

Trabajo Original

Albúmina glicada. Inhibición por aspirina.

Glycated albumin. Inhibition by aspirin.

Dr. Aristides Lázaro Brito Machín¹, Dr. C. Emilio Bustillo Solano², Lic. Martha Miriela Pérez Bonachea³, Lic. Dagmay Olivera Piedrahita⁴, Lic. Edisley Zaila Lago⁵

1. Especialista de primer grado en Laboratorio Clínico. Profesor Instructor.
2. Especialista de segundo grado en Endocrinología. Profesor Titular.
3. Licenciada en Ciencias Farmacéuticas.
4. Licenciada en Ciencias Farmacéutica.
5. Licenciada en Ciencias Farmacéuticas.

RESUMEN

El experimento evaluó "in vitro" la capacidad inhibitoria y protectora de la aspirina sobre el ataque de la glucosa a la albúmina sérica bovina en función del tiempo y de la concentración del fármaco. Para ello se probaron tres concentraciones diferentes y crecientes de aspirina y dos tiempos de incubación (3 y 5 días) y se midió la síntesis de Fructosamina (albúmina glicada), comparándose los valores de albúmina glicada obtenidos bajo diferentes concentraciones de aspirina y durante distintos tiempos de incubación, con muestras controles sin aspirina. Los resultados de los ensayos apoyan la hipótesis de que la aspirina es efectiva en la inhibición de la glicación de la albúmina y que la preincubación de albúmina con aspirina a concentraciones antiinflamatorias ofrece protección a la molécula de albúmina frente a dichos procesos de glicosilación no enzimática de proteínas; sin embargo la aspirina no es capaz de desplazar a la glucosa de sus sitios de unión con la albúmina y librarla de la glicación una vez ocurrido tal proceso.

DeCS: ALBUMINA SERICA, GLICOSILACION, ASPIRINA, FRUCTOSAMINA.

ABSTRACT

The experiment evaluated "in vitro" the inhibitory and protecting capacity of aspirin on the attack of glucose to bovine serum albumin according to the time and concentration of this drug. To this aim, a test was done of three different and growing concentrations of aspirin and two times of incubation (3 and 5 days) and the synthesis of fructosamine was measured (glycated albumin), with the values of glycated albumin obtained under different aspirin concentrations and during different times of incubation being compared with control samples without aspirin. The results of the trials support the hypothesis that aspirin is effective in the inhibition of glycation of albumin and that the albumin preincubation with aspirin at anti-inflammatory concentrations offers protection to the albumin molecule before these processes of non enzymatic glycosilation of proteins; however, aspirin is not able to displace glucose from its binding places with albumin and deliver it from glycation once such a process has occurred.

MeSH: SERUM ALBUMIN, GLYCOSYLATION, ASPIRIN, FRUCTOSAMINE.

INTRODUCCIÓN

La glicación o glicosilación no enzimática de proteínas es una modificación postsintética de proteínas provocada por la unión de la glucosa u otros glúcidos a las proteínas sin que tenga lugar participación enzimática. En todos los casos, las glicosilaciones no enzimáticas de las proteínas comienzan con el ataque nucleófilo de la glucosa al grupo épsilon amino de la lisina o al grupo alfa amino N-terminal de la proteína, con la formación de una base de Schiff que es muy inestable, la que en un periodo de semanas experimenta una lenta reorganización (reordenamiento de Amadori), la cual conduce, en dependencia de la vida media de la proteína involucrada, a la acumulación de un aducto azúcar proteína estable, pero químicamente reversible o la formación de sucesivas reacciones químicas, rearrreglos y deshidrataciones, que se desarrollan lentamente y que forman los llamados AGEs (Advanced Glycation End - Products) que son irreversibles y que se acumulan durante todo el tiempo de vida de la proteína, dando lugar a significativos cambios estructurales y funcionales de la misma ¹.

En las proteínas de corta vida, como la albúmina, el reordenamiento de Amadori termina con la formación de una cetoamina estable conocida genéricamente como Fructosamina, de modo que todas las proteínas glicadas del plasma, incluyendo a la albúmina, son llamadas en su conjunto Fructosaminas ¹⁻³.

Debido a que los pacientes diabéticos poseen un nivel elevado de glucosa en sangre, ellos son más susceptibles a estos procesos de glicosilación no enzimática de proteínas comparados con las personas sanas. Así, la glicación, se piensa que inicia el largo número de complicaciones que aparecen en los pacientes diabéticos, incluyendo un papel importante en la etiopatogenia de la microangiopatía diabética, el desarrollo temprano de cataratas por la glicación de las proteínas del cristalino, reducción de la elasticidad de los vasos sanguíneos y el aumento de la resistencia vascular periférica por glicación del colágeno ⁴⁻⁷. Por esta razón se ha prestado especial interés en la búsqueda de fármacos inhibidores de dichos procesos ⁸⁻¹⁰.

Estudios recientes han dado a conocer la capacidad de la aspirina para inhibir las glicosilaciones no enzimáticas de proteínas debido a la acetilación de los grupos épsilon amino de los residuos de lisina, lo que implica que su uso reporta beneficios mayores para los pacientes diabéticos ^{11, 12}.

Con el objetivo de probar si la aspirina es capaz de evitar o reducir la glicosilación no enzimática de proteínas los autores se propusieron inicialmente hacer un ensayo "in vitro" utilizando para ello a la albúmina; la cual ha recibido una atención especial por ser la más abundante de las proteínas del plasma y ha sido usada para la evaluación del control metabólico del paciente diabético y como modelo para los estudios de glicación de todas las proteínas del plasma.

MATERIAL Y MÉTODO

Se realizó un estudio experimental "in vitro" sobre la hipótesis de que la aspirina tiene efecto inhibitorio sobre el proceso de glicosilación no enzimática de proteínas. El trabajo se realizó en la sección de Química Especial del Departamento de Laboratorio Clínico del Hospital Clínico Quirúrgico Docente "Camilo Cienfuegos" de Sancti Spiritus.

Definiciones operacionales:

Después de administrar una dosis de aspirina, el 73% de la misma se convierte en ácido salicílico producto de la acción enzimática a nivel intestinal y hepático y sólo el 27% se mantiene en sangre como ácido acetilsalicílico (AAS). Es precisamente este 27% de ácido acetilsalicílico el que tiene poder inhibitorio sobre la glicación de proteínas por lo que en nuestra investigación, trabajaremos con concentraciones terapéuticas de ácido acetilsalicílico y no de ácido salicílico, simulando los fenómenos que ocurren "in vivo" ¹³.

Se utilizaron dosis antiinflamatorias, analgésicas-antipiréticas y antiagregante plaquetario de aspirina, entendiéndose como tales la concentración de ácido acetilsalicílico que aproximadamente se obtiene en sangre después de administrar una dosis dada de aspirina. Después de administrar una dosis antiinflamatoria de aspirina entre 3 y 6g, analgésica-antipirética de 0,5 a 1g o una dosis diaria entre 125 y 300 mg. con efecto antiagregante antiplaquetario se obtendrá una concentración sanguínea de salicatos (ácido acetilsalicílico y ácido salicílico) aproximada de 300 mg/L, 60 mg/L y 19,6 mg/L en cada caso, de los cuales son ácido acetilsalicílico el 27% de la cantidad administrada, la que se corresponde aproximadamente con 81 mg/L para la dosis antiinflamatoria, 16,2 mg/L para la dosis analgésica-antipirética y 5,3 mg/L para la dosis con acción antiagregante plaquetario. En las condiciones de trabajo estas concentraciones, se lograron añadiendo diferentes cantidades de aspirina en dependencia al ensayo que se experimentaba, de forma tal que se alcanzaran estas concentraciones de ácido acetilsalicílico.

Condiciones experimentales

Con el objetivo de hacer comparable este experimento "in vitro" con las condiciones "in vivo" del paciente diabético y sin modificar el procedimiento propuesto por Jonhson y cols.¹⁴ para glicación "in vitro" de proteínas, en el que se utiliza una concentración de glucosa 200 mmol/L, la que es 25 veces superior a la concentración de un paciente diabético con valores de glicemia $\pm 7,8$ mmol/L, se decidió multiplicar por 25 la cantidad de ácido acetilsalicílico calculado, que debían ser agregados en cada caso para obtener una concentración de una dosis antiagregante plaquetaria, analgésica-antipirética y antiinflamatoria y de esta forma plantear el experimento. Así las concentraciones de glucosa y de aspirina, aunque 25 veces superiores a las obtenidas en un paciente diabético que ingiera el fármaco, serían comparables y homologadas. De otra forma habría demasiada glucosa, y poca aspirina, lo que podría ser una limitación del experimento. Además así se logró el efecto glicosilante de la glucosa o inhibitorio de la aspirina en un periodo de tiempo más corto, de lo contrario se necesitarían periodos de incubación considerablemente largos.

Orden de los experimentos:

1. Inhibición de la glicación por el ácido acetilsalicílico.

Con el objetivo de probar el efecto inhibitorio de la aspirina sobre la glicación de la albúmina, se incubaron 3 concentraciones diferentes de aspirina con cantidades constantes de albúmina sérica bovina y glucosa, durante diferentes tiempos de incubación.

Se depositaron 50 ml de albúmina sérica bovina en 18 tubos de ensayo estériles con tapa de rosca. A los primeros 6 tubos se les añadió 10 ml de una solución 1,2 M de glucosa y 7,95 mg de ácido acetilsalicílico (concentración antiagregante plaquetaria). A los tubos del 7 al 12 se les agregó 10 ml de glucosa 1,2 M y 24,3 mg de ácido acetilsalicílico (concentración analgésica-antipirética) y a los tubos del 13 al 18 además de la misma cantidad de glucosa se le adicionó 121,5 mg de ácido acetilsalicílico (concentración antiinflamatoria). Se incubaron a 37°C y por espacio de 3 días los tubos 1, 2, 3, 7, 8, 9, 13,14 y 15 y el resto por espacio de 5 días, posteriores a los cuales se dializaron en bolsas para diálisis contra buffer fosfato pH 7,3 para eliminar la aspirina y glucosa remanentes y se concentró utilizando polietilenglicol 6000 hasta obtener 1ml, determinándose posteriormente la concentración de albúmina glicada en cada una de las réplicas por la técnica de Jonhson y colaboradores¹⁵, modificada por Baker¹⁶.

Muestras con albúmina sérica bovina y glucosa que no contenían aspirina se incubaron bajo las mismas condiciones experimentales, utilizándose como controles.

1. Preincubación de la albúmina bovina con aspirina.

Para conocer si la aspirina una vez unida a la albúmina evita la unión posterior de la glucosa se preincubó durante 5 días la albúmina sérica bovina con aspirina y posteriormente se le añadió glucosa y se incubó nuevamente por espacio de 3 y 5 días, después de los cuales se midieron los niveles de albúmina glicada.

Se depositaron 50 ml. de albúmina sérica bovina tamponada en 18 tubos para ensayo estériles y con tapa de rosca. Se añadió 6,625 mg de ácido acetilsalicílico en los tubos del 1 al 6 (concentración antiagregante plaquetario) 20,25 mg en los tubos del 7 al 12 (concentración analgésica-antipirética) y 101,25 mg en los tubos restante (concentración antiinflamatoria) y se incubaron a 37°C por espacio de 5 días. Se dializó contra buffer fosfato para eliminar el resto de la aspirina, seguidamente se concentró, y se completo hasta obtener el volumen inicial.

Se añadió a cada uno de los tubos 10 ml de glucosa 1,2 M y se incubaron nuevamente por espacio de 3 días los tubos 1,2,3,7,8,9,13,14,15 y durante 5 días los tubos 4,5,6,10,11,12,16,17 y 18.

Se repitieron los procedimientos de diálisis y concentración, determinándose posteriormente la concentración de albúmina glicada en cada una de las réplicas.

Se procesaron conjuntamente con las muestras de estudio tubos controles de albúmina bovina sin aspirina.

1. Determinación de la capacidad del ácido acetilsalicílico para desplazar a la glucosa de su unión con la albúmina.

Para determinar si una vez establecido el enlace entre la albúmina y la glucosa, esta última puede ser desplazada por el ácido acetilsalicílico, se incubó albúmina sérica bovina previamente glicada con diferentes concentraciones de ácido acetilsalicílico.

Se depositaron 10 ml de albúmina glicada en 18 tubos. Se añadió aspirina a concentraciones antiagregante plaquetaria (1,325 mg), a los tubos del 1 al 6 analgésica-antipirética (4,05 mg), de los tubos del 7 al 12 así como dosis antiinflamatoria (20,25 mg), en los tubos del 13 al 18. Se incubó a 37°C por espacio de 3 días los tubos 1,2,3,7,8,9,13,14 y 15 y durante 5 días los tubos 4,5,6,10,11,12,16,17 y 18. Después de estos 2 tiempos de incubación, se repitieron los procedimientos de diálisis y concentración, determinándose la concentración de albúmina glicada en cada una de las réplicas. En este ensayo también se montaron controles de albúmina glicada sin aspirina.

Procesamiento estadístico

Los datos obtenidos en este trabajo fueron procesados en una mini computadora utilizando el paquete de Software, para análisis estadístico denominado SPSS. Se utilizaron medidas descriptivas y el Test. t-student para comparar la existencia de diferencia en cuanto al rendimiento de albúmina glicada en uno y otro tiempo de incubación, también se utilizó el test de diferencia de medias para grupos independientes, así como, el análisis de varianza para precisar si había diferencias significativas entre los niveles de albúmina glicada en una u otra concentración de aspirina. Se trabajo con un nivel de significación de $\alpha=0,05$. Los resultados se muestran en tablas.

RESULTADOS

Inhibición de la glicación por el ácido acetilsalicílico

Los resultados del estudio del efecto inhibitorio de la aspirina sobre la generación de albúmina glicada se muestra en la tabla No. 1. Al comparar la producción "in vitro" de albúmina glicada en las muestras bajo el efecto de cada una de las concentraciones de ácido acetilsalicílico con la obtenida en los controles, se comprobó, que hubo diferencias significativas ($p < 0,05$) entre el rendimiento de albúmina glicada alcanzada en los controles y la lograda en las muestras que contenían la concentración antiinflamatoria de aspirina tanto después de 3 días como de 5 días de incubación, no afectándose apreciablemente la producción de albúmina glicada a dosis analgésica-antipirética y antiagregante plaquetaria, lo que demuestra que aunque los valores de albúmina glicada obtenidos en las muestras son apreciablemente inferiores a la de los controles, sólo fue estadísticamente importante el efecto inhibitorio que se logró con dosis antiinflamatorias de ácido acetilsalicílico. No obstante la síntesis de albúmina glicada no fue estadísticamente mayor en un tiempo de incubación que en el otro, ni en cada una de las concentraciones de aspirina aplicada, ni en los controles.

Preincubación de la albúmina sérica bovina con aspirina

Los resultados de este ensayo se muestran en la tabla No. 2 en la que se observan diferencias apreciables entre el rendimiento de albúmina glicada obtenida en los tubos con ácido acetilsalicílico a diferentes concentraciones y los tubos controles. Observe que tanto a los 3 días como a los 5 días de incubación, la síntesis de albúmina glicada fue significativamente ($p < 0,05$) menor en los tubos con AAS independientemente de la concentración utilizada, que la lograda en los tubos controles sin preincubación con aspirina.

Los efectos inhibitorios de la preincubación con aspirina sobre la glicación de la albúmina, no fueron significativamente superiores a una concentración de AAS en particular. Se logró inhibir la glicación de la albúmina previamente unida a la aspirina, tanto a concentraciones tan altas como la antiinflamatoria, como tan bajas como la antiagregante plaquetaria. Sin embargo los valores de albúmina glicada alcanzados en los tubos de prueba y en los controles, fueron significativamente superiores ($p < 0,05$), después de 5 días de incubación.

Determinación de la capacidad del ácido acetilsalicílico para desplazar a la glucosa de su unión a la albúmina.

En la tabla No. 4 se puede apreciar que no existen diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los valores de Fructosamina obtenidos, ni en función del tiempo de incubación, ni en dependencia a la concentración de ácido acetilsalicílico utilizado.

DISCUSIÓN

En el primer ensayo se trató de exponer a la glucosa y al ácido acetilsalicílico bajo la misma condición experimental de reacción. A concentraciones antiinflamatorias de aspirina los grupos épsilon amino de los residuos de lisina de las cadenas laterales así como el grupo alfa amino N terminal de la albúmina interactúan con la aspirina quedando acetilados y limitándose la posibilidad de unión de la glucosa. Estos resultados se asemejan a los obtenidos por Martinus y colaboradores¹⁰ sobre el efecto inhibitorio "in vitro" de los procesos de glicosilación no enzimática por aspirina y diclofenac.

Los resultados del segundo experimento demuestran que la aspirina ofrece alguna protección contra la glicación actuando como molécula "chaperona" entre la glucosa y la proteína, efecto que demostró Heath¹² en este caso la aspirina actuaba inhibiendo la inactivación de la malato

deshidrogenasa por la glucosa. Las diferencias en cuanto al efecto protector de la aspirina después de 3 y 5 días de incubación, creemos que esto se deba a una menor disponibilidad de sitios de reacción en la molécula de albúmina para reaccionar con la glucosa debido a previa acetilación de la albúmina por el ácido acetilsalicílico, pero estas probabilidades de reacción tienden a aumentar en función del tiempo. Al parecer 3 días de incubación fueron prácticamente insuficientes para lograr interacciones importantes y, en 5 días pueden aumentar substancialmente las posibilidades de reacción.

Con relación a la capacidad de la aspirina para desplazar a la glucosa de su unión con la albúmina, los resultados sugieren que la glucosa una vez unida a la albúmina formando la albúmina glicada establece un enlace covalente con la albúmina el cual la aspirina no puede romper.

Después de realizar los tres ensayos "in vitro" donde se probó la capacidad protectora y/o inhibitoria de la aspirina sobre las glicaciones proteicas podemos concluir que:

1. El ácido acetilsalicílico a concentraciones antiinflamatorias es capaz de inhibir "in vitro" la glicación de la albúmina sérica bovina.
2. El ácido acetilsalicílico protege a la albúmina sérica bovina del proceso de glicosilación no enzimática.
3. El ácido acetilsalicílico no es capaz de desplazar "in vitro" a la glucosa de su unión a la albúmina, una vez formada la albúmina glicada.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Romay Ch, Pascual C. Glicosilaciones no enzimáticas de proteínas. Interferon y Biotecnología. 1987;(4):213-220.
2. Petitti DB, Contreras R, Dudl J. Randomized trial of fructosamine home monitoring in patients with diabetes. *Eff Cin Pract.* 2000;4(1): 8-23.
3. Rahlenbeck SI. Monitoring diabetic control in developing countries: a review of glycated hemoglobin and fructosamine assays. *Trop Doct* 1998;28(1): 9-15.
4. Sanguinetti SM, Schreier LE, Elbert A, Fasulo V, Ferrari N, Wikinski RL Detection of structural alterations in LDL isolated from type 2 diabetic patients: application of the fructosamine assay to evaluate the extent of LDL glycation. *Atherosclerosis.* 1999;143(1): 213-215.
5. Farr AK, Braun RD, Cefalu WT, Bell-Farrow AD, Wang ZQ, Hatchell DL Increased nonenzymatically glycosylated proteins in the vitreous humor of diabetic animals. *Lab Anim Sci.* 1999;49(1):58-61.
6. Dominguez C, Ruiz E, Gussinye M, Carrascosa A. Oxidative stress at onset and in early stages of types 1 diabetes in children and adolescents. *Deabetes Care.*1998;21(10):1736-1742.
7. Aguirre F, Martin I, Grinspon D, Ruiz M, Hager A, De Paoli T, et al. Oxidative damage, plasma antioxidant capacity, and glucemic control in elderly NIDDM patients. *Free Radic Biol Med.* 1998; 24(4):580-585.
8. McCarthy AD, Cortizo AM, Gimenez Segura G, Bruzzone L, Etcheverry SB. Non-enzymatic glycosylation of alkaline phosphatase alters its biological properties. *Mol Cell Biochem.* 1998;181(1-2):63-69.
9. Lebedeva EA. [The pharmacological blockade of protein glycosylation in diabetes mellitus using sulfonylurea derivatives and biguanides]. *Eksp Klin Farmakol.*1996; 59(5):40-42
10. Biswas A, Viegas OA, Coeling Bennink HJ, Korver T, Ratnam SS. Implanon contraceptive implants: effects on carbohydrate metabolism. *Contraception.* 2001; 63(3):137-141
11. Martinus AM. Glycation of human serum albumin: inhibition by Diclofenac. *Biochemica et Biophysica Acta.* 1992:201-204.
12. Heat MM. Glycation-induced inactivation of malato deshydrogenase protection by aspirin on a lens molecular chaperone, alpha-crystallin. *Bio Chim Biphys Acta.* 1996;1315(3):176-184.
13. Goodman Gilman A. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 8va. Ed. Bogota: Médica Panamericana; 1991.
14. Jonhson RN, Baker JR. The alkaline reducing activity of glycated serum proteins and its relevance's to diabetes mellitus. *Clin Chem.* 1986;32:368-370.
15. Baker JR. Clinical usefullnes of estimation serum fructosamaine concentration screening test for deabetes mellitus. *Br Ned J.* 1983;287:863- 867.
16. Johnson RN, Baker JR. The alkaline reducing activity of glycated serum proteins and its relevance to diabetes mellitus. *Clin Chem.* 1986; 32:368-370.

ANEXOS

Tabla No. 1. Rendimiento de albúmina glicada después de la incubación con aspirina.

Concentración de aspirina.	Fructosamina (mmol/L) Tercer día.		Fructosamina (mmol/L) Quinto día.	
	n	Media ± DS	n	Media ± DS
Antiagregante plaquetaria.	3	7,89 ± 1,17	3	11,02 ± 0,27
Analgésica-antipirética.	3	7,11 ± 1,22	3	9,42 ± 0,25
Antiinflamatoria.	3	3,11 ± 0,81	3	6,0 ± 0,28
Control.	3	8,02 ± 0,99	3	11,65 ± 1,06

Tabla No. 2. Rendimiento de albúmina glicada después de su preincubación con aspirina.

Concentración de aspirina.	Fructosamina (mmol/L) Tercer día.		Fructosamina (mmol/L) Quinto día.	
	n	Media ± DS	n	Media ± DS
Antiagregante plaquetaria.	3	4,95± 0,26	3	6,79 ± 0,53
Analgésica-antipirética.	3	4,00± 0,44	3	5,86 ± 0,69
Antiinflamatoria.	3	2,89± 0,60	3	4,30 ± 0,35
Control.	3	7,49 ± 0,43	3	10,51± 0,44

Tabla No. 3. Efecto de la aspirina sobre la albúmina previamente glicada.

Concentración de aspirina.	Fructosamina (mmol/L) Tercer día.		Fructosamina (mmol/L) Quinto día.	
	n	Media ± DS	n	Media ± DS
Antiagregante plaquetaria.	3	5,56 ± 0,14	3	5,89 ± 0,07
Analgésica-antipirética.	3	5,46 ± 0,13	3	5,91 ± 0,02
Antiinflamatoria.	3	5,56 ± 0,10	3	5,67 ± 0,08
Control.	5	5,64 ± 0,063	5	5,87 ± 0,51