

# Incremento de la actividad de mieloperoxidasa plasmática en pacientes con asma asociada a diabetes *mellitus* tipo 2. Indicador de mayor desequilibrio homeostático\*

MARTHA PATRICIA SIERRA VARGAS<sup>†</sup>  
REXY DEL SOCORRO MENDOZA ATENCIO<sup>§</sup>  
MARGARITA FERNÁNDEZ VEGA<sup>||</sup>  
MA. GUADALUPE FABIÁN SAN MIGUEL<sup>§</sup>  
JUAN JOSÉ HICKS GÓMEZ<sup>†</sup>

\* Apoyo CONACYT: 2004-0027.

<sup>†</sup> Departamento de Bioquímica y Medicina Ambiental, INER Ismael Cosío Villegas.

<sup>§</sup> Clínica de Síndrome Metabólico, INER Ismael Cosío Villegas.

<sup>||</sup> Urgencias, INER Ismael Cosío Villegas.

Trabajo recibido: 23-VIII-2006; aceptado: 27-IX-2006

## RESUMEN

**Antecedentes:** La actividad de mieloperoxidasa (MPO, EC 1.11.1.7) plasmática ha sido relacionada con diferentes enfermedades crónico-degenerativas, que tienen en común cursar con un proceso inflamatorio crónico, como son los casos de asma y diabetes mellitus. Durante el proceso inflamatorio se generan especies reactivas del oxígeno (ERO) incluyendo al ácido hipocloroso (HClO<sup>-</sup>) que es el producto de la MPO.

**Palabras clave:** MPO, asma, diabetes mellitus, estrés oxidante.

**Key words:** MPO, asthma, diabetes mellitus, oxidative stress.

**Objetivos:** Demostrar que el asma y la diabetes mellitus, que cursan con estrés oxidante, presentan una respuesta metabólica acumulativa que puede ser evaluada por el incremento de MPO como marcador de daño oxidante.

**Métodos:** La actividad de la enzima fue determinada en el plasma de un grupo control formado por 36 individuos clínicamente sanos y en tres grupos de pacientes: a) 13 asmáticos, b) 29 diabéticos y c) 6 con coexistencia de ambos padecimientos.

**Resultados:** En los pacientes con ambos padecimientos, la actividad de MPO se incrementó significativamente ( $65.1 \pm 11.2$  U\*;  $p < 0.05$ ). El grupo control presentó una actividad similar ( $37.6 \pm$

## ABSTRACT

**Background:** The activity of the enzyme myeloperoxidase (MPO, EC 1.11.1.7), in plasma has been related to several chronic-degenerative diseases such as asthma and diabetes mellitus which have in common a chronic inflammatory condition. Several reactive species of oxygen are generated during inflammation, including hypochlorous acid, which is a product of MPO.

**Objective:** To prove that asthma and diabetes mellitus, in which there is oxidative stress, present a cumulative metabolic response that can be measured by an increase of MPO, as a marker of oxidative damage.

**Methods:** The activity of MPO was measured in the plasma of a control group of 31 healthy volunteers and in three groups of patients: a) 13 asthmatics, b) 29 diabetics, c) 6 asthmatics and diabetics.

**Results:** In patients with both diseases, asthma and diabetes mellitus, there was a significant increase in the activity of the enzyme MPO ( $65.1 \pm 11.2$  U\*;  $p < 0.05$ ). The activity of MPO was similar in the control group ( $37.6 \pm 3.2$  U\*), the asthma group ( $35.9 \pm 5.2$  U\*) and the diabetics ( $32.6 \pm 3.3$  U\*).

**Conclusions:** The coexistence of asthma and diabetes mellitus, both chronic-degenerative diseases, in-

3.2 U\*) a la de los pacientes con asma ( $35.9 \pm 5.2$  U\*) y a los diabéticos ( $32.6 \pm 3.3$  U\*).

**Conclusiones:** Se demuestra que la coexistencia de dos padecimientos crónico-degenerativos incrementa la posibilidad de daño tisular debido a la generación de ERO, que supera a las defensas antioxidantes del organismo, incrementando el estrés oxidante con el consecuente daño tisular y desequilibrio homeostático.

\*U = U/mg de proteína.<sup>-1</sup>

## INTRODUCCIÓN

La mieloperoxidasa (MPO, EC 1.11.1.7) es una enzima que se almacena en los gránulos azurófilos de los leucocitos polimorfonucleares y es secretada al medio extracelular ante diversos estímulos nocivos; ejerce su actividad catalítica por medio de la formación del ácido hipocloroso (HClO<sup>-</sup>) que es un potente agente oxidante y halogenante de proteínas ejerciendo, entre otras, una actividad bactericida. Los ácidos hipocloroso e hipobromoso (HBrO<sup>-</sup>), generados por los neutrófilos y los eosinófilos, respectivamente, han sido relacionados con el daño tisular en el paciente asmático<sup>1,2</sup>; ambos representan, junto con el peróxido de hidrógeno y el peroxinitrito, a algunas de las especies reactivas del oxígeno (ERO)<sup>3</sup>.

Se ha demostrado la participación de la MPO en varias enfermedades pulmonares, como síndrome de insuficiencia respiratoria aguda<sup>4,5</sup>, bronconeumonía, asma<sup>6-8</sup>, fibrosis pulmonar idiopática<sup>9</sup> y enfermedad pulmonar obstructiva crónica<sup>10,11</sup>, en las que se ha constatado su presencia al analizar marcadores de estrés oxidante, que es la disfunción metabólica causada por el desequilibrio entre la generación de ERO que supera a los mecanismos antioxidantes del organismo, conduciendo a la predisposición de daño y alteración de la homeostasis intracelular<sup>3</sup>. La MPO ha sido cuantificada, en el lavado broncoalveolar y en el plasma, presentando una correlación directa con la presencia de otros marcadores de estrés oxidante.

Esta enzima, al estar relacionada con el estrés oxidante, participa en la etiología de otros padecimientos y alteraciones degenerativas, como es el caso del desarrollo de la aterosclerosis en la cual induce, por medio de la cloración de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), esteroides y residuos de tirosina de la Apo A; modificación que altera el

metabolismo de la lipoproteína y facilita, al ser metabolizada por el receptor depurador de los leucocitos y no por su receptor habitual, la formación de las células espumosas<sup>12-14</sup> que conduce a la estructuración de la placa de ateroma. Con base en estos hallazgos se ha propuesto que la MPO sea considerada como un marcador de riesgo de disfunción endotelial y cardiovascular<sup>15,16</sup>.

\*U = U/mg of protein

metabolismo de la lipoproteína y facilita, al ser metabolizada por el receptor depurador de los leucocitos y no por su receptor habitual, la formación de las células espumosas<sup>12-14</sup> que conduce a la estructuración de la placa de ateroma. Con base en estos hallazgos se ha propuesto que la MPO sea considerada como un marcador de riesgo de disfunción endotelial y cardiovascular<sup>15,16</sup>.

**Objetivo.** Determinar la actividad de la MPO plasmática en pacientes con asma o diabetes *mellitus*, comparando su catálisis enzimática con la de pacientes con asma asociada a diabetes *mellitus* tipo 2. Considerando que los dos padecimientos cursan de manera independiente con estrés oxidante, sería de esperar que presentaran una mayor actividad de MPO originando una mayor posibilidad de daño estructural y disfunción metabólica.

## MÉTODOS Y PACIENTES

Estudio prospectivo en el que se invitaron a participar, previa información y aceptación firmada de los participantes, a 79 pacientes de la Consulta Externa y de la Clínica de Síndrome Metabólico del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas (INER), de ambos géneros, de 35 a 65 años con los siguientes diagnósticos: 1) asma con un FEV<sub>1</sub> > a 60% del predicho, n = 13; 2) diabetes *mellitus* tipo 2 controlados, con hemoglobina glicada (HbA1c) < a 7.5%, n = 29; 3) asma y diabetes *mellitus* tipo 2 controlados con HbA1c < a 7.5% y FEV<sub>1</sub> > a 60% del predicho, n = 6. Se compararon contra un grupo control formado por 31 individuos clínicamente sanos. Los estudios de espirometría se realizaron en el Departamento de Fisiología Pulmonar del Instituto. El estudio fue aprobado por el Comité de Investigación del INER, y todos los procedimientos realizados se efectuaron en estricto apego a las recomen-

daciones que aparecen en la Declaración de Helsinki de 1975, así como con los lineamientos que dicta el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud en su Título Segundo, Capítulo I, Artículo 17, Categoría II.

### Obtención de las muestras

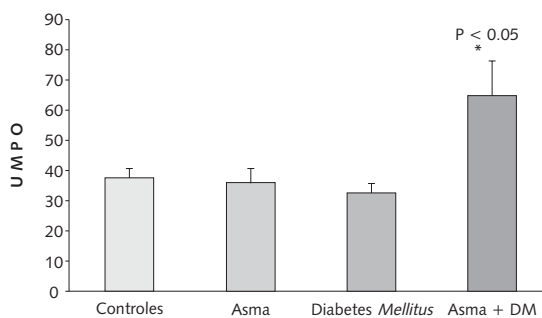
Se obtuvo una muestra de 10 mL sangre por venopunción. Se utilizó el equipo DCA 2000+ de Bayer® para la delimitación de la HbA1c. Para la determinación de la MPO se siguió el método de Andrews y Krinsky<sup>17</sup> con las siguientes modificaciones: se utilizaron 10  $\mu$ L de plasma con EDTA a los que se les agregó buffer de acetato-sacarosa 0.3 M con un pH de 5.4, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (sigma) 1.4 mM y peróxido de hidrógeno 0.3 mM concentración final; posterior a una incubación de 10 minutos a 37°C se agregó catalasa a una concentración final de 1,300 U/mL y ácido acético 0.2 M. La muestra se centrifugó a 3,000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se leyó en un espectrofotómetro marca Beckman Coulter DU 800 a una longitud de onda de 655 nm. Se definió una unidad de actividad de MPO como la cantidad de enzima necesaria para catalizar un incremento en la absorbencia de 0.1 a 655 nm por minuto a 25°C. La actividad específica de MPO se expresó en U/mg de proteína.<sup>-1</sup>

### RESULTADOS

En la Figura 1 se presenta la actividad de la MPO en los diferentes grupos de estudio. El grupo control (n = 31) presentó una actividad de  $37.6 \pm 3.2$  U/mg proteína<sup>-1</sup> que resultó similar a la obtenida en los pacientes asmáticos (n = 13)  $35.9 \pm 5.2$ , U/mg proteína<sup>-1</sup> y a los individuos con diabetes *mellitus* (n = 29)  $32.6 \pm 3.3$ . En los pacientes del grupo con la comorbilidad de asma y diabetes (n = 6) la actividad fue significativamente mayor  $65.1 \pm 11.2$  ( $p < 0.05$ ) comparado, tanto con el grupo control como con los grupos en los que los pacientes sólo presentaban una de las dos patologías.

### DISCUSIÓN

Recientemente, la MPO ha generado gran interés ya que se ha utilizado como biomarcador de



**Figura 1.** Actividad de mieloperoxidasa (MPO) en plasma de pacientes con asma asociada a diabetes *mellitus* tipo 2.

riesgo cardiovascular al estar relacionada con la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL), y con la lisis de placas de ateroma<sup>12,13</sup>. La actividad de la MPO se ejerce en las vacuolas intracelulares y alrededor del 10 al 15% de la MPO es liberada en el medio extracelular, pero cuando la reacción inflamatoria se exagera hay degranulación masiva provocando la muerte del neutrófilo con la consecuente liberación de MPO y otras enzimas proteolíticas. Este aporte masivo de enzimas hidrolíticas, al contacto con otras células, provoca daño local afectando fundamentalmente las células endoteliales y los fibroblastos, pudiendo acumularse en el espacio subendotelial y consumiéndose de forma catalítica el óxido nítrico derivado del endotelio, lo cual reduce la biodisponibilidad del mismo y por ende, altera sus funciones antiinflamatorias y de vasodilatación. El evento provoca un flujo de especies reactivas del oxígeno<sup>18,19</sup> que contribuyen al incremento del daño. Una vez liberada la MPO hacia el medio extracelular, como se presentó en los pacientes en que coexistían los dos padecimientos crónico-degenerativos (Figura 1), es de esperar que dada su elevada actividad en plasma pueda reaccionar, entre otros eventos, rápidamente con los aminoácidos de la albúmina, la ceruloplasmina o con las LDL causando la oxidación de las mismas, hecho que impide en cierta medida su actividad enzimática<sup>20</sup>, pero que permite la formación de colesterol clorado, aldehídos derivados de aminoácidos, de 3-clorotirosina y de ditirosina, los cuales se han utilizado como marcadores de daño

por estrés óxido-nitrosante<sup>21</sup>. La MPO también participa en la ruptura de la placa ateromatosa activando la metaloproteinasa matricial MMP-7<sup>22</sup>. En este trabajo demostramos que la actividad de la MPO puede ser útil como un biomarcador de daño sistémico y que la asociación de dos padecimientos crónico-degenerativos aumentan el estrés oxidante, por lo que sugerimos la utilización de agentes antioxidantes<sup>3</sup> como coadyuvantes del manejo médico de estos pacientes, lo cual nos permitirá tener mejores posibilidades terapéuticas.

## CONCLUSIONES

La actividad de MPO fue 45% mayor en los pacientes en los que coexistían ambos padecimientos cuando se compara con los individuos del grupo control o aquellos que presentan sólo diabetes *mellitus* o asma. Estos resultados son una evidencia más de que estos pacientes se encuentran cursando con un estrés oxidante severo, expresado por el aumento en la actividad de la MPO, implicando un mayor riesgo de daño a nivel del endotelio, agravando la evolución de ambos padecimientos.

Los datos presentados podrían incluirse en el cortejo de eventos que integran la hasta ahora poco considerada *neumopatía diabética*.

## REFERENCIAS

1. Wu W, Samoszuk MK, Comhair SA, et al. *Eosinophils generate brominating oxidants in allergen-induced asthma*. J Clin Invest 2000;105:1455-1463.
2. Hicks GJJ, Sierra VMP, Olivares-Corichi IM, Torres RJD, Guzmán-Grenfell AM. *Estrés oxidante en asma*. Rev Inst Nal Enf Resp Mex 2005;18:70-78.
3. Sierra VMP, Guzmán-Grenfell AM, Olivares-Corichi IM, Torres RJD, Hicks GJJ. *Participación de las especies reactivas del oxígeno (ERO) en las enfermedades pulmonares*. Rev Inst Nal Enf Resp Mex 2004;17:135-148.
4. Abul H, Abul A, Khan I, Mathew TC, Ayed A, Al-Athary E. *Levels of IL-8 and myeloperoxidase in the lungs of pneumonia patients*. Mol Cell Biochem 2001;217:107-112.
5. Mathy-Hartert M, Damas P, Nys M, et al. *Nitrated proteins in bronchoalveolar lavage fluid of patients at risk of ventilator-associated bronchopneumonia*. Eur Respir J 2000;16:296-301.
6. Barnes PJ. *Reactive oxygen species and airway inflammation*. Free Radic Biol Med 1990;9:235-243.
7. Nadeem A, Chhabra SK, Masood A, Raj HG. *Increased oxidative stress and altered levels of antioxidants in asthma*. J Allergy Clin Immunol 2003;111:72-78.
8. Monteseirin J, Bonilla I, Camacho J, Conde J, Sobrino F. *Elevated secretion of myeloperoxidase by neutrophils from asthmatic patients: the effect of immunotherapy*. J Allergy Clin Immunol 2001;107:623-626.
9. Cantin AM, North SL, Fells GA, Hubbard RC, Crystal RG. *Oxidant-mediated epithelial cell injury in idiopathic pulmonary fibrosis*. J Clin Invest 1987;79:1665-1673.
10. Ricciardolo FL, Caramori G, Ito K, et al. *Nitrosative stress in the bronchial mucosa of severe chronic obstructive pulmonary disease*. J Allergy Clin Immunol 2005;116:1028-1035.
11. Keatings VM, Barnes PJ. *Granulocyte activation markers in induced sputum: comparison between chronic obstructive pulmonary disease, asthma, and normal subjects*. Am J Respir Crit Care Med 1997;155:449-453.
12. Podrez EA, Abu-Soud HM, Hazen SL. *Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis*. Free Radic Biol Med 2000;28:1717-1725.
13. Carr AC, McCall MR, Frei B. *Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection*. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000;20:1716-1723.
14. Hazen SL, Heinecke JW. *3-Chlorotyrosine, a specific marker of myeloperoxidase-catalyzed oxidation, is markedly elevated in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic intima*. J Clin Invest 1997;99:2075-2081.
15. Vita JA, Brennan M-L, Gokce N, et al. *Serum myeloperoxidase levels independently predict endothelial dysfunction in humans*. Circulation 2004;110:1134-1139.
16. Baldus S, Heeschen C, Meinertz T, et al; and the CAPTURE Investigators. *Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes*. Circulation 2003;108:1440-1445.
17. Andrews PC, Krinsky NI. *Quantitative determination of myeloperoxidase using tetramethylbenzidine as substrate*. Anal Biochem 1982;127:346-350.
18. Eiserich JP, Baldus S, Brennan ML, et al. *Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular NO oxidase*. Science 2002;296:2391-2394.
19. Baldus S, Eiserich JP, Mani A, et al. *Endothelial transcytosis of myeloperoxidase confers specificity to vascular ECM proteins as targets of tyrosine nitration*. J Clin Invest 2001;108:1759-1770.
20. Carr AC, Myzak MC, Stocker R, McCall MR, Frei B. *Myeloperoxidase binds to low-density lipoprotein: potential implications for atherosclerosis*. FEBS Lett 2000;487:176-180.
21. Heinecke JW, Li W, Daehnke HL 3rd, Goldstein JA. *Dityrosine, a specific marker of oxidation, is synthesized by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide system of human neutrophils and macrophages*. J Biol Chem 1993;268:4069-4077.
22. Fu X, Kassim SY, Parks WC, Heinecke JW. *Hypochlorous acid oxygenates the cysteine switch domain*

*of pro-matrilysin (MMP-7). A mechanism for matrix metalloproteinase activation and atherosclerotic plaque rupture by myeloperoxidase. J Biol Chem 2001;276: 41279-41287.*

**Correspondencia:**

Dra. Martha Patricia Sierra Vargas  
Departamento de Bioquímica y

Medicina Ambiental, Unidad de Investigación. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas. Calzada de Tlalpan 4502, colonia Sección XVI. México, DF., 14080.  
Correo electrónico:  
jhicks@iner.gob.mx

