et al. 2007).

El estrés oxidativo, que se puede definir como la pérdida del equilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y el sistema antioxidante, ha sido implicado en complicaciones crónicas micro y macrovasculares de la DM2 (Wright E; 2006). También se ha propuesto que el estrés oxidativo es una causa importante de desarrollo de insulinoresistencia, intolerancia a los carbohidratos, daño a las células beta pancreáticas y activación concomitante de vías de señalización proinflamatorias (Arif. M, 2009).

A su vez, se ha demostrado que las mujeres con DM2 presentan deficiencia de vitamina D tres veces más que las mujeres sanas y que ello se asocia con un incremento del riesgo de enfermedad cardiovascular (Oh et al. 2009). Así mismo, se observa que pacientes de ambos géneros cuyos niveles de vitamina D son bajos tiene un riesgo dos veces mayor de padecer enfermedad cardiovascular en comparación con pacientes diabéticos que muestran concentraciones de vitamina D normales. En un estudio de análisis de supervivencia en pacientes con DM2 que presentan deficiencia de vitamina D se encontró que ésta se constituye en un factor predictivo independiente de aumento del riesgo de mortalidad por enfermedad cardiovascular (Christel et al. 2010).

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La prevalencia de la DM2 ha venido en aumento (Diabetes Atlas 2006), las complicaciones de esta se presentan a pesar de contar con herramientas terapéuticas que permiten un mejor control de la enfermedad (Oh et al. 2009). Así mismo, el estrés oxidativo interviene en las complicaciones crónicas micro y macrovasculares de la DM2 (Wright et al. 2006).

Varios estudios han demostrado una relación inversa entre los niveles bajos de vitamina D, concentración de glucosa e insulinoresistencia en individuos sanos; sin embargo cuando esta deficiencia es compensada, se ha visto un incremento en la secreción de insulina y una mejora significativa en la sensibilidad a la misma (Kamilian et al. 2008).

Se ha demostrado en pacientes con Diabetes Mellitus tipo 1 que la Vitamina D previene la destrucción de célula beta pancreática y presenta un efecto protector sobre la función residual de la misma. A su vez la administración de un análogo de la 1,25 dihidroxivitamina D puede prevenir la insulinitis y diabetes en ratones no obesos y diabéticos. En ratones con alteración de los receptores VDR Los niveles de insulina son bajos y las concentraciones de glucosa están elevadas (Xia, et al. 2009, Kamilian et al. 2008). Aunque el mecanismo aún no está bien establecido se presume que la vitamina D en su forma activa, estimula la producción de insulina posiblemente por regulación del flujo de calcio (Bikle, D. 2010).

Se ha demostrado que la deficiencia de Vitamina D es más frecuente en población diabética (Oh et al. 2009). Y a su vez se ha observado, que la suplementación de Vitamina D, disminuye el estrés oxidativo en sujetos no diabéticos (Ozlem, et al. 2009).

Resulta por lo tanto de interés determinar una posible relación entre los niveles circulantes de 25 (OH) D y los niveles de estrés oxidativo en pacientes con DM2 adecuadamente controlados.

1.1. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existe una relación entre las concentraciones séricas de vitamina 25 (OH) D y los niveles de estrés oxidativo en una población de pacientes con DM2 controlados?

1.2. OBJETIVO GENERAL

Determinar si existe una relación entre las concentraciones séricas de vitamina 25 (OH)D y el estado de estrés oxidativo en pacientes con DM2 controlados.

1.3. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar los niveles circulantes de vitamina 25(OH)D en un grupo de pacientes con DM2.
- Establecer el estado de estrés oxidativo en la población en estudio.
- Establecer si existe una relación entre los niveles circulantes de 25(OH)D y los niveles de estrés oxidativo en pacientes con DM2 que presentan un buen control de su enfermedad.

2. JUSTIFICACIÓN

Se acepta que en la DM2 se presenta estrés oxidativo pero no se comprenden todavía los mecanismos mediante los cuales los radicales libres intervienen en la patogénesis de la DM2 y sus complicaciones (Lamb y Golstein, 2008).

Estudios en modelos animales han explorado una posible relación entre la vitamina D y la Diabetes Mellitus, encontrándose que esta vitamina aumenta la secreción de la insulina en la célula beta pancreática de ratas con diabetes mellitus tipo 1, posiblemente por incremento de la expresión de los canales reguladores de calcio intracelulares.

A su vez, es de anotar que las propiedades antioxidantes de una vitamina se pueden observar con niveles sanguíneos diferentes a los necesarios para obtener un efecto específico (por ejemplo en el caso de la vitamina D, aumento de la absorción intestinal de calcio). No se sabe si los niveles bajos de vitamina D se acompañan de un mayor estrés oxidativo en la población con DM2. Este conocimiento es importante porque la intervención terapéutica de los niveles circulantes de vitamina D podría ser útil para disminuir las complicaciones, principalmente cardiovasculares, observadas en la población diabética (Noyan, et al. 2005, Christel et al. 2010).

En personas no diabéticas, que presentan deficiencia asintomática de vitamina D, se ha demostrado que la suplementación de ésta, disminuye significativamente el estrés oxidativo que es uno de los factores causantes de daño endotelial (Ozlem, et al. 2009).

Además, cada vez se acepta más la necesidad de conocer mecanismos por los cuales unos pacientes con DM2 desarrollan mayores complicaciones que otros a pesar de un control glucémico similar (Oh et al. 2009)

3. MARCO TEÓRICO

3.1. VITAMINA D

La 1,25 dihidroxicolecalciferol cuya función clásica, en combinación con la paratohormona (PTH), es la regulación del metabolismo del calcio y del fósforo a inmediato y largo plazo (Mataix, 2007). Sin embargo se han establecido otras funciones de esta vitamina en diferentes sistemas como el inmune y el vascular (Bikle, 2010, Kamilian et al. 2008).

3.1.1. Propiedades. Existen fundamentalmente dos formas de Vitamina D: vitamina D₃ o colecalciferol y vitamina D₂ (ergocalciferol). La vitamina D₃ se sintetiza endógenamente en la epidermis por acción de la radiación ultravioleta (UVR) mientras que D₂ se origina también de compuestos de origen vegetal. La biosíntesis de previtamina D₃ tiene lugar principalmente en la capa en crecimiento de la epidermis, en los estratos basal y espinoso (80 – 90%) ocurriendo el resto (10-20%) en la dermis (Mataix, 2007). Es producida a partir de 7- dehidrocolesterol a través de 2 pasos en los cuales hay una apertura fotolítica del anillo B (rayos UV) formando previtamina D₃ que es isomerizada en un proceso térmico (Bikle, 2010).

Existen diferencias sutiles en las proteínas enlazantes en sangre (proteína ligadora de vitamina D (DBP del inglés Vitamin D Binding Protein) por la diferencia estructural de las mismas, sin embargo a nivel de los tejidos no se presenta diferencia significativa por la afinidad en la unión con el receptor de la vitamina (VDR) (Bikle, 2010).

3.1.2. Metabolismo. La vitamina D presenta dos hidroxilaciones sucesivas. En el hígado es convertida a 25- hidroxicolecalciferol (25OHD), que es la forma más abundante de la vitamina en circulación. Esta reacción de hidroxilación se produce indistintamente sobre el calciferol (vitamina D₃) y ergocalciferol (vitamina D₂) la vitamina D₃ 25 hidroxilasa forma parte de un sistema enzimático dependiente de citocromo P-450 (CYP27B1), que se localiza principalmente en microsomas (aunque también se ha localizado un citocromo P-450 que cataliza esta actividad en mitocondrias hepáticas) y que requiere oxígeno molecular y iones magnesio. (Gil, 2010). En otros tejidos también se han encontrado enzimas microsomales y mitocondriales que realizan esta hidroxilación (Bikle, 2010).

La 25(OH)D es convertida a 1,25(OH)₂D vía CYP27B1 (25OHD 1 α Hidroxilasa). Aunque el túbulo proximal renal es la mayor fuente de producción de 1,25(OH)₂D, la CYP27B1 se expresa en células del sistema inmune, epitelio de la piel, intestino, próstata, pulmón, hueso y glándulas paratiroideas donde se sintetiza 1,25(OH)₂D que actúa de manera intracrina y paracrina. CYP27B1 es regulada en el túbulo proximal renal por la PTH y el factor de crecimiento de fibroblastos 23 (FGF23) los cuales estimulan e inhiben respectivamente su expresión. 1,25(OH)₂D₃ presenta retroalimentación negativa de sus propios niveles inducida por CYP24 (25OHD 24 hidroxilasa, enzima que degrada 1,25(OH)₂D) (Bikle, 2010).

3.1.3. *Fuentes alimentarias.* La vitamina D₃ se encuentra en productos animales principalmente en aceites de hígado de pescado; hay cantidades menores en los productos lácteos, yema de huevo e hígado (Krause, 2001).

3.1.4. *Marcadores.* Los niveles circulantes de 25 hidrovitamina D son generalmente usados como marcadores de la suficiencia de la vitamina D (Kamilian et al. 2008).

El nivel sérico de 25(OH)D es el mejor indicador sérico de la vitamina D, ya que representa la suma de la producción cutánea de la misma y la ingestión oral de vitamina D₂ y D₃ (Mataix, 2007).

En cuanto a la vitamina D, no hidroxilada, sus valores séricos no representan el *estado de suficiencia*, dado que su vida media es relativamente corta y muestra un gran rango de valores, de 0 a más de 250 nmol/L, dependiendo de la ingesta reciente de la vitamina y la exposición a la luz solar (Mataix, 2007).

Asimismo, se acepta que la 1,25 (OH)₂D tampoco es un buen indicador de la suficiencia de vitamina D ya que las concentraciones séricas de ella están determinadas por diversos factores, como los niveles séricos de calcio, fósforo, PTH y otras hormonas (Mataix, 2007).

3.1.5. *Vitamina D insuficiencia/deficiencia.* La deficiencia de vitamina D, es decir niveles séricos de 25(OH)D <12.5 nmol/L o <5ng/mL, da lugar a la osteomalacia en adultos y raquitismo en niños (Bikle, 2010). Aunque no hay consenso de los niveles más adecuados de 25(OH)D en consenso los expertos definen deficiencia

de vitamina D cuando los niveles de 25(OH)D son menores a 20ng/mL (<50nmol/L), insuficiencia si las concentraciones se encuentran entre 21ng/mL y 29 ng/mL (52 nmol/l y 72 nmol/l) y niveles óptimos a partir de 30 ng/mL (75 nmol/L) (Bikle, 2010, Holick, et al. 2007).

3.2 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LA VITAMINA D

Desde el descubrimiento en 1969 del receptor de la vitamina D₃ (VDR) se han llevado a cabo múltiples investigaciones en el sistema endocrino de la vitamina D₃. Ahora se sabe que el VDR se encuentra en más de 30 tejidos. A mediados de los años ochenta se descubrieron las respuestas rápidas (RR) mediadas por la vitamina D₃. Estas respuestas ocurren de minutos a una hora después del contacto de la vitamina D con la célula y por lo tanto no pueden ser resultado de un efecto mediado por el VDR nuclear, sugiriendo un mecanismo alternativo no genómico de acción (Bikle, 2010).

El mecanismo de acción genómico de la forma activa 1,25(OH)₂D (calcitriol) es similar al de las hormonas esteroides clásicas y es mediado por la unión específica del calcitriol al VDR, el cual se heterodimeriza con el receptor del ácido retinoico X (RXR). Después de la interacción con el elemento de respuesta de la vitamina D₃ (VDRE) en el promotor del gen diana, ocurre la modificación de la transcripción por interacción del VDR con coactivadores y demás componentes de la maquinaria transcripcional. La identificación de los pasos implicados en este proceso ha sido el objetivo principal de la investigación reciente en este campo. Sin embargo, el significado funcional de las proteínas blanco, así como de las proteínas implicadas en el transporte y el metabolismo de la vitamina D₃ es también de primordial importancia (Judd S. 2009).

La regulación de la transcripción nuclear está determinada por el reclutamiento de coreguladores (coactivadores y corepresores). Como otros receptores esteroides, la unión al ligando de VDR genera cambios conformacionales reclutando maquinaria coactivadora para incrementar la tasa de transcripción, dentro de los cuales se han descrito coactivador de receptor esteroideo y VDR interacting protein (DRIP). En ausencia del ligando, los receptores nucleares (NRs) reclutan proteínas corepresoras como el corepresor del receptor nuclear (*nuclear receptor corepressor*, N-CoR) y el mediador del silenciamiento para el receptor retinoide y de hormona tiroidea (*silencing mediator for de retinoid and thyroid hormone*

receptor, SMRT) que son proteínas moduladoras que sirven como plataformas para la formación de complejos represores que subsecuentemente reclutan histona deacetilasas (HDACs), para reprimir la transcripción del gen diana. Se ha mostrado que VDR tiene una actividad intrínseca represora vía interacción con las proteínas corepresoras N-CoR/SMRT sin embargo los mecanismos por los cuales estas interacciones ocurren aun no han sido esclarecidos (Sanchez, et al. 2008, Ji et al. 2009).

3.2.1. Regulación del sistema inmune. El papel potencial en la inmunomodulación de la vitamina D se ha observado en diferentes órganos y tejidos donde se observan receptores de ésta o la maquinaria enzimática para activarla, por ejemplo la enzima CYP27B1. Los 2 tipos de respuesta inmune son regulados por $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (Bikle, 2010).

3.2.1.1. Inmunidad adaptativa. En esta se encuentra la capacidad de linfocitos T y B de producir citoquinas e inmunoglobulinas respectivamente para combatir los antígenos previamente presentados por macrófagos y células dendríticas. La vitamina D ejerce un efecto inhibitorio en el sistema inmune adaptativo. En particular la vitamina D en su forma activa $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ retarda la diferenciación de linfocitos B y suprime la proliferación y producción de inmunoglobulinas. De hecho $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ inhibe la proliferación de linfocitos T en particular las células T helper 1 (Th1) que inducen la producción de IFN γ e IL2 (estimula la síntesis de interferón) y activan macrófagos y Th17 que producen IL 17 e IL22 (citoquinas proinflamatorias). En contraste incrementa la actividad de interleuquinas antiinflamatorias como IL 4, IL5, e IL10 modificando el balance a Th2. La supresión del sistema inmune adaptativo es benéfico en condiciones de autoinmunidad (Bikle, 2010).

Existe evidencia de que la vitamina D puede ejercer efectos en diferentes tejidos a través de su receptor VDR en los que se incluyen linfocitos B y T, músculo esquelético y células beta del páncreas (Kamilian et al. 2008).

3.2.1.2. Inmunidad innata. Los receptores Toll-like (TLRs) son componentes cruciales en la respuesta inmune innata, con una subsecuente activación y regulación de la respuesta inmune adaptativa (Van den Berg, et al 2004). TLRs son miembros de la superfamilia IL-1R (mediador de la respuesta inflamatoria) los TLRs 2 y 4 han sido los más estudiados y se caracterizan por ser receptores de reconocimiento de lipopolisacáridos (LPS) de bacterias gram negativas y ácido

lipoteico (LTA) y CD 14 actúa como co-receptor requerido por TLR4 para reconocimiento de LPS. La alteración de la expresión de receptores toll like (TLRs) y la respuesta de los monocitos han sido asociados con sensibilidad a la insulina, obesidad y Diabetes (Tao, et al 2009). Los ligandos estimulan la activación de la vía de señalización NFκB que induce respuesta inmune a través de la transcripción de genes, especialmente los de citoquinas proinflamatorias, tales como IL-1β y TNFα. Los monocitos como presentadores de antígeno exhiben una elevada expresión de TLRs y CD14 (Tao, et al. 2009). Por otro lado la activación de los toll-like induce la expresión de péptidos antimicrobianos, dentro de estos se encuentra *catelicidina*, la expresión de la cual se encuentra regulada por 1,25(OH)₂D en ambas líneas mieloide y epitelial que también expresan CYP27B1. La estimulación de TLR2 por un péptido antimicrobiano en macrófagos o en queratinocitos por una herida incrementa la expresión de CYP27B1 en presencia de adecuado sustrato, 25(OH)D la ausencia de 25(OH)D, VDR o CYP27B1 limita la capacidad de estas células de responder al cambio que desencadena *catelicidina* (Bikle, 2010). Se ha evidenciado en ratones que la hiperglucemia puede alterar la diferenciación de macrófagos con un incremento de la expresión de TLRs y TNFα. Además se ha encontrado que los monocitos de las personas con DM2 tienen un perfil proinflamatorio y que la Vitamina D es capaz de modular los monocitos vía IFNγ (Tao, et al. 2009).

3.3. RELACIÓN ENTRE VITAMINA D Y DIABETES MELLITUS

Aunque el mecanismo aún no está bien establecido, se presume que la vitamina D en su forma activa, estimula la producción de insulina posiblemente por regulación del flujo de calcio (Bikle, D. 2010). Se ha demostrado que la Vitamina D puede prevenir la destrucción de célula beta pancreática y presenta un efecto protector sobre la función residual de la misma en pacientes con Diabetes Mellitus tipo 1 y que la administración de un análogo de la 1,25 dihidroxivitamina D puede prevenir la insulinitis y diabetes en ratones no obesos y diabéticos al igual que inhibe la progresión de la inflamación en los islotes pancreáticos alterando la respuesta inmune de los linfocitos T. Los niveles de insulina son bajos y las concentraciones de glucosa elevadas en ratones con alteración de los receptores VDR (Xia, et al. 2009, Kamilian et al. 2008).

Varios estudios han demostrado una relación inversa entre los niveles bajos de vitamina D, concentración de glucosa e insulinoresistencia en individuos sanos, sin

embargo cuando esta deficiencia es compensada se ha visto un incremento en la secreción de insulina y una mejora significativa en la sensibilidad a la misma (Kamilian et al. 2008).

Aunque algunos estudios observacionales han presentado una relación inversa entre los niveles circulantes de vitamina D y el riesgo de DM2, una revisión sistemática y un meta análisis encuentran resultados contradictorios, así mismo estudios controlados aleatorizados con suplementación de vitamina D muestran resultados no concluyentes y en pacientes con DM2 diagnosticada no se ha demostrado que la vitamina D mejore la insulinoresistencia o el metabolismo de la glucosa. (Shapses y Manson 2011).

3.4. VITAMINA D Y RIESGO CARDIOVASCULAR

Enfermedades relacionadas con la obesidad como la diabetes, enfermedad cardiovascular (ECV), trastornos del sueño entre otras se asocian con alto grado de morbilidad y mortalidad (Osei, 2010). La deficiencia de vitamina D ha tomado importancia en estas asociaciones en donde se ha demostrado que su deficiencia es prevalente en gran parte del mundo, presentando variaciones en sus niveles dependientes de la ingesta y la exposición al sol (Christel et al. 2010).

Dae Hyun Kim y colaboradores realizaron un estudio transversal usando datos provistos por el estudio NHANES 2001- 2004, relacionando la prevalencia de deficiencia de vitamina D con ECV en adultos sin DM2, encontrando que la deficiencia de esta vitamina es significativamente elevada en la población que presenta ECV, especialmente enfermedad coronaria e infarto agudo de miocardio (Dae, et al 2008).

La deficiencia de vitamina D se convierte entonces en un aspecto importante a evaluar en personas con DM2 como factor predisponente a ECV (Osei, 2010). Un estudio de análisis de supervivencia realizado recientemente cuyo objetivo principal era evaluar si los niveles de vitamina D se pueden utilizar como un factor de riesgo independiente de mortalidad por ECV en esta población, arroja resultados positivos a este respecto y sugiere realizar estudios futuros con intervención terapéutica (Christel et al. 2010).

La evidencia de que la vitamina D previene complicaciones cardíacas y metabólicas como la diabetes así como cáncer presentada en el reporte de 2011 del Instituto de Medicina (IOM), muestra que es inconsistente, insuficiente, inconclusa y no tiene establecidos criterios claros de relación causa efecto (Shapses y Manson. 2011).

Estudios han sugerido que se presenta mayor mortalidad cardiovascular durante el invierno y en zonas donde hay poca exposición a los rayos UV, sin embargo en un estudio controlado aleatorizado realizado en Australia con suplementación de vitamina D durante un año no se encontró diferencia significativa en la disminución del riesgo de isquemia y de infarto (Shapses y Manson 2011).

3.5. ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo, definido como la pérdida del equilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y el sistema antioxidante que conlleva a un eventual daño macromolecular ha sido propuesto como una causa importante de desarrollo de insulinoresistencia y daño a las células beta pancreáticas. También se ha implicado en complicaciones crónicas tanto micro como macrovasculares de la diabetes (Arif, et al. 2009, Wright, et al. 2006).

El incremento del porcentaje de adiposidad en general, factores ambientales y predisposición genética entre otros, crean un estado proinflamatorio con incremento del estrés oxidativo (Kawame et al. 2010).

El estrés oxidativo aumenta la expresión de citoquinas proinflamatorias activando vías de estrés como la de la kinasa c-Jun N terminal (JNK). La modificación de estas vías de señalización podría mejorar el metabolismo de la glucosa, la insulinoresistencia, la función vascular y por lo tanto retardar la progresión de enfermedad cardiovascular en personas con DM2 (Lamb y Golstein. 2008).

3.5.1. Mediadores de estrés oxidativo. Generados como productos del metabolismo aeróbico normal los ROS, son metabolitos del oxígeno molecular (O_2) con varios blancos a nivel intracelular como lípidos, proteínas y DNA. Estos incluyen radicales de oxígeno inestable entre los que se encuentra el radical superóxido (O_2^-), radical de oxido nítrico (NO), radical hidroxilo (OH^-) y los no radicales como superóxido de hidrógeno (H_2O_2). Este último es convertido en H_2O

y O_2 por la glutatión peroxidasa en la mitocondria o si difunde al citosol es blanco de la acción de la catalasa en los peroxisomas, sin embargo en presencia de metales de transición tales como hierro (Fe) y cobre (Cu) se puede convertir en un reactivo sumamente nocivo. En un intento por neutralizar este estrés oxidativo, las células utilizan un sistema de defensa antioxidante que consta de componentes enzimáticos y no enzimáticos que determinan el balance redox. Dentro de las enzimas se incluyen superóxido dismutasa, catalasa, tioredoxin y glutatión peroxidasa y dentro de los no enzimáticos están glutatión reducida (GSH), ascorbato (Vitamina C) α tocoferol (Vitamina E). Niveles elevados de ROS son citotóxicos, donde se inducen daños como muerte celular prematura, mutaciones y carcinogénesis entre otros, mientras que niveles bajos son necesarios para la regulación de diferentes mecanismos fisiológicos celulares tales como diferenciación, proliferación celular, apoptosis y regulación de vías de señalización sensibles al estado redox. (Lamb y Golstein. 2008, Weydert y Cullen 2010, Evans, et al. 2002).

3.5.2. *Fuentes de estrés oxidativo.* Las especies reactivas de oxígeno son el resultado de los procesos metabólicos aeróbicos celulares y la concentración intracelular depende de la eficiencia en la transformación de estos por el sistema antioxidante a moléculas inofensivas. El incremento en la circulación de ácidos grasos libres y glucosa, pueden llevar a fugas importantes de radicales superóxido de la cadena respiratoria y activar la nicotinamida dinucleótido fosfato oxidasa NADPH enzima de la membrana celular la cual es encontrada en diferentes células como adipocitos, endotelio vascular, fibroblastos y macrófagos. El sistema inmune también es una fuente importante de radicales de oxígeno, los macrófagos y neutrofilos tienen la capacidad de consumir oxígeno y generar superóxido y requieren NADPH oxidasa para hacerlo (Lamb y Goldstein 2008, Weydert y Cullen, 2010).

La reacción de glucosa con proteínas plasmáticas (reacciones de glucosilación no enzimática) ocurre en diferentes sitios tales como la hemoglobina, albúmina y cristalino, dando lugar a productos de glucosilación avanzada (AGE); los receptores de AGE (RAGE) son expresados en diferentes tejidos incluyendo células endoteliales y macrófagos entre otros. Los RAGE llevan a la generación intracelular de ROS la cual activa la vía de NF κ B y como consecuencia la expresión de diferentes citoquinas proinflamatorias (Hideaki, Et al 2009, Wright, et al. 2006).

Los ácidos graso libres también pueden generar estrés oxidativo por el mecanismo convencional en la mitocondria y además por β -oxidación. La hiperglucemia y la lipotoxicidad pueden inducir estrés oxidativo por medio de la activación de vías de señalización que regulan la expresión génica resultando en daño celular (Evans et al. 2002).

3.6. MARCADORES ESTADO PROOXIDANTE

3.6.1. Peroxidación lipídica. La *peroxidación lipídica* es la formación de peróxidos de lípidos por mecanismos enzimáticos y no enzimáticos. Una vez formados, los peróxidos de lípidos son sometidos a una serie de reacciones complejas que en última instancia permiten su unión a proteínas dando lugar a productos de lipoxidación avanzada (ALE) (Wright, et al. 2006).

La peroxidación lipídica y el grupo carbonilo proteico, son usados como indicadores de estrés oxidativo y su evaluación en suero sirve como marcador de la actividad de radicales libres. La degradación oxidativa de los ácidos grasos poliinsaturados, lleva a la formación de malondialdehído (MDA) que es usualmente medido mediante el ensayo de las sustancias reactivas de ácido tiobarbitúrico (TBARS). Este método que permite medir las reacciones de radicales libres y establecer el estado prooxidante, ha sido ampliamente estudiado (Arif, et al. 2009).

Es de anotar que en un ambiente de elevada reactividad y la corta vida media de los radicales se dificulta la estimación del balance pro oxidante y antioxidante, por eso el método de TBARS se convierte en un parámetro indirecto pero válido en el estudio de la actividad de los radicales en los tejidos (Noyan, et al. 2005)

3.7. MARCADORES ESTADO ANTIOXIDANTE

La superóxido dismutasa (SOD) es la primera línea de defensa antioxidante al catalizar la reacción de radical peróxido (O_2^-) a oxígeno molecular (O_2) y superóxido de hidrógeno (H_2O_2) el cual, a su vez, es convertido en componente no tóxico vía catalasa y glutatión peroxidasa. El resultado neto es la formación de dos potenciales especies tóxicas, superóxido y peróxido de hidrógeno los cuales son transformados en agua por el sistema. (Arif, et al. 2009, Weydert y Cullen. 2010).

Existen 2 formas de SOD en las células compartimentalizadas, la primera forma se encuentra principalmente en el citoplasma y contiene Cu y Zn (Cu/ZnSOD), la cual comprende un 90% de la actividad total de la misma, la segunda forma se encuentra predominantemente en la mitocondria y contiene Mn. (MnSOD) (Su Y. 1988, Weydert y Cullen. 2010).

Las otras enzimas antioxidantes del sistema también se encuentran compartimentalizadas, en el caso de la catalasa se encuentra en los peroxisomas y en el citoplasma y como se mencionó anteriormente, cataliza la reacción de convertir peróxido de hidrógeno a agua; y la glutatión peroxidasa se puede encontrar en organelos como la mitocondria y el núcleo dependiendo la familia, así el sistema con actividad enzimática complementaria pueden tener mayor eficiencia debido a su localización intracelular (Weydert y Cullen. 2010)

Por otro lado, grupos sulfhidrilos de las proteínas (P-SH) y la glutatión reducida (GSH) son importantes en la prevención del daño celular por radicales libres y actúan como potentes antioxidantes intracelulares. P-SH puede también regular la respuesta antioxidante ante un estrés. Así la determinación de grupos sulfhidrilo y carbonilo proteicos podría ser una forma de evaluar el *estado antioxidante* (Arif et al. 2009).

Al evaluar el estado antioxidante en pacientes con DM se ha encontrado una reducción de la actividad de la SOD en comparación con sujetos no diabéticos. Se ha sugerido que la oxidación de la glucosa y la posterior formación y acumulación de peróxido de hidrógeno puede ser una causa de disminución de la actividad de SOD (Arif, et al. 2009).

3.8. DIABETES Y ESTRÉS OXIDATIVO

Se ha sugerido que la hiperglucemia provoca estrés oxidativo al incrementar la producción de radicales superóxido por cuatro mecanismos:

En primer lugar se incrementa la conversión de glucosa a sorbitol por medio de aldolasa reductasa, lo que lleva a la disminución de los niveles de NADPH y de la relación entre glutatión reducido y glutatión oxidado. Segundo, se presenta el incremento de la formación de productos de glicación avanzada (AGEs). Tercero, la hiperglucemia incrementa la formación de diacilglicerol (DAG) con la consecuente activación de la vía de la protein kinasa C (PKC) que aumenta la

expresión de genes proinflamatorios. Y por último el aumento de las citoquinas proinflamatorias activa la vía de la hexosamina (Ceriello y Testa. 2009).

Se ha establecido que un control temprano e intensivo de la glucemia reduce el riesgo de complicaciones tanto micro como macrovasculares, además se ha encontrado en estudios epidemiológicos que el control glucémico adecuado alcanzado durante una intervención tardía se asocia con complicaciones clínicas. A este fenómeno se le ha denominado “memoria metabólica”. Se realizó un estudio en tres grupos de ratas, controles y dos a los cuales se les indujo diabetes; un grupo se mantuvo con un buen control glucémico desde el inicio mientras que al otro grupo se le realizó manejo de la hiperglucemia sólo 6 meses después; se evaluaron 13 meses después del inicio de la diabetes. En las ratas del grupo de intervención temprana, el estrés oxidativo medido principalmente a nivel renal (mediante determinación de peroxidación lipídica y glutatión reducido) no presentó diferencias en relación al grupo control, mientras que en el grupo en cual se retardó control glucémico los niveles de estrés oxidativo fueron significativamente mayores. Una posible explicación de este fenómeno podría ser el de la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno a nivel mitocondrial que se presenta en la hiperglucemia por daño en enzimas mitocondriales (Ceriello y Testa. 2009).

3.9. VITAMINA D DIABETES Y ESTRÉS OXIDATIVO

Además en un estudio realizado en población iraní con DM2, se evaluó si la duración y control de la diabetes es directamente proporcional a los niveles de estrés oxidativo, encontrando que independientemente de la cronicidad y el buen control metabólico el indicador de estrés oxidativo se incrementa a mayor duración de la enfermedad sin modificación significativa de la actividad antioxidante de la SOD (Nakhjavani et al. 2010).

Por otro lado un estudio en el que se evalúan sujetos con deficiencia sin diabetes, los efectos de la suplementación de la vitamina D sobre marcadores de estrés oxidativo, se encuentra que los niveles de TBARS disminuyen significativamente después de la corrección de la deficiencia en comparación con los niveles iniciales (Ozlem, et al. 2009).

Experimentos realizados en ratas diabéticas han mostrado que la vitamina D puede inhibir la hiperglucemia, estrés oxidativo y daño celular en páncreas, hígado y riñón, por incremento de la sensibilidad y de los niveles de insulina, y la capacidad del sistema antioxidante, con la consecuentemente mejoría en el control glucémico (Handem, et al 2009).

4. METODOLOGÍA

4.1. TIPO DE ESTUDIO

Estudio descriptivo transversal (Blanco, J. 2006).

4.2. MUESTRA

Se incluyeron 19 pacientes con DM2 pertenecientes al programa de Lípidos y Diabetes usuarios de Unisalud con edades de 55 +/-10 con diagnóstico de DM2 menor de 5 años, Hemoglobina glucosilada menor de 7%.

4.3. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Diagnóstico de DM2

Edad mayor o igual a 45 y menor de 65

Hemoglobina glucosilada menor de 7%

En manejo con dieta, ejercicio físico y/o metformina

4.4. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Uso de hipoglucemiantes orales y/o insulina

Tabaquismo (fumador en los últimos 5 años)

No fué criterio de exclusión el uso de hipolipemiantes y/o inhibidores de la enzima convertidora del angiotensina y/o agonistas del receptor tipo I de la angiotensina.

Es de anotar que la metformina se considera como un antihiper glucemiante más no un hipoglicemiante.

4.5. VARIABLES DEL ESTUDIO

Niveles de vitamina D

Actividad prooxidante (TBARS)

Actividad antioxidante (Actividad SOD)

4.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

A todas las variables se les realizó determinación de la media.

Para la evaluación de los datos de los niveles de la vitamina D se utilizó el test de Fisher ya que este presenta una *bondad de ajuste* estadístico similar al de chi cuadrado o Pearson y es el más apropiado para el análisis estadístico cuando el tamaño de muestra es pequeño. La correlación de *Spearman (Rho)* se utilizó para estimar la fuerza de asociación entre las variables, como prueba equivalente de correlación de Pearson para datos no paramétricos (Chap, 2003).

4.7. CONSIDERACIONES ÉTICAS

El presente trabajo fue presentado al Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia. El paciente firmó un consentimiento informado según los requerimientos del Ministerio de Salud de Colombia (Resolución No. 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia Anexo1). De acuerdo con los artículos 5 y 6 donde se presentan los aspectos éticos de la investigación y garantía de privacidad según el artículo 8, determinando un riesgo de investigación según lo estipulado en los artículos 9 y 10 de la misma como riesgo mínimo según lo establecido en el artículo número 11 párrafo b. y la información suministrada al paciente de acuerdo a los puntos estipulados en el artículo número 15.

5. PROCESO METODOLÓGICO

5.1. TOMA DE MUESTRA DE SANGRE

Después de doce horas de ayuno se extraen 10 mL de sangre venosa con el sistema venoject en 2 tubos vacutainer, los cuales fueron centrifugados a 3500 revoluciones por 5 minutos y el suero obtenido se almacenó a -80° C para la medición posterior de la vitamina D y los niveles de estrés oxidativo.

5.2. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES CIRCULANTES DE VITAMINA D

Se determinaron los niveles plasmáticos de 25(OH)D por el método de quimioluminiscencia competitiva en dos fases utilizando el kit LIAISON® 25-OH Vitamin D TOTAL según metodología previamente descrita (Dae, et al 2008).

El uso del test está destinado a la determinación cuantitativa de la 25-hidroxivitamina D en suero y plasma humanos, y permite evaluar la disponibilidad de vitamina D.

Se considera deficiencia de vitamina D cuando los niveles están por debajo de 10 ng/mL, insuficiencia entre 11 y 29 ng/mL y nivel óptimo cuando las concentraciones son superiores a 30 ng/mL (Bikle, 2010, Holick, et al. 2007).

5.3. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE ESTRÉS OXIDATIVO

5.3.1 Estado prooxidante. Se realizó el ensayo de peroxidación lipídica por el método colorimétrico de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico según metodología previamente descrita (Wasowicz et al 1993). En esta técnica las proteínas son precipitadas con ácido tiocloroacético (TCA); el malondialdehído, producido durante la peroxidación lipídica, reacciona con el ácido tiobarbitúrico (TBA) para generar una coloración rosada. Luego se mide la absorbancia del sobrenadante espectrofotométricamente a determinada longitud de onda de acuerdo al kit utilizado los resultados fueron expresados en micromolar de malondialdehído por micro litro de suero $\mu\text{M}/\mu\text{L}$. (Wasowicz et al. 1993).

5.3.1.1 Procedimiento TBARS

Para la determinación de los TBARS se utilizaron los reactivos del kit según las recomendaciones de la casa fabricante (Caiman´s USA). Se utilizó el lector de elisa STAT FAX 3200 a 545 nm de longitud de onda.

5.3.2 Estado antioxidante Se utilizó la técnica de superóxido dismutasa (SOD) basada en el método descrito por Sun Y. et al, en el que se mide el radical O_2^- generado enzimática o fotoquímicamente. Los resultados son expresados en unidades por mililitro (U/ml), una unidad es definida como la cantidad de enzima necesaria para la dismutación del 50% del radical superóxido. (Su, et al. 1988).

5.3.2.1 Procedimiento determinación SOD

Para la determinación de la actividad de SOD se utilizaron los reactivos del kit según las recomendaciones de la casa fabricante (Caiman´s USA). Se utilizó el lector de elisa STAT FAX 3200 a 450 nm de longitud de onda.

El proyecto se llevó a cabo en el Laboratorio de Lípidos y Diabetes de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia.

6. RESULTADOS

6.1 VITAMINA D (25 Hidroxi vitamin D)

Los niveles circulantes de 25 hidrovitamina D [25(OH)D] fueron usados como marcadores del estado de suficiencia de la vitamina D (Kamilian et al. 2008), ya que estos representan la suma de la producción cutánea de la misma y la ingestión oral de vitamina D₂ y D₃ (Mataix, 2007).

El valor promedio de los niveles de 25 hidroxivitamina D fue de 27.7 +/- 5.7 ng/ml, el 32% de la muestra presentó niveles adecuados de vitamina D (concentraciones mayores de 30 ng/ml) mientras que el 68% presentó niveles insuficientes (Valores entre 10 - 29.9 ng/ml). Por otro lado, no se presentaron casos de deficiencia ni toxicidad de la vitamina (Tabla 1.).

TABLA 1. CLASIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE 25 HIDROXIVITAMINA D ng/mL

SUFICIENCIA Niveles entre 30 – 100 ng/ml	INSUFICIENCIA Niveles entre 10- 29.9 ng/ml	TOTAL
6	13	19

6.2 NIVELES DE TBARS (ESTADO PROOXIDANTE)

Los valores del indicador de estado prooxidante TBARS se muestran en la tabla 2. El nivel promedio de concentración de malondialdehido (MDA) fue de 10.29 +/- 2.47 µM/µL.

TABLA 2. VALORES DE TBARS
(Niveles de MDA $\mu\text{M}/\mu\text{L}$)

No ID	Sexo	TBARS $\mu\text{M}/\mu\text{L}$
1	M	8.9
2	M	7.9
3	M	8.9
4	F	10.9
5	F	9.9
6	M	9.9
7	M	11.9
8	M	6.4
9	M	9.9
10	F	7.9
11	M	7.9
12	M	13.9
13	M	9.9
14	M	8.9
15	M	11.4
16	M	15.9
17	F	13.4
18	F	8.4
19	F	13.4

6.3 NIVELES DE SOD (ESTADO ANTIOXIDANTE)

Los valores del estado antioxidante (actividad de SOD) se muestran en la tabla 3. El nivel promedio de actividad de SOD fue de 33 ± 5 U/ml

TABLA 3. VALORES ACTIVIDAD SOD
Actividad SOD U/ml

No ID	Sexo	SOD U/ml
1	M	32
2	M	35
3	M	34
4	F	29
5	F	34
6	M	31
7	M	33
8	M	30
9	M	32
10	F	43
11	M	37
12	M	26
13	M	32
14	M	32
15	M	29
16	M	31
17	F	27
18	F	36
19	F	49

6.4 VALORES HEMOGLOBINA GLUCOSILADA

Los porcentajes de hemoglobina glucosilada se presentan en la tabla 4. El valor promedio de hemoglobina glucosilada (Hb A1c) es de 6.5% +/- 0.3. Es de recordar que un criterio de inclusión fue el presentar una Hb A1c <7%.

TABLA 4. PORCENTAJE HEMOGLOBINA GLUCOSILADA

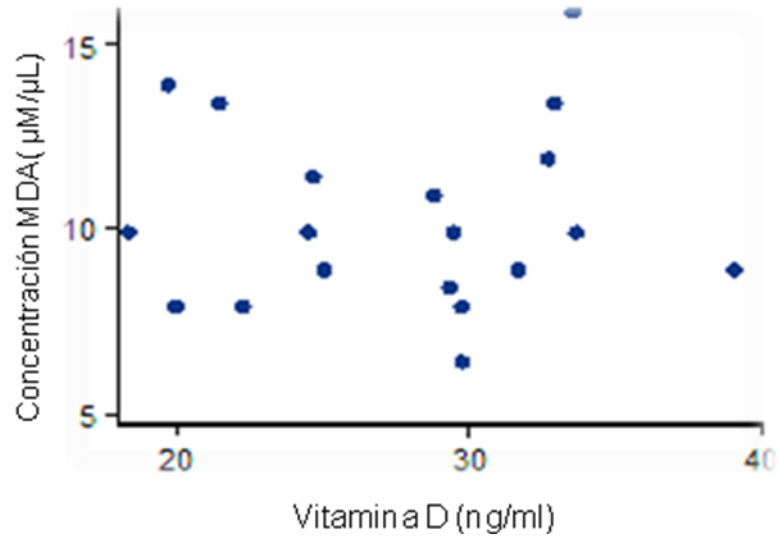
No ID	Sexo	%HG A1c
1	M	6.6
2	M	7
3	M	6.3
4	F	6.5
5	F	6.4
6	M	6.6
7	M	7
8	M	6.7
9	M	5.8
10	F	6
11	M	6.8
12	M	6.6
13	M	6.2
14	M	6.7
15	M	6.9
16	M	6.4
17	F	5.9
18	F	6.5
19	F	6.8

6.5 VITAMINA D Y TBARS

La relación entre concentraciones de vitamina D y niveles de TBARS se presenta en el Gráfico 1, De acuerdo a la prueba Rho de Spearman de 0.03, no es posible establecer una relación de dependencia entre las variables.

Gráfico 1.

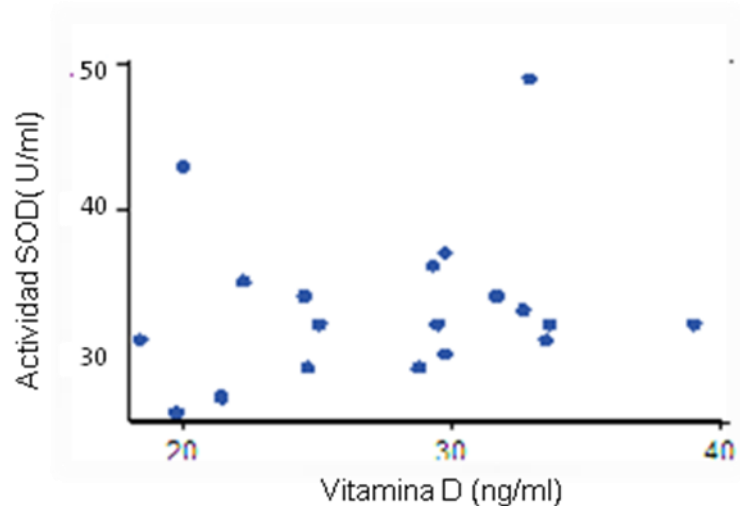
NIVELES DE VITAMINA D VS TBARS



6.6 VITAMINA D Y SOD

El comportamiento de la relación entre concentraciones de vitamina D y actividad de SOD se presenta en el Gráfico 2, donde la prueba Rho de Spearman arroja un valor de 0.22 lo cual indica que no existe una relación entre estas dos variables.

Gráfico 2.
CONCENTRACIONES VITAMINA D Vs SOD



6.7 HEMOGLOBINA GLUCOSILADA Y VITAMINA D

La vitamina D y la hemoglobina glucosilada son variables independientes (Rho spearman 0.10)

6.8 HEMOGLOBINA GLUCOSILADA Y TBARS

El Rho de Spearman entre hemoglobina glucosilada y estrés oxidativo fue de - 0.09, que no indica relación entre estas dos variables.

6.9 HEMOGLOBINA GLUCOSILADA Y SOD

La hemoglobina glucosilada y la actividad SOD no presentaron relación (Rho Spearman 0.12)

7. DISCUSIÓN

Los niveles circulantes de 25 hidrovitamina D que resultan de la suma de la producción cutánea de la misma y la ingestión oral de vitamina D2 y D3 indican la suficiencia de la vitamina D (Mataix J. 2007). A pesar de una supuesta mayor exposición al sol en nuestro medio, concentraciones insuficientes de vitamina D han sido reportados a nivel latinoamericano en Brazil (Sao Paulo) donde se encontraron concentraciones inadecuadas en: 42% de los ancianos, 24% de mujeres con osteoporosis, 50% de adolescentes sin patologías y en el 60% de adultos jóvenes. (Schuch, et al. 2009). Por otro lado, un estudio realizado en una cohorte de niñas entre 5 y 12 años de edad en Bogotá, arrojó que el 11.6% presentan niveles deficientes de vitamina D (Villamor et al. 2011) En un trabajo realizado en escolares de Guatavita (Colombia) se demostró insuficiencia o deficiencia de esta vitamina en el 52% de la población estudiada. (Ramirez et al. 2011).

Es de anotar que se han realizado estudios en población diabética pero en regiones geográficas donde la baja exposición al sol en invierno causa hipovitaminosis D (Shapses y Manson. 2011).

Desde hace tiempo se ha venido demostrando que la deficiencia de Vitamina D es frecuente en la población diabética (Oh et al. 2009, Noyan, et al. 2005 Christel et al. 2010). y que repercute en complicaciones principalmente cardiovasculares; incluso, se ha considerado que es un factor que aumenta el riesgo de mortalidad por enfermedad cardiovascular (Christel et al. 2010). El valor promedio de hidroxivitamina D en el presente estudio fue de 27.7 ng/mL; el 68% de los pacientes presentaron insuficiencia de vitamina D; esta insuficiencia fue independiente del género y control metabólico. Es de anotar que a pesar del promedio bajo encontrado no se presentaron casos de deficiencia de vitamina D, es decir niveles menores a 20 ng/mL de hidroxivitamina D (que según la categorización clasifica directamente en deficiencia).

Se ha descrito que el riesgo de padecer enfermedad cardiovascular es dos veces mayor en los pacientes diabéticos con niveles bajos de vitamina D que en los diabéticos que presentan concentraciones adecuadas de vitamina D. (Christel et al 2010). Esta podría ser una explicación del porqué algunos pacientes con DM2

desarrollan mayores complicaciones que otros a pesar del mantenimiento de un control glucémico adecuado a largo plazo (Oh et al. 2009) En los resultados arrojados en este estudio se confirma que a pesar de un buen control metabólico más de la mitad del grupo estudiado presenta un grado de hipovitaminosis D que muy posiblemente incrementa el riesgo de presentar complicaciones principalmente cardiovasculares.

Por otro lado, en estudios en pacientes con DM2 diagnosticada no se ha demostrado que los niveles adecuados de vitamina D mejore la insulinoresistencia o el metabolismo de la glucosa (Shapses y Manson. 2011). En este estudio el control glucémico, medido por la hemoglobina glucosilada era adecuado (<7%) aún en los pacientes que presentaron niveles insuficientes de vitamina D. Aunque en estudios publicados previamente se ha reportado que en individuos sanos se presenta una relación inversa entre los niveles bajos de vitamina D, concentración de glucosa e insulinoresistencia (Kamilian et al. 2008), la suplencia de vitamina D no modifica la glucemia ni la sensibilidad a la insulina (Shapses y Manson. 2011).

El estrés oxidativo se puede definir como la pérdida del balance entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y el sistema antioxidante. Varios estudios han demostrado que la hiperglucemia altera diversos mecanismos metabólicos, algunos como la sensibilidad a la insulina y el metabolismo lipídico, favoreciendo reacciones de oxidación que aumentan la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Liang, et al. 2007), moléculas que se han implicando en la fisiopatología de las complicaciones crónicas micro y macrovasculares de la DM2 (Wright, et al. 2006).

Es importante aclarar que en un ambiente de elevada reactividad y la corta vida media de los radicales se dificulta la estimación del balance pro oxidante y antioxidante. El TBARS ha sido aceptado y ampliamente utilizado como un indicador indirecto pero válido en el estudio de los radicales en suero y tejidos (Weydert, C. 2010).

En diversos estudios se ha reportado que la hiperglucemia es un posible factor de incremento de la producción de especies reactivas de oxígeno (Evans et al.2002, Liang et al. 2007). Asimismo se ha propuesto que el estrés oxidativo es una causa importante de desarrollo de insulinoresistencia, intolerancia a los carbohidratos,

daño a las células beta pancreáticas y activación concomitante de vías de señalización proinflamatorias (Arif, et al. 2009). Un estudio realizado en ratas con diabetes mostró un mayor desarrollo de estrés oxidativo en relación a ratas normales y evidenció que el control temprano de la hiperglucemia disminuye a largo plazo el estrés oxidativo (evaluado por método de TBARS y glutatión reducido) en comparación al observado en el grupo de ratas diabéticas al cual no se le realiza un control temprano de la glucemia (Ceriello y Testa. 2009). En el presente estudio realizado en humanos con DM2 (con control adecuado) se reporta medición de la actividad de radicales libres por el método de TBARS; los niveles encontrados son mayores a los descritos en una población de 1945 individuos sanos con edades de 58 +/-15 años (5 +/- 1.9 $\mu\text{M}/\mu\text{L}$) (Tanaka et al 2011).

No se ha evaluado, en nuestro conocimiento, la relación del estado antioxidante y niveles de vitamina D en humanos con DM2. Se ha reportado en modelos de ratas con diabetes que la administración de vitamina D incrementa los niveles de estrés oxidativo y reduce la actividad antioxidante (Noyan, et al. 2005) y por otra parte en humanos sin diabetes se ha reportado que la suplementación de vitamina D disminuye significativamente el estrés oxidativo (Ozlem, et al. 2009). No obstante, en nuestro trabajo en humanos con DM2 (con control adecuado de la glucemia) no se encontró relación alguna entre los niveles de vitamina D y el estado antioxidante evaluado a través de la actividad de SOD. El estado antioxidante medido en nuestros pacientes era similar al descrito en pacientes con DM2 y menor a sujetos normales. (Chun et al 2011).

Es de anotar que las concentraciones plasmáticas de vitamina D para obtener un efecto en el estrés oxidativo, no son necesariamente las mismas para desencadenar otras acciones atribuidas a esta vitamina (Noyan, et al. 2005) Los resultados obtenidos en este estudio se podrían utilizar como línea de base para evaluar si la corrección de la insuficiencia se acompaña bien sea de un aumento o disminución del estrés oxidativo en personas con DM2.

Es importante considerar que ninguno de los dos indicadores del estado antioxidante y prooxidante (SOD y TBARS) se expresa como variables categóricas, los estudios que utilizan estas técnicas no lo sugieren, sino que se utilizan como un referente o de base.

8. CONCLUSIONES

Este estudio realizado en usuarios de Unisalud, que pertenecen a un programa de enfermedades crónicas, demostró una insuficiencia de la vitamina D en una proporción elevada de ellos (68%).

En este estudio transversal, en un grupo de pacientes con DM2 controlada, los niveles de indicadores de estado prooxidante (TBARS) fueron mayores al promedio reportado para población sana.

En este estudio realizado, en un grupo de pacientes con DM2 controlada, los niveles de indicadores de estado antioxidante (SOD) fueron similares a los reportados en un estudio con pacientes diabéticos tipo 2 e inferiores a sujetos sanos.

No se encontró una relación entre los niveles de vitamina D y el estado antioxidante y prooxidante en los pacientes diabéticos del estudio.

9. PROYECCIONES DEL TRABAJO

Sería de gran interés establecer la evolución de los indicadores de estrés oxidativo en el transcurso del tiempo y su relación con el control de la diabetes. Asimismo sería pertinente comparar estos niveles con los de un grupo de DM2 sin control adecuado de su enfermedad además de estudiar posibles modificaciones con diferentes manejos farmacológicos.

10. NOTA

Los resultados de los niveles de Vit D fueron reportados a cada paciente y a la Jefatura Médica de Unisalud. Se espera con ello contribuir a mejorar su estado de salud y cumplir con la obligación de utilizar los resultados de la investigación en beneficio de los pacientes.

ANEXO A

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

CONSENTIMIENTO INFORMADO

RELACIÓN ENTRE CONCENTRACIONES SÉRICAS DE VITAMINA 25(OH)D Y NIVELES DE ESTRÉS OXIDATIVO EN UNA POBLACIÓN DE DIABÉTICOS TIPO 2 (2011)

Bogotá,

La Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia realizará un estudio sobre:

La determinación de la existencia de una relación entre concentraciones séricas de vitamina 25(OH)D y niveles de estrés oxidativo en una población de pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2 (2011)

Para participar en este estudio se requiere:

1. Diagnóstico de DM2
2. Edad mayor o igual a 45 y menor de 65
3. Hemoglobina glucosilada menor de 7%
4. En manejo con dieta, ejercicio físico y/o metformina
5. Firma
6. Deseo de participar

Estos estudios se realizarán en Las muestras de sangre que serán examinadas en la Facultad de Medicina, de la Universidad Nacional de Colombia

Recibirá por escrito los resultados del estudio.

Esta investigación tendrá la autorización del Comité de Ética de la Facultad de Medicina de La Universidad Nacional de Colombia según lo estipulado por la Resolución No. 008430 de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia.

INFORMACIÓN

a. La justificación y los objetivos de la investigación.

Se acepta que en la DM2 se presenta estrés oxidativo pero no se comprenden todavía los mecanismos mediante los cuales los radicales libres intervienen en la patogénesis de la DM2 y sus complicaciones.

A la actualidad aun no se ha determinado si los niveles bajos de vitamina D se acompañan de un mayor estrés oxidativo en la población con DM2. Este conocimiento es importante porque la intervención terapéutica de los niveles circulantes de vitamina D podría ser útil para disminuir las complicaciones, principalmente cardiovasculares, observadas en esta.

Objetivo General:

Determinar si existe una relación entre las concentraciones séricas de vitamina 25 (OH)D y el estado de estrés oxidativo en pacientes con DM2 que están adecuadamente controlados.

Objetivos Específicos:

Determinar los niveles circulantes de vitamina 25(OH)D en un grupo de pacientes con DM2.

Determinar si la población en estudio presenta deficiencia de los niveles circulantes de 25(OH)D.

Establecer el estado de estrés oxidativo en la población en estudio.

b. Los procedimientos que se van a usar

Toma de muestra de sangre:

Después de doce horas de ayuno se tomarán 10 mL de sangre venosa con el sistema venoject en 2 tubos vacutainer, los cuales se centrifugarán a 2500 revoluciones por 10 minutos y el suero obtenido se almacenará a -80° C para la medición posterior de la vitamina D y los niveles de estrés oxidativo.

c. Las molestias o los riesgos esperados.

Esta investigación se clasifica en el Grupo de “Investigación con riesgo mínimo”. La única molestia que podría derivar del estudio es dolor, hinchazón, enrojecimiento y hematoma (morado) en el sitio de punción venosa.

d. Los beneficios que puedan obtenerse.

e. Los procedimientos alternativos que pudieran ser ventajosos para el sujeto.

f. La garantía de recibir respuesta a cualquier pregunta y aclaración a cualquier duda acerca de los procedimientos riesgos, beneficios y otros asuntos relacionados con la investigación y el tratamiento del sujeto. El investigador principal dará respuesta a cualquier inquietud al inicio, durante y al final del trabajo.

g. La libertad de retirar su consentimiento en cualquier momento y dejar de participar en el estudio sin que por ello se creen perjuicios para continuar su cuidado y tratamiento.

h. La seguridad que no se identificará al sujeto y que se mantendrá la confidencialidad de la información relacionada con su privacidad.

i. El compromiso de proporcionarle información actualizada obtenida durante el estudio, aunque ésta pudiera afectar la voluntad del sujeto para continuar participando.

j. La disponibilidad de tratamiento médico y la indemnización

La presente investigación no acarrea riesgos para la salud de los participantes, ni da lugar a daños que puedan causar demandas civiles o penales.

k. Gastos adicionales

En ningún momento se solicitará dinero al paciente. Los gastos serán cubiertos por el presupuesto de la investigación.

CONSENTIMIENTO

1). Nombre del paciente: _____

Documento de identificación: _____

Teléfono: _____

2). Nombre del testigo: _____

Relación con el paciente: _____

CC del testigo: _____

Firma del testigo: _____

REFERENCIAS

- Arif M, Islam M, Waise T, Hassan F, Mondal I, Kabir Y. DNA damage and plasma antioxidant indices in Bangladeshi type 2 diabetic patients. *Diabetes & Metabolism* 2009;36:51–57.
- Bikle D. Vitamin D: newly discovered actions require reconsideration of physiologic Requirements. *Trends Endocrinol Metab* 2010;21:75–384.
- Blanco J, Maya J. *Epidemiología básica y principios de investigación*. 2ª ed. Medellín: Corporación para investigaciones Biológicas; 2006.
- Bowman, B. *Conocimientos actuales sobre nutrición*, Washington D.C. Instituto internacional de ciencias de la vida: OPS; 2003.
- Ceriello A, Testa R. Antioxidant Anti-Inflammatory Treatment in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 2009, 32:232-236.
- Chap, T. *Introductory biostatistics*. by John Wiley & Sons; 2003.
- Christel J, Gall M, Schmedes A, Tarnow L, Parving H, Rossing P. Vitamin D Levels and Mortality in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 2010; 33:2238–2243.
- Dae H, Siamak S, Utpal D, Adams D, Whellan. Prevalence of Hypovitaminosis D in Cardiovascular Diseases. *Am J Cardiol* 2008;102:1540 –1544.
- Diabetes atlas 5ª edición*, Federación Internacional de Diabetes. 2011.
- Evans J, Goldfine I, Maddux B, Grodsky G. Oxidative Stress and Stress-Activated Signaling Pathways: A Unifying Hypothesis of Type 2 Diabetes. *Endocrine Reviews* 2002; 23:599–622.
- Gil A. *Tratado de nutrición, bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición*, tomo 1. España: Ed. Médica Panamericana; 2010.
- Handem K, Carreau S, Jamoussi K, Miladi S, Lajmi S, Aloulou D, et al. 1,25 HydroxyvitaminD3: Therapeutic and preventive effect against Oxidative Stress. Hepatic, Pancreatic and Renal injury in Alloxan-induced Diabetes in rats. *J Nutr Sci Vitaminol*, 2009; 55: 215-222.

Hideaki K, Naoto K, Munehide M, Taka-M. Role of Reactive Oxygen Species in the Progression of Type 2 Diabetes and Atherosclerosis. Hindawi Publishing Corporation; 2009;2010:1-11.

Holick M. Vitamin D Deficiency. N Engl J Med 2007;357:266-81.

Ji Y, You Lee S, Young C. Involvement of SMRT Corepressor in Transcriptional Repression by the Vitamin D Receptor. Mol Endocr 2009; 23: 251–264.

Judd S, Tangpricha V. Vitamin D Deficiency and Risk for cardiovascular Disease. Am J Med Sci. 2009;338:40–44.

Kamilian T, Need A, Horowitz M, Chapman I. Vitamin D, glucose, insulin, and insulin sensitivity, Nutrition 2008; 24:279–285.

Krause M. Nutrición y dietoterapia, 10ª ed. México: Mcgraw-Hill nteramericana; 2001.

Lamb R, Goldstein B. Modulating an oxidative-inflammatory cascade: potential new treatment strategy for improving glucose metabolism, insulin resistance, and vascular function. Int J Clin Pract 2008; 62:1087–1095.

Liang C, Han S, Senokuchi T, Tall A. The macrofage at the crossroads of insulinoreistance and atherosclerosis. Circ Res 2007; 100:1546-1555.

Mataix J. Nutrición y alimentación humana, Vol 2, Madrid: Oceano/ergón;2007.
Nakhjavani M, Esteghamati A, Nowroozi S, Asgarani F, Rashidi A, Khalilzadeh O. Type 2 diabetes mellitus duration: an independent predictor of serum malondialdehyde levels. Singapore Med J 2010; 51: 582-585

Noyan T, Balaharoglu R, Kömüroglu U. The oxidant and antioxidant effects of 25-hydroxyvitamin D3 in liver, kidney and heart tissues of diabetic rats. Clin Exp Med 2005;5:31–36

Oh J, Weng S, Felton S, Chen Z, Schechtman K, Bernal L, Bernal C. 1,25(OH)₂ Vitamin D Inhibits Foam Cell Formation and Suppresses Macrophage Cholesterol Uptake in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus Circulation 2009;120;687-698.

Osei K. 25-OH Vitamin D: Is It the Universal Panacea for Metabolic Syndrome and Type 2 Diabetes? J Clin Endocrinol Metab 2010; 95:4220–4222.

Ozlem T, Dilek G, Beste O, Ahu T, Ayliz G, Meral Y, et al. Effect of Vitamin D Deficiency and Replacement on Endothelial Function in Asymptomatic Subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94:4023–4030.

Ramirez D, Feliciano J, Mockus I, Aranzales L, Siabbato M, Carrasco N, et al. Determinacion del porcentaje de grasa corporal total por bioimpedancia XVI Congreso Nacional de Ciencias Biológicas Medellin 11 a 15 de Octubre 2011 (Memoria).

Sanchez, R, Zambrano A, Castillo A, Aranda A. Vitamin D-Dependent Recruitment of Corepressors to Vitamin D/Retinoid X Receptor Heterodimers. *Mol Cell Biol*; 2008; 28:3817–3829.

Schuch N, Garcia V, Martini L. Vitamina D and endocrine diseases. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2009;53:625-633.

Shapses S, Manson J. Vitamin D and Prevention of Cardiovascular Disease and Diabetes, Why the Evidence Falls Short. Commentary American Medical Association. *JAMA* 2011; 305:2565-2566.

Sun Y, Oberley W, Li Y. A Simple Method for Clinical Assay of Superoxide Dismutase, *Clinical Chemistry*, 1988; 34:2522-2526

Tanaka S, Miki T, Sha S, Hirata K, Ishikawa Y, Yokoyama M Serum levels of thiobarbituric acid-reactive substances are associated with risk of coronary heart disease. *J Atheroscler Thromb*. 2011;18:584-91.

Tao D, Zhi-Guang Z, Shuo Y, Jian L, Lin Y, Wei-Dong Z. et al. Regulation by 1, 25-dihydroxy-vitamin D3 on altered TLRs expression and response to ligands of monocyte from autoimmune diabetes. *Clinica Chimica Acta* 402; 2009; 133–138.

Van den Berg T. On the origins of adaptive immunity: innate immune receptors join the tale. *Trends Immunol* 2004;25:11–16.

Villamor E, Marín C, Mora M, Baylin A. Vitamin D deficiency and age at menarche: a prospective study. *Am J Clin Nutr* 2011;94:1020–1025.

Wasowicz W, Neve J, Peretz A. Optimized Steps in Fluorometric Determination of Thiobarbituric Acid-Reactive Substances in Serum: Importance of Extraction pH and Influence of Sample Preservation and Storage. *Clinical Chemistry*, 1993; 39:497-500.

Weydert C, Cullen J. Measurement of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nat Protoc.* 2010; 5: 51–66.
World Health Organization. Prevalence of diabetes in the WHO region of Americas. 2004.

Wright E, Scism-Bacon J, Glass I. Oxidative stress in type 2 diabetes: the role of fasting and postprandial glycaemia. *Int J Clin Pract*, 2006;60: 308–314.

Xia L, Lan L, Xiang Y, Gan H, Jian L, Minxiang L, et al. Protective effects of 1- α -hydroxyvitamin D3 on residual β -cell function in patients with adult-onset latent autoimmune diabetes (LADA), *Diabetes Metab Res Rev* 2009; 25:411–416.