

TRABAJO ORIGINAL

Determinación de mieloperoxidasa plasmática en niños y adolescentes con Diabetes tipo 1

Plasma myeloperoxidase measurement in children and adolescents with Type 1 Diabetes

Abregú AV.¹, Prado MM.¹, Carrizo TR.¹, Velarde MS.¹, Díaz EI.¹, Fonio MC.¹, Bazán MC.²

¹Cátedra de Práctica Profesional, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán,

²Servicio de Endocrinología Hospital del Niño Jesús (SIPROSA).

RESUMEN

Los eventos inflamatorios están implicados en todas las etapas de la evolución de la aterosclerosis, desde la disfunción endotelial hasta la formación del ateroma y su posterior ruptura.

La mieloperoxidasa (MPO), principal componente de los gránulos azurófilos de los leucocitos, presenta una actividad incrementada cuando se produce la activación leucocitaria, contribuyendo a la respuesta innata del huésped. La MPO está asociada a estrés oxidativo porque genera especies reactivas del oxígeno que alteran lípidos y proteínas, favoreciendo la aterogénesis.

Como los pacientes diabéticos presentan un riesgo incrementado de desarrollar enfermedad cardiovascular, el objetivo de este trabajo fue evaluar los niveles plasmáticos de MPO en niños con diabetes tipo 1 (DT1) sin evidencia clínica de enfermedad vascular. Se estudiaron 30 pacientes (15 M/15 F), edad promedio $11,8 \pm 2,1$ años y $3,9 \pm 3,2$ años de evolución de la diabetes, que fueron comparados con un grupo control de sexo, edad e índice de masa corporal semejantes. En ambos grupos se realizaron las siguientes determinaciones: glucemia en ayunas, HbA1c, recuento de leucocitos, fibrinógeno, uPCR y MPO plasmática.

En los pacientes diabéticos se encontraron niveles aumentados de uPCR, comparados con el grupo control ($1,9 \pm 1,8$ mg/l vs. $0,6 \pm 0,5$ mg/l, $p = 0,01$). Por el contrario, los valores de leucocitos, fibrinógeno y MPO no mostraron diferencias significativas entre ambos grupos [6700 ± 1600 /ul vs. 7000 ± 850 /ul ($p = 0,55$); 261 ± 65 mg/dl vs. 252 ± 21 mg/dl ($p = 0,65$) y $1,23 \pm 0,29$ uUI/ml vs. $1,18 \pm 0,19$ uUI/ml, ($p = 0,71$) respectivamente]. La MPO no se correlacionó con los otros marcadores de inflamación estudiados ni con el tiempo de evolución de la enfermedad.

Estos primeros resultados sugieren que la determinación de MPO no fue sensible para detectar un estado proinflamatorio, como lo es la uPCR, en niños y adolescentes con DT1 sin complicaciones vasculares. **Rev Argent Endocrinol Metab 48: 3-7, 2011**

Los autores declaran no poseer conflictos de interés.

Palabras clave: mieloperoxidasa - diabetes - inflamación - aterosclerosis

ABSTRACT

Inflammatory events are implicated in all steps of atherosclerosis evolution, from endothelial dysfunction to plaque formation and its posterior rupture

Myeloperoxidase (MPO), a main component of the leukocytes azurophilic granules, presents an increased activity when a leucocyte activation occurs, contributing to innate immunity. MPO is associated with oxidative stress because it generates reactive oxygen species that alters lipid and proteins, favoring atherogenesis.

As diabetic patients present an increased risk of developing cardiovascular disease, the objective of this paper was to evaluate plasma MPO levels in children with type 1 diabetes without clinic evidence of vascular disease. Thirty patients (15 M/15 F), mean age and duration of diabetes 11.8 ± 2.1 and 3.9 ± 3.2 years respectively, were studied, and compared with a sex-, age- and body mass index-matched controls. In both groups the

laboratory parameters evaluated were: WBC count, fasting blood glucose, glycosylated hemoglobin (HbA1c), plasma fibrinogen, high sensitivity PCR (uPCR) and plasma MPO.

Increased levels of uPCR were found in diabetic patients as compared to the control group (1.9 ± 1.8 mg/l vs. 0.6 ± 0.5 mg/l, $p = 0.01$). No significant differences were found in leukocytes, fibrinogen and MPO values between both groups [6700 ± 1600 /ul vs. 7000 ± 850 /ul ($p = 0.55$); 261 ± 65 mg/dl vs. 252 ± 21 mg/dl ($p = 0.65$) and 1.23 ± 0.29 uUI/ml vs. 1.18 ± 0.19 uUI/ml ($p = 0.71$)] respectively. There was no correlation of MPO with other inflammation markers, or with the time of evolution of the disease.

These first results suggest that MPO determination was not sensitive to detect a proinflammatory state, as it is uPCR is, in children and adolescents with DT1, without vascular complications. **Rev Argent Endocrinol Metab 48: 3-7, 2011**

No financial conflicts of interests exist.

Key words: myeloperoxidase - diabetes - inflammation - atherosclerosis

INTRODUCCIÓN

La mieloperoxidasa (MPO) es un miembro de la superfamilia de las hemoperoxidasas, que se encuentra en los gránulos azurófilos de leucocitos (neutrófilos y monocitos) y de macrófagos titulares. Esta enzima es parte del sistema de defensa de los leucocitos y es la responsable de la acción microbicida contra un amplio espectro de organismos contribuyendo a la inmunidad innata⁽¹⁾. Además, las evidencias indican que la actividad de la MPO participa en numerosas enfermedades inflamatorias crónicas⁽²⁾.

La MPO es capaz de generar especies reactivas del oxígeno que modifican lípidos y proteínas y parece contribuir a la aterogénesis. En efecto, estudios recientes han demostrado que la exposición de lipoproteínas de baja densidad (LDL) a monocitos activados produce, a través de la MPO, especies nitrogenadas y halogenadas que facilitan la peroxidación lipídica, la nitración proteica y la conversión a formas más aterogénicas de LDL en las paredes de los vasos. Esta enzima también participa en la generación de lipoproteínas de alta densidad (HDL) disfuncionales, transformando sus propiedades antiinflamatorias en proinflamatorias^(3,4).

Por otro lado, la MPO consume el óxido nítrico (NO) derivado del endotelio, reduciendo su bio-disponibilidad y disminuyendo sus propiedades vasodilatadores y antiinflamatorias. De este modo, contribuye a la disfunción endotelial, primera etapa del proceso aterosclerótico^(5,6). Es por esto que esta molécula ha emergido como un potencial participante en la fisiopatología de la aterosclerosis.

La diabetes es una patología asociada a un mayor riesgo de enfermedad vascular prematura y comparte con la aterosclerosis un fenómeno inflamatorio subclínico. La inflamación que tiene lugar durante la fase temprana de la diabetes, determina un incremento en los niveles séricos de citoquinas inflamatorias, promoviendo la síntesis

de reactantes de fase aguda como la proteína C reactiva y el fibrinógeno^(7,8). La presencia de un estado proinflamatorio y de disfunción endotelial en niños y adolescentes con diabetes tipo 1 (DT1) se evidenció en estudios anteriores^(9,10).

Teniendo en cuenta estos antecedentes el objetivo de este trabajo fue estudiar los niveles plasmáticos de MPO en niños con DT1 sin evidencia clínica de enfermedad vascular y su relación con otros marcadores de inflamación como uPCR y fibrinógeno.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudiaron 30 pacientes con DT1, 15 mujeres y 15 varones, que concurren al Servicio de Endocrinología del Hospital del Niño Jesús de San Miguel de Tucumán (Argentina) en el período 2007-2008, con una edad promedio de $11,8 \pm 2,1$ años y un tiempo de evolución de la enfermedad de $3,9 \pm 3,2$ años, tratados con insulina corriente y NPH y que no presentaban retinopatía ni nefropatía. Dichos pacientes fueron comparados con un grupo control constituido por 20 individuos sanos, sin antecedentes familiares de diabetes, de sexo, edad e índice de masa corporal (IMC) semejantes. Todos los pacientes fueron sometidos a una evaluación clínica completa, consignando datos de peso, talla, IMC, tiempo de evolución de la enfermedad, presión arterial, examen cardiovascular con registro gráfico y antecedentes familiares de diabetes y/o enfermedad cardiovascular.

La ausencia de retinopatía fue confirmada por el Servicio de Oftalmología del Hospital, a través de un examen oftalmológico con estudio de fondo de ojo. La presencia de nefropatía fue descartada mediante la determinación de microalbuminuria por un método inmunturbidimétrico (DCA 2000, Siemens, EE.UU.). Ninguno de los niños incluidos en este estudio presentaba enfermedades inflamatorias o infecciosas al momento del estudio como

tampoco patologías hepáticas, renales agudas o crónicas, síndrome de mala absorción, hipotiroidismo u otra endocrinopatía.

A toda la población estudiada se le tomó una muestra de sangre venosa, previo ayuno de 8 h, que fue analizada en los Laboratorios de la Cátedra de Práctica Hospitalaria, de la Facultad de Bioquímica de la Universidad Nacional de Tucumán. Se realizaron las siguientes determinaciones: recuento de leucocitos (Beckman-Coulter AcT10); glucemia en ayunas (Método glucosa-oxidasa, Wiener Lab); hemoglobina glicosilada (HbA1c, DCA 2000, Siemens, EE.UU.); fibrinógeno plasmático (Método de Clauss, Diagnostica Stago, Francia); uPCR (Método de Quimioluminiscencia Inmunolite 2000, Siemens) y mieloperoxidasa plasmática (método ELISA, Binding Site Ltd, Inglaterra).

Los datos fueron analizados con el programa SPSS 9.0 para Windows y se expresaron como la media $\pm$ desviación estándar. El coeficiente de Pearson se utilizó para investigar las correlaciones entre las variables estudiadas. Un valor de $p < 0,05$ se consideró significativo.

El protocolo del presente trabajo fue aprobado por el Comité de Docencia e Investigación del Hospital del Niño Jesús. Además, los padres o responsables de cada niño firmaron un consentimiento escrito autorizando la participación de los mismos en este estudio.

RESULTADOS

En la tabla I se puede observar las características clínicas y el estado glucémico de los grupos estudiados. Cabe destacar que el 90 % de los niños diabéticos presentaron un pobre control glucémico (HbA1c > 8 %).

Cuando se evaluaron los marcadores de inflamación, se encontraron niveles aumentados de uPCR en los pacientes diabéticos, comparados con el grupo control ($1,9 \pm 1,8$ mg/l vs. $0,6 \pm 0,5$ mg/l, $p = 0,01$). Por el contrario, los valores de leucocitos, fibrinógeno y MPO no mostraron diferencias significativas entre ambos grupos [6700 ± 1600 /ul vs. 7000 ± 850 /ul ($p = 0,55$); 261 ± 65 mg/dl vs. 252 ± 21 mg/dl ($p = 0,65$) y $1,23 \pm 0,29$ uUI/ml vs. $1,18 \pm 0,19$ uUI/ml ($p = 0,71$)] respectivamente (Tabla II). Cuando se analizaron según el sexo, no se encontraron diferencias significativas en los parámetros evaluados en ambos grupos.

Al agrupar a los pacientes diabéticos según el tiempo de evolución de la enfermedad en: ≤ 3

TABLA I: Características clínicas y estado glucémico de los grupos estudiados

	DT1	Controles	p
n	30	20	-
Varones/Mujeres	15 / 15	13 / 7	-
Edad (años)	$11,8 \pm 2,1$	$12,3 \pm 2,5$	0,47
IMC (kg/m ²)	$19,2 \pm 5,8$	$18,6 \pm 1,1$	0,71
Evolución (años)	$3,9 \pm 3,2$	-	-
Glucemia (mg/dl)	218 ± 95	69 ± 6	0,0001
HbA1c (%)	$11,2 \pm 2,5$	$5,8 \pm 0,4$	0,0001

Los resultados se expresan como la media $\pm$ DS. Valor de p significativo $< 0,05$.

TABLA II: Marcadores de inflamación en los grupos estudiados

	DT1	Controles	p
Leucocitos (por ul)	6700 ± 1600	7000 ± 850	0,55
Fibrinógeno (mg/dl)	261 ± 65	252 ± 21	0,65
uPCR (mg/l)	$1,9 \pm 1,8$	$0,6 \pm 0,5$	0,01
MPO (uUI/ml)	$1,23 \pm 0,29$	$1,18 \pm 0,19$	0,71

Los resultados se expresan como la media $\pm$ DS. Valor de p significativo $< 0,05$.

años ($n = 15$) y $>$ de 3 años ($n = 15$), los valores de MPO tampoco se hallaron diferencias significativas.

La MPO no se correlacionó con el número de leucocitos, fibrinógeno, uPCR ni con el tiempo de evolución de la enfermedad (datos no mostrados).

DISCUSIÓN

La presencia de un estado inflamatorio subclínico y de disfunción endotelial en niños y adolescentes con DT1, ha sido demostrada mediante el hallazgo de niveles elevados de moléculas de adhesión como E-selectina, VCAM-1 y de uPCR⁽¹⁰⁻¹⁴⁾.

Recientemente se ha sugerido que la MPO podría estar involucrada en la disfunción endotelial, sin embargo los datos en niños y adolescentes diabéticos son escasos y controvertidos^(15,16). En el presente trabajo los valores plasmáticos de MPO en los niños diabéticos no fueron diferentes a los del grupo control. Por el contrario, Heilman y col. hallaron niveles elevados de MPO en una población infantojuvenil con características similares. En efecto, la población estudiada por estos autores fue semejante en el número de pacientes, la ausencia de complicaciones vasculares, un pobre control

glucémico y en la metodología empleada para medir MPO y estado glucémico. La edad de los diabéticos y el tiempo de evolución de la enfermedad fue ligeramente mayor que en el presente estudio. Además, Heilman y col., incluyó estudios de ultrasonido destinados a evaluar la rigidez y espesor arterial, pero los mismos no se correlacionaron con los valores de MPO. En coincidencia con nuestros resultados, tampoco encontraron correlación entre MPO y glucemia plasmática, HbA1c ni con la duración de la diabetes⁽¹⁷⁾. Del análisis de ambos estudios, no se logra explicar la controversia en los resultados de MPO obtenidos. Sería necesario un mayor número de estudios en DT1 para dilucidar estas diferencias.

Otros autores, no encontraron valores incrementados de MPO en diabéticos tipo 2 sin enfermedad coronaria, pero sí observaron un aumento en aquellos con eventos cardiovasculares previos^(18,19), siendo varios los estudios que enfatizan la importancia de la MPO en la enfermedad cardiovascular⁽²⁰⁻²²⁾.

Son diversas las moléculas implicadas en el proceso inflamatorio y algunas de ellas pueden ser utilizadas como marcadores. La PCR, un reconocido reactante de fase aguda, está asociada a disfunción endotelial y a un estado proinflamatorio^(23,24). En concordancia con datos previos, en el presente estudio se observó niveles elevados de uPCR en los pacientes diabéticos^(10,13,24-26). A diferencia de la uPCR, la MPO no resultó un biomarcador sensible y no se relacionó con las otras moléculas estudiadas.

La limitación del presente estudio es su diseño de corte transversal, sin embargo, no existen hasta el momento datos longitudinales sobre MPO en el grupo etario de DT1, de manera que este estudio puede servir como un razonable punto de partida para explorar este tema.

De los resultados obtenidos se concluye que la MPO plasmática no refleja un estado proinflamatorio ni de disfunción endotelial en niños y adolescentes con DT1 sin complicaciones vasculares. Sería importante evaluar el comportamiento de la MPO en la evolución de estos pacientes a través del tiempo, especialmente aquellos que desarrollen complicaciones cardiovasculares.

BIBLIOGRAFÍA

1. Michowitz Y, Kisil S, Guzner-Gur H, Rubinstein A, Wexler D, Sheps D, Keren G, George J. Usefulness of serum myeloperoxidase in prediction of mortality in patients with severe heart failure. *Isr Med Assoc J* 10: 884-8, 2008.
2. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leuk Biol* 77: 598-625, 2005.
3. Nicholls SJ, Hazen SL. Myeloperoxidase, modified lipoproteins and atherogenesis. *J Lipid Res* 50 (suppl): S346-51, 2009.
4. Vaisar T, Shao B, Green PS, Oda MN, Oram JF, Heinecke JW. Myeloperoxidase and inflammatory proteins: pathways for generating dysfunctional high-density lipoprotein in human. *Curr Atheroscler Rep* 9: 417-24, 2007.
5. Vita JA, Brennan ML, Gokce N, Mann SA, Goormastic M, Shishehbor MH, Penn MC, Keaney JF, Hazen SL. Serum myeloperoxidase levels independently predict endothelial dysfunction in humans. *Circulation* 110: 1134-9, 2004.
6. Loria V, Dato I, Graziani F, Biasucci ML. Myeloperoxidase: a new biomarker of inflammation in ischemic heart disease and acute coronary syndromes. *Mediators Inflamm* 2008: 135625, 2008 (online).
7. Basu S, Larsson A, Vessby B, Berne C. Type 1 diabetes is associated with increased cyclooxygenase and cytokine-mediated inflammation. *Diabetes Care* 28: 1371-5, 2005.
8. Hartge MM, Unger T, Kintscher U. The endothelium and vascular inflammation in diabetes. *Diabetes Vasc Dis Res* 4: 84-8, 2007.
9. Velarde MS, Carrizo TR, Prado MM, Díaz EI, Fonio MC, Bazán MC, Abregú AV. Marcadores de inflamación y disfunción endotelial en niños con diabetes tipo 1. *Medicina (B Aires)* 70: 44-8, 2010.
10. Piccirillo LJ, Goncalves M, Clemente E, Gomez MB. Marcadores de inflamação em pacientes com diabetes mellitus tipo 1. *Arq Bras Endocrinol Metab* 48:253-60, 2004.
11. Carrizo T, Prado M, Velarde M, Díaz E, Bazán M, Abregú AV. E-selectina soluble en una población infantojuvenil con diabetes tipo 1. *Medicina (B Aires)* 68: 193-7, 2008.
12. Glowinska-Olszewska B, Urban M, Peczyńska J, Floris B. Soluble adhesion molecules (sICAM 1, sVCAM 1) and selectins (sE selectin, sP selectin, sL selectin) levels in children and adolescents with obesity, hypertension and diabetes. *Metabolism* 54: 1020-6, 2005.
13. Coulon J, Willems D, Dorchy H. Increase in C reactive protein plasma level during diabetes in infants and young adults. *Presse Méd* 29: 89-93, 2005.
14. Dogruel N, Kirel B, Akgun Y, Us T. Serum soluble endothelial-cell specific adhesion molecules in children with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Pediatr Endocrinol Metab* 14: 287-93, 2001.
15. Zhang C, Patel R, Eiserich JP, Zhou F, Kelpke S, Ma W, Parks DA, Darley-Usmar V, White CR. Endothelial dysfunction is induced by proinflammatory oxidant hypochlorous acid. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H1469-75, 2001.
16. Abu-Soud HM, Hazen SL. Nitric Oxide is a physi-

- ological substrate for mammalian peroxidases. *J Biol Chem* 275: 37524-32, 2000.
17. **Heilman K, Zilmer M, Zilmer K, Lintrop M, Kampus P, Kals J, Tillman V.** Arterial stiffness, carotid artery intima-media thickness and plasma myeloperoxidase level in children with type 1 diabetes. *Diab Res Clin Pract* 84: 168-73, 2009.
 18. **Jornayvaz FR, Brulhart-Meynet MC, James RW.** Myeloperoxidase and paraoxonase-1 in type 2 diabetic patients. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 19: 613-9, 2009.
 19. **Wiersma JJ, Meuwese MC, van Miert JN, Kastelein A, Tijssen JG, Piek JJ, Trip MD.** Diabetes mellitus type 2 is associated with higher levels of myeloperoxidase. *Med Sci Monit.* 14: 406-10, 2008.
 20. **Zhang R, Brennan ML, Fu X, Aviles RJ, Pearce GL, Penn MS, Topol EJ, Sprecher DL, Hazen SL.** Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease. *JAMA* 286: 2136-42, 2001.
 21. **Brennan ML, Penn MS, Van Lente F, Nambi V, Shishehbor MH, Aviles RJ, Goormastic M, Pepoy ML, McErlean ES, Topol EJ, Nissen SE, Hazen SL.** Prognostic value of myeloperoxidase in patients with chest pain. *N Eng J Med* 349: 1595-1604, 2003.
 22. **Baldus S, Heeschen C, Meinertz T, Zeiher AM, Eiserich JP, Münzel T, Simoons ML, Hamm CW, CAPTURE Investigators.** Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 108: 1440-5, 2003.
 23. **Marcovecchio ML, Giannini C, Widmer B, Dalton RN, Martinotti S, Chiarelli F, Dunger DB.** C-reactive protein in relation to the development of microalbuminuria in type1 diabetes. *Diabetes Care* 31: 974-6, 2008.
 24. **Hayaishi-Okano R, Yamasaki Y, Katakami N, Ohtoshi K, Gorogawa S, Kuroda A, Matsuhisa M, Kosugi K, Nishikawa N, Kajimoto Y, Hori M.** Elevated C-reactive protein associates with early-stage carotid atherosclerosis in young subjects with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 25: 1432-8, 2002.
 25. **Mangge H, Schauenstein K, Stroedter L, Griesel A, Maerz W, Borkeisten M.** Low grade inflammation in juvenile obesity and type 1 diabetes associated with early signs of atherosclerosis. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 112: 378-82, 2004.
 26. **Romano M, Pomilio M, Vigneri S, Falco A, Chiesa PL, Chiarelli and Davì G.** Endothelial perturbation in children and adolescents with type 1 diabetes. Association with markers of the inflammatory reaction. *Diabetes Care* 24: 1674-8, 2001.