



## Artículo de revisión

# Daño a proteínas por estrés oxidante: Lipoproteína de baja densidad e insulina

Ivonne M Olivares-Corichi,\* Rafael Medina-Navarro,\*\*  
 Yessica D Torres-Ramos,\*\*\* Daniel H Montes-Cortés\*\*\*\*

- \* Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional, D.F. México.  
 \*\* Centro de Investigación Biomédica de Michoacán, Morelia Michoacán, México.  
 \*\*\* Departamento de Investigación en Bioquímica y Medicina Ambiental del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, D.F. México.  
 \*\*\*\* Instituto Mexicano del Seguro Social, Centro Médico Nacional "La Raza".

### Abreviaturas:

DOPA: Dihidroxifenilalanina.  
 ERO: Especies reactivas de oxígeno.  
 ERN: Especies reactivas de nitrógeno.  
 HO•: Radical libre hidroxilo.  
 LDL: Lipoproteína de baja densidad.  
 oxLDL: Lipoproteínas de baja densidad oxidadas.  
 RL: Radical libre.  
 RIA: Radioinmunoanálisis.

### Correspondencia:

Dra. Ivonne M. Olivares Corichi.  
 Escuela Superior de Medicina SEP.  
 Edificio 3, 3er piso. Plan de San Luis y Díaz Mirón. Casco de Santo Tomás, Delegación Miguel Hidalgo, 11340 México D.F.  
 Tel: 57296300 ext 62820  
 Fax: 57296300 ext 62794  
 E-mail: Imolivares@iner.gob.mx

Fecha de recepción: 16-Mayo-2006  
 Fecha de aceptación: 10-Diciembre-2006

### Resumen

Los radicales libres han cobrado gran importancia debido a que son la causa de diversas enfermedades en general. En años recientes, el síndrome metabólico ha sido asociado con la presencia de proteínas oxidadas, lo cual puede contribuir a explicar la pérdida de la función metabólica y daño tisular, bajo condiciones crónicas de estrés oxidante. Los radicales libres producen alteraciones en las lipoproteínas de baja densidad por oxidación, provocando reacciones citotóxicas en las células endoteliales, pérdida del reconocimiento por el receptor concomitante con la consecuente fagocitosis y acumulación de lipoproteínas modificadas en los macrófagos. La modificación por oxidación juega un importante papel en los eventos tempranos de la aterogénesis. Por otro lado, la insulina puede ser oxidada por los radicales libres, produciendo alteraciones químicas y cambios en su estructura y función. Dichos cambios pueden contribuir a daños degenerativos como el síndrome metabólico.

**Palabras clave:** Radical libre, oxidación de proteína, insulina, lipoproteína de baja densidad. Revista de Endocrinología y Nutrición 2006; 14(4): 237-240.

### Abstract

*Free radicals are considered to be great importance as the causes of many disorders in general. In recent years, the metabolic syndrome has been associated with the presence protein oxidation, which can contribute to explain the lost of metabolic function and tissue damage under chronic conditions of oxidative stress. The free radicals produce alterations on low density lipoprotein by oxidation, provoking cytotoxic reactions in the endothelial cell, lost of receptor recognition concomitant with the consequently fagocytosis and accumulation of modified low density lipoprotein in the macrophages. The oxidative modification plays an important role in the early events of atherogenesis. In the other hands, the insulin can be oxidated by free radicals, producing chemical alterations and changes on their structure and function. Such changes might contribute to degenerative diseases like metabolic syndrome.*

**Key words:** Free radical, protein oxidation, insulin, low density lipoprotein. Revista de Endocrinología y Nutrición 2006; 14(4): 237-240.

## INTRODUCCIÓN

El estrés oxidante está mediado por dos sistemas generadores de radicales libres (RL), las especies reactivas de oxígeno (ERO) y las especies reactivas de óxidos de nitrógeno (ERON). El concepto de estrés oxidante incluye tanto a los RL como a sus precursores, los cuales pueden provocar daño a las biomoléculas, como los lípidos, ácidos nucleicos, carbohidratos y proteínas.

En el caso de las proteínas, su oxidación es definida como la modificación covalente de las proteínas. Prácticamente todos los aminoácidos pueden servir como blanco del ataque por las especies reactivas, aunque algunos aminoácidos como la metionina, el triptófano, la fenilalanina, la tirosina, la cisteína, leucina, valina, lisina, arginina, prolina y la histidina son más susceptibles.<sup>1-5</sup> La modificación de las cadenas laterales de éstos, puede generar alteraciones directamente en la estructura y la función de las proteínas,<sup>6</sup> a la fragmentación química o al incremento en la susceptibilidad a proteólisis.

Se ha demostrado la participación del RL hidroxilo ( $\text{HO}\cdot$ ) en la hidroxilación de algunos residuos de tirosina y fenilalanina, formando derivados reducidos como es el caso del catecol 3,4- dihidroxifenilalanina (DOPA) unida a proteína que en presencia de metales de transición forma ortoquinona.<sup>7</sup> La formación de ditirosinas es resultado del ataque de los radicales hidroxilos a las tirosinas, y la nitración de éstas es resultado del daño por especies reac-

tivas de nitrógeno. Sin embargo, la cuantificación de los grupos carbonilos ha sido el biomarcador más utilizado para detectar daño a proteínas, debido a que la exposición de estos grupos es dada por la ruptura de enlaces covalentes y no covalentes entre los diferentes aminoácidos que forman la proteína.<sup>8</sup>

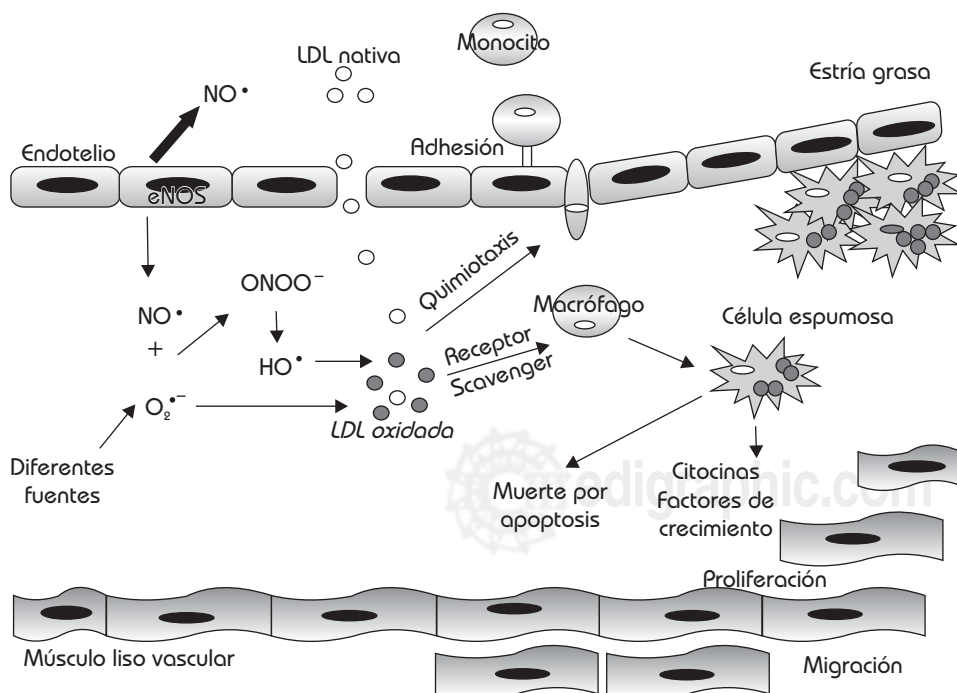
Las proteínas dañadas por estrés oxidante no deben ser consideradas como productos finales, ya que éstas son capaces de dañar otras biomoléculas.

Las proteínas también resultan sensibles al ataque por parte de los intermediarios o productos finales producidos por el daño de los radicales libres sobre los lípidos, como es el caso del 4 hidroxinonenal.<sup>9</sup> La histidina, la lisina y la cisteína resultan particularmente sensibles a este tipo de ataque.

## DAÑO A LIPOPROTEÍNAS DE BAJA DENSIDAD (LDL) POR ESTRÉS OXIDANTE

Las LDL son las principales moléculas del transporte de colesterol en plasma y pueden ser modificadas por el estrés oxidante.

Se ha pensado que una alta concentración de LDL tiene que ver con la formación de la placa de ateroma, sin embargo esto no está bien establecido, lo que sí se ha descrito, es que ella tiene que sufrir alteraciones para que pueda participar en la formación de la placa. Entre esas alteraciones, se encuentra la oxidación de esta misma.



**Figura 1.** Proceso de formación de la placa de ateroma. Las LDL oxidadas por diferentes fuentes son reconocidas por el receptor scavenger del macrófago, acumulándose dentro de él, formando la llamada célula espumosa y contribuyendo a la migración y proliferación de las células del músculo liso, la participación de más monocitos e iniciando la formación de la placa de ateroma.

Cuando las LDL son oxidadas (oxLDL), incluso mínimamente por la presencia de radicales libres o bien son glicadas de forma no enzimática, como ocurre cuando existen altas concentraciones de glucosa en sangre asociadas a la diabetes, aumentan su carga negativa y con ello se provoca su reconocimiento por receptores no regulables y relativamente inespecíficos como los scavengers de los macrófagos que están presentes en la íntima de las arterias (Figura 1).

Una vez dentro de los macrófagos, estas concentraciones del colesterol libre se hacen citotóxicas y ello llevaría a la lisis celular. El macrófago se defiende reesterificándolo con ácidos grasos por medio del enzima colesterol aciltransferasa, de modo que lo puede disolver junto con triglicéridos y fosfolípidos en vacuolas y así se transforma en las denominadas células espumosas (al microscopio semeja a células con burbujas en su citoplasma).<sup>10</sup>

Esta solución tiene un carácter temporal, finalmente se acaba provocando su lisis y la correspondiente salida de grasa desde la célula espumosa con formación de los característicos centros necróticos de las placas de ateroma.

Además, la LDL oxidada, por mecanismos todavía no aclarados, es un importante factor quimiotáctico para los monocitos circulantes. Por otro lado posee acción de reclutamiento, ya que impide que estos monocitos retornen a la circulación.

Este fenómeno no se produce con la LDL normal que sigue la ruta del receptor apoB/E porque cuando la concentración en el exterior de las células es muy alta, éstas se protegen inhibiendo la síntesis del receptor, con lo que no penetran las partículas al citoplasma.

Recientemente se ha implicado un nuevo receptor, el LOX-1<sup>11</sup> (receptor de oxLDL lecitinlike 1) que es diferente a los receptores scavenger de las células macrofágicas en el proceso de la aterogénesis y la influencia que en éste tienen la angiotensina II y sus antagonistas. Dicho receptor es responsable de la captación de LDL oxidadas por la célula endotelial. Su expresión está mediada por la activación del receptor de la angiotensina II (AT1), como lo muestra la inhibición en la progresión de la placa atero-

matosa con la administración de antagonistas de los receptores de angiotensina II.

### DAÑO A LA HORMONA INSULINA POR ESTRÉS OXIDANTE

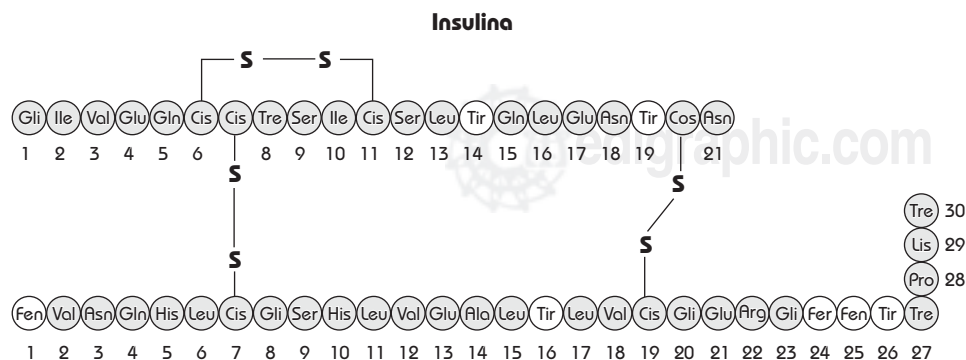
La insulina es una hormona peptídica, constituida por una cadena alfa de 21 aminoácidos y una beta con 30 aminoácidos, unidas por 2 enlaces: disulfuro y la cadena alfa plegada por otro enlace. De los 51 aminoácidos que la componen, se puede decir que 28 residuos son susceptibles a daño por las especies reactivas, de acuerdo a la literatura.

Se ha demostrado que al exponer a la insulina a los radicales HO•:

- a) Las cadenas laterales de las 3 moléculas de fenilalanina de la cadena B se hidroxilan y se convierten en tirosinas, probablemente como ortotirosinas, metatirosinas o paratirosinas (Figura 2).
- b) Las 2 tirosinas presentes en la cadena B, así como las 2 en la cadena A de la insulina e incluyendo las formadas por la hidroxilación de las fenilalaninas presentan una hidroxilación adicional, dando lugar a la formación de grupos 3,4-dihidroxifenilalaninas que en presencia de cobre, forman ortoquinonas (Figura 2).
- c) Las tirosinas hidroxiladas también pueden formar ditirosinas, y
- d) Hay exposición de grupos carbonilos.<sup>12</sup>

Los hallazgos constituyen una evidencia sólida de los cambios químicos y estructurales de la insulina, que dieron como consecuencia la pérdida de su función biológica, esto último fue demostrado por medio de la utilización del tejido adiposo humano como tejido blanco de la actividad hormonal de la insulina.

El tejido adiposo humano, en presencia de insulina oxidada no utiliza la glucosa con la misma eficiencia que con la insulina nativa.



**Figura 2.** Insulina. Los aminoácidos en círculos vacíos son los susceptibles a hidroxilación por el radical HO•.

Los cambios estructurales de la insulina fueron tan evidentes que permitieron demostrar por medio del radioinmunoanálisis (RIA) modificaciones en los epitopos de la molécula. Este ensayo es el mismo que se utiliza para cuantificar insulina en los laboratorios clínicos.<sup>12</sup>

La cuantificación de insulina por RIA, es un aspecto que invita a la reflexión, ya que las concentraciones de insulina de un paciente diabético, posiblemente sean diferentes a las reportadas por el laboratorio.

Se puede decir que de los 28 residuos de los aminoácidos susceptibles a daño por las ERO en la insulina, en este trabajo se confirmó que por lo menos 7 pueden ser modificados, esto puede significar una evidencia más en el conocimiento de la patología de la diabetes mellitus; si tomamos en cuenta que se ha reportado que la insulina glicada en sólo 3 aminoácidos ( $\epsilon$  amino de la lisina y los dos aminos terminales de la glicina y de la fenilalanina) disminuye su función en un 40%,<sup>13</sup> la suma de estos dos efectos de oxidación y glicación de la insulina, más la posibilidad de que la insulina forme aductos con productos de oxidación, aunado a la baja capacidad antioxidante del paciente diabético y el estrés oxidante agudo en el que permanece, debido en parte a que las proteínas glicadas forman radicales libres por autooxidación de la glucosa. Todas estas características de daño molecular pueden contribuir a las complicaciones del diabético, incluyendo a la aterosclerosis asociada, y a las disfunciones endotelial, vascular y neurovascular.<sup>14</sup> Se ha reportado que las complicaciones de la diabetes como la neuropatía y la retinopatía, están relacionadas con el estrés oxidante, lo que nos hace pensar que una mejor capacidad antioxidante del paciente diabético no sólo disminuiría las complicaciones, sino que la insulina no sería dañada y su función biológica sería eficiente.

Estos hallazgos demuestran que el estrés oxidante puede considerarse como un importante coadyuvante en la progresión y evolución de la diabetes mellitus y que debe ser cuidado junto con la alimentación.

#### BIBLIOGRAFÍA

1. Prakash M, Upadhyay S, Prabhu R. Protein thiol oxidation and lipid peroxidation in patients with uraemia. *Scand J Clin Lab Invest* 2004; 64(6): 599-604.
2. Silvester JA, Timmins GS, Davies MJ. Photodynamically generated bovine serum albumin radicals: evidence for damage transfer and oxidation at cysteine and tryptophan residues. *Free Radic Biol Med* 1998; 24(5): 754-766.
3. Stadtman ER. Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annu Rev Biochem* 1993; 62: 797-821.
4. Uchida K, Stadtman ER. Covalent attachment of 4-hydroxynonenal to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. A possible involvement of intra- and intermolecular cross-linking reaction. *J Biol Chem* 1993; 268(9): 6388-6393.
5. Vogt W. Oxidation of methionyl residues in proteins: Tools, targets, and reversal. *Free Radical Biol Med* 1995; 18: 93-105.
6. Ortega-Camarillo C, Guzmán-Grenfell AM, Hicks JJ. Oxidation of gonadotropin (PMSG) by oxygen free radicals alters its structure and hormonal activity. *Mol Reprod Dev* 1999; 52: 264-268.
7. Gieseg SP, Simpson JA, Chariton TS, Duncan MW, Dean RT. Protein-bound 3,4 dihydroxyphenylalanine is a major reductant formed during hydroxyl radical damage to proteins. *Biochemistry* 1993; 32(18): 4780-4786.
8. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta* 2003; 329(1-2): 23-38.
9. Bestervelt LL, Vaz AND, Coon MJ. Inactivation of ethanol-inducible cytochrome P450 and other microsomal P450 isoenzymes by trans-4-hydroxy-2-nonenal, a major product of membrane lipid peroxidation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(9): 3764-3768.
10. Steimberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol: modifications of low density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989; 320: 915-924.
11. Morawietz H, Rueckschloss U, Niemann B, Duerrschmidt N, Galle J, Hakim K, Zerkowski HR, Sawamura T, Holtz J. Angiotensin II induces LOX-1, the human endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Circulation* 1999; 100: 899-902.
12. Olivares-Corichi IM, Ceballos G, Ortega-Camarillo C, Guzmán-Grenfell AM, Hicks JJ. Reactive oxygen species (ROS) induce chemical and structural changes on human insulin *in vitro*, including alterations in its immunoreactivity. *Frontiers in Bioscience* 2005; 10: 838-843.
13. Wolff SP, Dean RT. Glucose auto-oxidation and protein modification. The potential role of auto-oxidative glycosylation in diabetes. *Biochem J* 1987; 245(1): 243-250.
14. Pennathur S, Wagner JD, Leeuwenburgh C, Litwak KN, Heinicke JW. A hydroxyl radical-like species oxidizes cynomolgus monkey artery wall proteins in early diabetic vascular disease. *J Clin Invest* 2001; 107(7): 853-860.