

300627

15
20

UNIVERSIDAD LA SALLE
ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

INCORPORADA A LA U.N.A.M.

**Productos Finales de Glicosilación
Avanzada y Diabetes Mellitus**

TESIS PROFESIONAL PARA
OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACEÚTICA BIÓLOGA

PRESENTA
LUZ CRISTINA PARRA NORIEGA

DIRECTOR DE TESIS
D.En C. José Domingo Méndez F.

1994

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicatoria

*** A mis padres y a mi hermano por su invaluable apoyo. La meta lograda es también suya.**

*** A un hombre muy especial, Agustín, por su amor y comprensión.**

*** A toda la familia Camargo Noriega por su valiosa ayuda en la realización de este trabajo.**

*** A Chivis, gracias nena, parte de este trabajo es también tuyo.**

*** Al Dr. José Domingo, a Lety, al Dr. Mariano y al profesor Calderón. Por sus consejos y ayuda, ¡Gracias!**

*** A dos personas muy queridas e inolvidables: mi abuelito y mi tía Charo.**

Indice

| | |
|--|------------------|
| OBJETIVOS | Página 1 |
| INTRODUCCIÓN | Página 2 |
| 1. DIABETES MELLITUS | Página 4 |
| 1.1 Principios Generales: | Página 4 |
| 1.1.1 Diagnóstico de la diabetes mellitus: | Página 5 |
| 1.1.2 Funcionamiento normal del Páncreas: | Página 6 |
| 1.2 Clasificación Clínica. | Página 8 |
| 1.2.1 Diabetes Mellitus Insulino Dependiente (DMID): | Página 8 |
| 1.2.2 Diabetes Mellitus No Insulino Dependiente (DMNID): | Página 10 |
| 1.2.3 Otros Tipos: | Página 11 |
| 1.2.3.1 Diabetes Mellitus Gestacional (GDM): | Página 11 |
| 1.2.3.2 Diabetes Mellitus Secundaria: | Página 11 |
| 1.3 Complicaciones Crónicas: | Página 11 |
| 1.3.1 Principios Generales: | Página 11 |
| 1.3.2 Retinopatía: | Página 13 |
| 1.3.3 Nefropatía: | Página 18 |
| Desórdenes del riñón: | Página 19 |
| Anormalidades Estructurales | Página 22 |
| 1.3.4 Neuropatía | Página 24 |
| 1.3.5 Problemas Cardiovasculares. | Página 32 |
| 2. PRODUCTOS FINALES DE GLICOSILACION AVANZADA: | Página 34 |
| 2.1 Principios Generales: | Página 34 |
| 2.1.1 Definición y reacción de formación de AGE's: | Página 34 |
| 2.1.2 Diferencia entre productos tempranos y finales de glicosilación avanzada. | Página 40 |
| 2.2 Receptor específico en macrófagos para AGE's. | Página 42 |
| 2.3 Consecuencias de la acumulación excesiva de AGE's en tejidos de pacientes diabéticos. | Página 43 |
| 2.4 Inhibición farmacológica de AGE's. | Página 47 |
| 2.5 Técnicas para medición y cuantificación de AGE's: | Página 48 |
| CONCLUSIONES | Página 51 |
| APENDICE | Página 52 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS | Página 56 |

OBJETIVOS

- > Revisar la literatura sobre los Productos Finales de Glicosilación Avanzada y su importancia en la Diabetes mellitus.**
- > Determinar la importancia de la glucosilación no enzimática de proteínas en el desarrollo de algunas de las complicaciones crónicas de la diabetes mellitus.**

INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus es un síndrome clínico que resulta de la ausencia absoluta o relativa de insulina. Este síndrome se caracteriza por profundas alteraciones en el metabolismo intermedio que afectan a lípidos, proteínas y carbohidratos.

Las manifestaciones clínicas clásicas de la diabetes mellitus son consecuencia de la hiperglucemia, mientras que las manifestaciones crónicas que afectan a la mayor parte de los pacientes son el resultado del metabolismo anormal tanto de la glucosa como de los lípidos y proteínas.

Los diabéticos presentan infarto agudo del miocardio y accidentes cerebrovasculares con el doble de frecuencia que los no diabéticos, y es 50 veces más probable que requieran la amputación de un miembro inferior gangrenado. En los mayores de 40 años, la primera causa de muerte es la enfermedad coronaria. La retinopatía diabética es la primera causa mundial de casos nuevos de pérdida de la visión entre los 20 y los 70 años de edad, y los diabéticos son más susceptibles al desarrollo del glaucoma y parálisis de los músculos extraoculares.

La nefropatía diabética se desarrolla en el 40% aproximadamente de los pacientes con diabetes mellitus insulino dependiente, y en un 5 a 10% en los diabéticos no insulino dependientes. La neuropatía periférica es una causa frecuente de incapacidad entre los diabéticos, suele pasar inadvertida hasta que se presente en lesiones secundarias que a menudo requieren amputación de miembros inferiores.

Los mecanismos celulares y bioquímicos que llevan a las complicaciones a largo plazo de la diabetes mellitus son pobremente entendidas. Tal es la evidencia que sostiene que la hiperglicemia es el mayor factor en el desarrollo de algunas complicaciones en pacientes con diabetes. La hiperglicemia crónica lleva a la acumulación de productos derivados de la glicosilación no enzimática de proteínas.

Estudios experimentales sugieren que los AGE's juegan un papel importante en las alteraciones funcionales y estructurales, las cuales ocurren en las proteínas durante el envejecimiento y la diabetes mellitus.

Uno de los problemas que han sido planteados es si la presencia de las proteínas glicosiladas y/o el potencial final de los productos con esta modificación estructural adicional pueden afectar la función celular normal, y también, si la acumulación de estos productos puede tener un papel importante en el desarrollo de algunas de las complicaciones crónicas de la diabetes.

En este trabajo se revisan los conocimientos actuales sobre la importancia clínica de la formación de los Productos Tempranos de Glicosilación Avanzada y su relación con las complicaciones crónicas de la Diabetes mellitus.

1. DIABETES MELLITUS

1.1 Principios Generales:

La diabetes (pasar a través) fue el término que dieron los griegos a las enfermedades caracterizadas por una producción abundante de orina. En el siglo XVIII se comprobó que en la mayor parte de los casos la orina de los diabéticos contenía azúcar; en consecuencia, esta clase de diabetes se llamó diabetes mellitus o sacarina para diferenciarla de la otra clase en la cual la poliuria no guarda relación con la glucosuria y la orina es insípida.

La diabetes depende de la falta de alguna función pancreática.

La diabetes mellitus es un síndrome clínico que resulta de la secreción deficiente de insulina. Esta puede ser absoluta o relativa, es decir, insuficiente en relación al aumento en la demanda de la hormona cuando su acción biológica es menor de lo normal.

La diabetes mellitus se considera como un síndrome de respuesta variable al tratamiento. Aunque el diagnóstico y la respuesta al tratamiento se establecen por los niveles de glucemia, el síndrome se caracteriza por profundas alteraciones en el metabolismo intermedio que afectan proteínas, lípidos y carbohidratos. (43)

Aunque en ausencia de un factor genético fácilmente medible, la presencia o ausencia de diabetes mellitus se puede considerar mediante la observación de los siguientes puntos: (47)

- a) *Hiperglucemia*: existe una anomalía en el metabolismo de los carbohidratos que resulta en hiperglucemia y que a menudo se asocia con catabolismo acelerado de grasas y proteínas. Esta anomalía probablemente contribuye a las otras manifestaciones pero no parece que sea la única causa.
- b) *Macroangiopatía*: existe aterosclerosis acelerada y calcificación de la capa media.

c) *Microangiopatía*: existe una anomalía en la membrana basal capilar caracterizada por engrosamiento y anomalía en la función. Estas lesiones capilares se suelen denominar concomitantes microvasculares de la diabetes.

d) *Neuropatía*: existen efectos sensoriales y motores periféricos, alteración en el sistema nervioso autónomo, desmielinización segmentaria y anomalías en las células de Schwann.

El nivel de glucosa sanguínea en las personas que presentan diabetes es anormalmente elevado (hiperglucemia), se excreta una gran cantidad de glucosa en la orina (glucosuria), además de la excreción de orina en grandes cantidades.

Las manifestaciones clínicas clásicas de la diabetes mellitus, la poliuria y la polidipsia, son consecuencia de la hiperglucemia, mientras que las manifestaciones crónicas que afectan a la mayor parte de los pacientes son el resultado del metabolismo anormal tanto de glucosa como de los lípidos y proteínas.

1.1.1 Diagnóstico de la diabetes mellitus:

El diagnóstico de la diabetes mellitus se establece cuando se cumple cualquiera de las siguientes tres condiciones: (46)

1. Síntomas clásicos de diabetes (poliuria, polidipsia, polifagia, pérdida rápida de peso y en algunos casos cetonuria) con una elevación franca de la concentración plasmática de glucosa.

2. Elevación de la concentración de glucosa en ayunas mayor de 140 mg/dl en plasma venoso o de 120 mg/dl en sangre venosa en más de una ocasión.

3. Glucemia en ayunas menor al nivel diagnóstico de diabetes pero con una elevación sostenida de la glucemia durante la curva de tolerancia oral a la glucosa (CTOG) en más de una ocasión.

En niños, los criterios diagnósticos son más estrictos, en este grupo el diagnóstico se establece cuando se cumple una de las siguientes condiciones:

1. Síntomas clásicos de diabetes con una elevación de la glucosa plasmática mayor de 200 mg/dl o de 180 mg/dl en sangre venosa.
2. En individuos asintomáticos se requiere de una concentración elevada de glucosa en ayunas así como de una elevación sostenida de la glucemia durante una CTOG en más de una ocasión.

1.1.2 Funcionamiento normal del Páncreas:

El páncreas es un órgano impar situado detrás de la extremidad inferior de estómago; tiene forma alargada transversalmente, y está constituido de un tejido de color amarillo rosáceo. Se le consideran tres partes: cabeza, cuerpo y cola. La extremidad derecha se considera la cabeza, es ensanchada y está engarzada en el arco del duodeno; la extremidad izquierda, es la cola, ésta es más delgada.

La cabeza del páncreas es atravesada por el canal colédoco que vierte la bilis al duodeno. A su vez, el páncreas vierte sus secreciones por un conducto que lo atraviesa y desemboca en el duodeno.

El páncreas se considera como una glándula de secreción mixta, porque presenta tanto función exócrina como función endócrina.

a) **Función exócrina:** la secreción externa del páncreas es un líquido acuoso y claro que contiene enzimas como tripsina, alfa-amilasa y fosfolipasa, que actúan sobre el duodeno, yeyuno y en menor cantidad en el íleon (53). En los seres humanos la síntesis de enzimas pancreáticas es de aproximadamente 10 gr. de proteína por día. El páncreas también secreta bicarbonato el cual neutraliza el contenido ácido que el estómago pasa al duodeno. Esta secreción lleva el pH a un valor de 6-7 en el duodeno, lo cual permite que las enzimas digestivas actúen con mayor eficacia.

b) **Función endócrina:** el papel endócrino del páncreas fue reconocido por vez primera en 1886 cuando Minkowski y Von Mering produjeron diabetes en perros pancreatomizados totalmente. El páncreas endócrino ejerce influencia sobre el metabolismo corporal a través de las acciones de la insulina y el glucagón.

La función endócrina del páncreas se lleva a cabo en los islotes de Langerhans, los cuales son considerados como pequeños órganos de secreción interna que poseen extensas redes capilares (19).

Existen tres clases de células insulares:

1. **Células alfa:** están esparcidas en los islotes pancreáticos, pero muestran tendencia general a formar pequeños grupos hacia la mitad de los mismos. Estas células parecen no modificarse al provocar diabetes artificialmente.

Estas células elaboran una hormona que tiene una acción antagónica en cuanto que aumenta la glucemia; es una hormona polipeptídica llamada **glucagón**.

2. **Células beta:** presentan aspecto variable, desde redondas hasta cristaloides.

Estas células elaboran una hormona llamada **insulina**, cuya acción manifiesta es la disminuir la concentración de glucosa en sangre. La insulina disminuye la glucemia al modificar el metabolismo de varios tejidos del cuerpo.

La producción de insulina por las células beta depende de las demandas de la concentración de glucosa en sangre sobre ellas mismas, es decir, las demandas fisiológicas estimulan la división de las células beta en individuos con potencial beta normal ya que las células beta son capaces de dividirse para mantener una población suficiente para satisfacer las necesidades de insulina en sujetos normales. (53)

3. **Células delta:** son células que por su estado funcional no se adaptan a alfa o a beta. Presentan gránulos menos densos y su función es la de secretar **somatostatina**, hormona hipotalámica que inhibe la liberación de hormona del crecimiento por las células somatotróficas de la adenohipófisis (46). Dado que la hormona del crecimiento tiene efectos notables sobre las células beta se postula que las células delta pueden tener un efecto pseudotrófico sobre las células beta. (46)

La insulina, que es secretada en respuesta a los altos niveles de glucosa en sangre (18), primeramente actúa estimulando a músculo, hígado y células adiposas a almacenar glucosa para usarla posteriormente en la síntesis de glucógeno, proteínas y grasas. El Glucagon, que es secretado en respuesta a bajos niveles de glucosa en sangre, tiene esencialmente efecto contrario: estimula al hígado a liberar glucosa mediante la glucogenólisis y la gluconeogénesis y estimula al tejido adiposo a liberar ácidos grasos a través de la lipólisis. La somatostatina que es secretada por el hipotálamo, inhibe la liberación de insulina y glucagon de sus respectivos islotes pancreáticos y es, por lo tanto que se piensa que tiene función parácrina sobre el páncreas. (46)

Las hormonas polipeptídicas, como otras hormonas destinadas por secreción, son sintetizadas ribosomalmente como prehormonas, procesadas en el retículo endoplasmático rugoso y en el Aparato de Golgi en hormonas maduras, y son empaquetadas en gránulos secretorios en espera de la señal de su liberación por exocitosis. El más potente estímulo fisiológico para la liberación de insulina y glucagon es, respectivamente, alto y bajo nivel de glucosa en sangre, ya que estos islotes actúan como sensores primarios de glucosa en el cuerpo. Sin embargo, la liberación de estas hormonas está influenciada por el sistema nervioso autónomo y por hormonas secretadas por el tracto gastrointestinal. (53)

1.2 Clasificación Clínica.

En los últimos años ha quedado claro que entre los diversos tipos no sólo existen diferencias clínicas sino también genéticas (23). Aunque en cada caso las diferencias genéticas interaccionan con factores ambientales para producir el cuadro clínico final, la importancia y naturaleza de cada factor ambiental varía según el riesgo genético. (43)

1.2.1 Diabetes Mellitus Insulino Dependiente (DMID):

Este tipo es también conocido como diabetes tipo I, diabetes juvenil, con tendencia a la cetoacidosis o inestable.

Tiene un comienzo brusco, hiperglucemia severa y rápida progresión hacia la cetoacidosis y muerte a menos de que sea tratada con insulina (43). Alrededor del 50% de estos pacientes son diagnosticados antes de los 21 años, con el pico de incidencia en torno a la pubertad. No se considera una enfermedad congénita aunque existen casos en niños menores de un año de edad.

Clinicamente los pacientes con este tipo de diabetes son delgados y después del tratamiento hay poca tendencia a la obesidad. (50)

En la separación de los diversos tipos de diabetes mellitus, han resultado muy útiles los estudios clínicos con gemelos monocigóticos. Utilizando el British Diabetes Association Registry, Pyke y col. lograron identificar más de 90 parejas en las cuales al menos uno de los gemelos padecía diabetes mellitus. Analizando la frecuencia de concordancia y discordancia se observó un fenómeno llamativo en relación a la edad. En casi todos los gemelos diagnosticados como diabéticos después de los 45 años había una concordancia completa para la diabetes para el otro gemelo dentro de los cuatro años siguientes; en contraste, sólo el 50% de los gemelos de aquellos diagnosticados antes de los 45 años desarrollaron diabetes mellitus clínica. Continuando el análisis se observó que los diagnosticados antes de la edad de 45 años fueron casi siempre casos de comienzo súbito, tratados con insulina; y aquellos diagnosticados después de los 45 años, fueron casi siempre de comienzo lento, no insulino dependientes. Estos datos indican que algún factor ambiental es importante en la DMID, mientras que los factores genéticos pueden ser suficientes para dar lugar a la diabetes de tipo adulto no insulino dependiente. Esto no quiere decir que todos los diabéticos del tipo no insulino dependiente tengan la misma anomalía genética y que todos los diabéticos insulino dependientes carezcan de un factor genético predisponente. (33)

Aunque los estudios con gemelos indican que debe existir una importante influencia ambiental en la patogenia de este síndrome, también hay una evidencia importante en favor de un factor

genético. Se ha demostrado que la DMID en caucásicos se asocia con antígenos HLA-D-8 (22) y BW-15 del sistema de histocompatibilidad. Otros genes que parecen estar involucrados son los del factor de necrosis tumoral (TNF) y los factores de la vía alterna del complemento. Probablemente la expresión coordinada de más de un gene es necesaria para conferir susceptibilidad a la DMID.

Ciertas enfermedades virales se han identificado como probables desencadenantes del proceso. Los mecanismos propuestos son la ruptura de las células con exposición de sus proteínas y la modificación del genoma que lleva a la expresión de antígenos anormales. Además, los virus inducen la aparición de moléculas HLA-D en la superficie de las células beta, lo que aumenta la presentación de antígenos a las células T. Entre los virus mejor identificados están el coxsackievirus B4, el citomegalovirus y virus de la rubéola. (22)

1.2.2 Diabetes Mellitus No Insulino Dependiente (DMNID):

Se le denomina también diabetes del adulto, resistente a la cetosis o estable.

Los pacientes pueden sobrevivir sin desarrollar cetoacidosis en ausencia del tratamiento con insulina; por lo general son personas obesas. Este tipo de diabetes tiene, por lo general, un comienzo lento y asintomático. Este tipo no se asocia a ningún antígeno HLA. (43)

La incidencia de DMNID es mayor entre los familiares de personas diagnosticadas en esta enfermedad que la que se observa entre los miembros de la familia de los pacientes con DMID. La idea prevalente es que se trate de una enfermedad multifactorial y poligénica con un gene dominante. (54)

La diabetes mellitus no insulino dependiente es una de las enfermedades crónicas más comunes, afectando al 1-5% de la población total. Son individuos de más de 45 años de edad. El número de casos de diabetes es 10 veces mayor que en aquellos con edad por debajo de los 45; esto

indica que la diabetes insulino dependiente es mucho menos frecuente. La incidencia de la DMNID es aproximadamente 25% más en mujeres que en varones. (23)

1.2.3 Otros Tipos:

1.2.3.1 Diabetes Mellitus Gestacional (GDM):

Algunas veces denominada intolerancia a la glucosa en el embarazo. Se presenta un metabolismo de glucosa anormal durante el embarazo. (39)

La aparición de la diabetes puede ocurrir inmediatamente después del nacimiento o varios años después. Sus características clínicas son iguales a las de la diabetes mellitus.

1.2.3.2 Diabetes Mellitus Secundaria:

Se le asocian varios factores, entre ellos están enfermedad pancreática, enfermedades hormonales, medicamentos y anomalías en el receptor de insulina (50). Sus características clínicas son similares a las de la diabetes mellitus insulino dependiente.

1.3 Complicaciones Crónicas:

1.3.1 Principios Generales:

La enfermedad metabólica más común es la diabetes mellitus. En los primeros decenios de este siglo, la alteración hidroelectrolítica y cetoacidótica aguda en el coma diabético se destacaba como causa frecuente de morbimortalidad, pero los adelantos en su manejo a partir del descubrimiento de la insulina, aunados a una mayor esperanza de vida, convirtieron a esta entidad en un importante factor de riesgo de enfermedad cardiovascular, renal, ocular y nervioso periférica,

conjunto de complicaciones crónicas que deterioran la calidad de vida e inciden en la mortalidad.
(34)

Los diabéticos presentan infarto agudo al miocardio y accidentes cerebro-vasculares con el doble de frecuencia que los no diabéticos, y es 50 veces más probable que requieran la amputación de un miembro inferior gangrenado. En los mayores de 40 años la primera causa de muerte es la enfermedad coronaria.

La pérdida de la visión es 25 veces más frecuente en los diabéticos, casi siempre como consecuencia de la retinopatía. Los diabéticos, además, desarrollan cataratas más tempranamente que los no diabéticos. Uno de cada 10 diabéticos que sobrevive después del diagnóstico, presenta pérdida incapacitante de la visión. La retinopatía diabética es la primera causa mundial de casos nuevos de pérdida de la visión entre los 20 y los 70 años de edad (15) y los diabéticos son más susceptibles al desarrollo del glaucoma y parálisis de los músculos extraoculares.

La nefropatía diabética se desarrolla en aproximadamente 40% de los pacientes con DMID en 20 años o más de duración y ocurre en 5 a 10% de los pacientes con DMNID. Su prevalencia general puede alcanzar el 14%. La frecuencia de enfermedades renales entre los diabéticos es 17 veces mayor que entre los no diabéticos y 50% de los diabéticos insulino dependientes muere de síndrome urémico en los 20 años siguientes al diagnóstico.

La neuropatía periférica es una causa frecuente de incapacidad entre los diabéticos y aunque se encuentra a menudo presente, en mayor o menor grado, desde unos cuantos años después de diagnosticada la diabetes, suele pasar inadvertida hasta que se desarrollan lesiones secundarias que requieren la amputación de miembros inferiores.

La presencia de complicaciones como las descritas no es exclusiva de una forma de diabetes mellitus, pues ocurren tanto en los dos grandes tipos de diabetes como en las diabetes secundarias. Sin embargo, la microangiopatía es más frecuente en la DMID, mientras que la

macroangiopatía lo es en la DMNID. La neuropatía se presenta indistintamente en cualquiera de los dos tipos. (43)

Sea por destrucción de las células beta o por problemas de receptores, la insuficiencia absoluta o relativa de insulina conduce a la hiperglucemia y ésta, a su vez, por la vía de los polioles, por la glucosilación no enzimática de proteínas, o por ambas, contribuye a las alteraciones de naturaleza estructural observadas en la micro y macroangiopatía, en la neuropatía y la queratopatía o cataratas. (18)

1.3.2 Retinopatía:

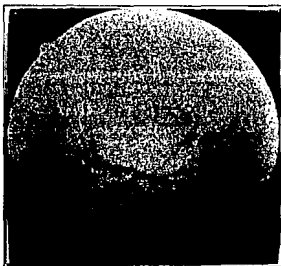


Fig. 1.1: Retina con neovascularización en papila y sobre superficie.

Los problemas de los ojos son probablemente los más terribles de todas las complicaciones conocidas de la diabetes. El temor casi siempre empieza poco tiempo después del diagnóstico. Una vez iniciado el tratamiento insulínico por primera vez, a algunas personas se les empaña u oscurece la vista (presbiopia). Esto no es raro, sin embargo, el pánico llega pensando que es ceguera diabética. En realidad, este empañamiento es causado por cambios de fluido en el ojo, y usualmente se desvanece dentro de unos pocos días o semanas. (47)

La retinopatía diabética sigue siendo la primera causa de ceguera en adultos en los países industrializados. Estando su desarrollo positivamente asociado con la duración de la enfermedad y con un pobre control glucémico, se propone que tan temida complicación pueda prevenirse, o al menos, retardarse su progresión, con estricto y adecuado control glucémico.

Al hablar de retinopatía se deben incluir , además de las alteraciones celulares y capilares, las anomalías neurosensoriales de la retina como tejido neural que es (52). Los estudios de electroretinografía señalan que existen anomalías neurosensitivas retinianas previas a los cambios microvasculares. (Fig. 1.1)

Se puede establecer una secuencia de alteraciones celulares y capilares en la retina de pacientes diabéticos, no necesariamente todas presentes ni en el mismo orden, que sería: (43)

a) *Alteración de la permeabilidad capilar retiniana*: a partir de estudios con fluorometría vítrea en pacientes diabéticos, se observó que existía una alteración de la permeabilidad vascular y que ésta precedía a las alteraciones celulares. La fluorometría vítrea consiste en inyectar una solución de fluoresceína sódica por vía intravenosa para luego detectarla en el humor vítreo (43). La presencia de fluoresceína en el humor vítreo se suponía era ocasionada por la apertura de las fuertes uniones endoteliales (*zonula ocludens*) de los capilares retinianos, o a partir de los capilares fenestrados de la circulación coroidea a través del epitelio pigmentario.

b) *Engrosamiento de la membrana basal*: las funciones de la membrana basal son dar rigidez estructural a los vasos sanguíneos y servir de barrera a moléculas de diferentes tamaños y cargas eléctricas.

El primer cambio estructural ocasionado por la hiperglucemia es el engrosamiento de la membrana basal. Es probable que la glucosilación no enzimática de proteínas y el acúmulo de sorbitol por activación de la enzima aldosa reductasa participen en este proceso (15) . En la membrana basal, los pacientes diabéticos, histológicamente se observan

vacuolizaciones y alteraciones en la cantidad de colágena que la componen; así como de otras macromoléculas como glucoproteínas y proteoglicanos.

c) *Disminución de pericitos y daño endotelial*: los pericitos son elementos contráctiles de la pared capilar. El tono ejercido por estas células puede regular la presión y el flujo sanguíneo; cuando este tono es bajo (por la disminución de los pericitos), la pared de los microvasos puede dilatarse, al menos focalmente, facilitando la formación de microaneurismas.

La pérdida de pericitos en pacientes diabéticos es detectable solamente en preparaciones histológicas de la microvasculatura retiniana, utilizando la técnica de Kuwabara y Cogan, (43) que consiste en fijar la retina con formaldehído y luego utilizar tripsina para digerir elementos neuronales y gliales, quedando sólo la red de vasos. En esta forma, se pueden contar los núcleos de pericitos y células endoteliales (en estado normal en proporción 1:1) y visualizar los "espacios fantasmas" que quedan luego de la desaparición de los pericitos.

El mecanismo por el cual disminuyen los pericitos es aun poco conocidos. Se ha propuesto que pueden ser lesionados osmóticamente por la acumulación de sorbitol, ya que se ha encontrado actividad de la aldosa reductasa en estas células. Otras anomalías metabólicas asociadas e implicadas son la reducida actividad de la bomba de Na-K-ATPasa y la disminución de mioinositol.

d) *Obliteraciones de capilares y arteriolas*: una de las lesiones más avanzada es aquella donde se encuentra pérdida completa de elementos celulares en los capilares retinianos. La secuencia que lleva a la total pérdida de células en la malla capilar y a la ausencia de su perfusión no está totalmente esclarecida.

Una clase de receptores localizados sobre la superficie de las células endoteliales juegan un papel importante en la regulación de los mecanismos de coagulación, y asociado a la reducida disponibilidad de oxígeno desde los eritrocitos, incremento de la agregabilidad plaquetaria, aumento en la viscosidad y dificultades en el flujo capilar por la mayor rigidez de los hematíes, conduce a la obliteración capilar. (17)

Las arteriolas terminales (arteriolas precapilares) suelen ser las que se ocluyen primero. Sin embargo, en estados avanzados de la enfermedad, se pueden ocluir arteriolas de mayor calibre, lo que causa más severa isquemia que el cierre de los capilares solamente e incrementa el riesgo de desarrollo de cambios proliferativos (neovasos y proliferación fibrogliosa).

e) *Microaneurismas*: los microaneurismas son dilataciones saculares, focales, observadas en el lecho capilar retiniano. Es el hallazgo oftalmoscópico que más temprano se detecta en la retinopatía diabética. (43)

Su tamaño oscila aproximadamente entre 12 y 100 micras pero solamente de los de más de 30 micras de diámetro pueden ser observados oftalmológicamente.

Pueden localizarse en áreas adyacentes a zonas sin perfusión capilar, por lo que se cree que representan una respuesta a la hipoxia tisular. Su formación se debe posiblemente a la disminución de pericitos, que llevan a un debilitamiento focal de la pared vascular.

Los microaneurismas se definen como competentes cuando no dejan escapar la fluoresceína o como incompetentes cuando la dejan escapar. Estos últimos ocasionan edema, exudación sérica, o ambos, por alteración de la permeabilidad.

f) *Hemorragias*: se observan con más frecuencia en el polo posterior y pueden tomar varias formas, según la profundidad en que se encuentren. Las que están más profundas, en las capas plexiforme externa y nuclear interna, son de aspecto puntiforme o en mancha y en las más superficiales son lineales, en astilla o llama. Estas últimas son las más frecuentes.

Las hemorragias se producen a partir de la ruptura de la pared de los microaneurismas, de capilares frágiles, o de ambos. Desde un punto de vista clínico, estas hemorragias son importantes marcadores de retinopatía diabética, su número y extensión guardan relación con la severidad de la retinopatía.

Las hemorragias tienden a desaparecer en un periodo de 6 semanas a 3 meses.

g) *Exudados*: los exudados denominados "duros" o "cereos" son acúmulos de lípidos que se localizan a nivel de la capa plexiforme externa. Se originan de escapes de plasma de vasos que presentan alteración de su permeabilidad (15). Cuando se observan exudados en el polo posterior, es casi seguro que existe edema macular.

Los depósitos de exudado "cereo" son fagocitados por macrófagos y resorbidos en un periodo de meses a años.

Los exudados que comprometen la mácula disminuyen en forma importante la visión central y aun después de su resorción la visión permanece pobre, debido al daño



Stage I — Nonproliferative



Stage II — Pre-proliferative



Stage III — Proliferative

Fig. 1.2 Etapas de retinopatía diabética.

Etapa 1: Ejemplo de retinopatía diabética muy temprana caracterizada por venas dilatadas y tortuosas así como microaneurismas.

Etapa 2: Los cambios patológicos incluyen múltiples venas dilatadas y tortuosas así como carnos capilares dilatadas. Se pueden apreciar múltiples hemorragias en forma de flama en presencia de exudados fuertes y cereos.

Etapa 3: La enfermedad avanzada es demostrada por el crecimiento del área neovascular, extendiéndose diagonalmente a través de la vena nasal-superior localizada a 1.5mm del disco óptico. Anormalidades microvasculares intrarretinianas se presenta cerca de área superior. Las venas se dilatan y doblan y aparecen áreas de exudados cereos en la retina.

ocasionado a nivel del epitelio pigmentario y de la retina sensorial.

h) *Anormalidades microvasculares intrarretinianas*: son capilares telangiectásicos que producen cortocircuitos entre arteriolas y vénulas. Son difíciles de distinguir de la neovascularización incipiente.

i) *Proliferación de vasos retinianos*: es el tipo más peligroso de retinopatía, consiste en la formación de nuevos vasos frágiles. Este proceso de formación de nuevos vasos es

llamado neovascularización. Cuando los nuevos vasos se forman en la retina, se dice que tiene proliferación retinopática. Las mayores hemorragias de estos frágiles vasos pueden causar la formación de pequeñas líneas oscuras.

Si las hemorragias son demasiado grandes y cubren un área sensitiva grande, pueden interferir en la visión. Pueden romper, a través del revestimiento retinal en el humor vítreo, decolorando este fluido y bloqueando así la visión. Con el potencial para hemorragia que tiene la retinopatía proliferativa, es el estado más amenazante y requiere de atención inmediata. (17)

Algunas de las pequeñas hemorragias pueden ser reabsorbidas, y dentro de días o semanas, la hemorragia del vítreo puede desaparecer porque el fluido del ojo es continuamente cambiado. Si los nuevos vasos se contraen y cicatrizan, la pérdida visual puede no llegar a empeorarse.

Ha sido estimado que en un 30% de los pacientes con retinopatía diabética proliferativa, la pérdida visual no necesariamente progresa, permanece estática o espontáneamente mejora. Fig 1.2

1.3.3 Nefropatía:

El tracto urinario consta de dos riñones, uno a cada lado de la columna vertebral. Unos conductos largos y delgados llamados uréteres transportan la orina desde los riñones hasta la vejiga, la cual es su depósito antes de ser eliminada.

Los riñones tienen la importante función de defender a la sangre de cualquier producto de desecho y de reclamar sustancias útiles para un uso posterior, esto es, recircular.

El tracto urinario a menudo se infecta en personas con diabetes, particularmente en casos de diabetes con una pobre regulación (43). En presencia de niveles de glucosa elevados en la sangre, los fagocitos son menos efectivos para la destrucción de bacterias; por tanto, los pacientes

diabéticos son más afectos a desarrollar infecciones en el tracto urinario que pueden desarrollarse y extenderse hasta los riñones causándoles daño.

Desórdenes del riñón:

La nefropatía es el desorden del riñón más serio de la diabetes. La palabra nefropatía se refiere a la combinación de cambios que son a menudo encontrados en los riñones de las personas con diabetes de larga duración. Estos cambios son:

- a) Infección.
- b) Esclerosis.
- c) Daño al glomérulo.

La nefropatía es la causa fundamental de la morbimortalidad de los pacientes insulino-dependientes que desarrollan insuficiencia renal crónica en un 40% luego de 10 a 30 años de iniciada la enfermedad. En el caso de los pacientes no insulino-dependientes, desarrollan enfermedad renal el 5 a 10%.

Iniciado el proceso de deterioro funcional, la disminución de la filtración glomerular es difícil de revertir, existiendo entonces un proceso inexorable hasta la insuficiencia renal terminal.

Para facilitar la comprensión de los cambios iniciales que se producen en la nefropatía diabética, se analizará como funciona un glomérulo normal.

El glomérulo está formado por la arteriola aferente, capilares glomerulares y arteriola eferente que componen el polo vascular. Este polo contacta con el polo urinario a través de la membrana basal glomerular (compuesta por células endoteliales, membrana basal y células epiteliales)(Cápsula de Bowman), también contacta con las células y la matriz mesangial sin mediar entre ellos la membrana basal o sea este contacto, entre el endotelio capilar y el mesangio es directo. (48)

A través del glomérulo, se realiza el proceso del ultrafiltrado, desde el polo vascular hacia el polo urinario. Existe también pasaje de macromoléculas desde el polo vascular hacia el mesangio.

Los factores que intervienen en el proceso del ultrafiltrado son: el flujo, las presiones hidrostática y oncótica capilar y las características estructurales de la membrana basal (superficie, tamaño de poros, cargas), cuya interrelación condiciona el coeficiente de ultrafiltración. El conjunto de estas fuerzas también determinará la presión de filtración. (43)

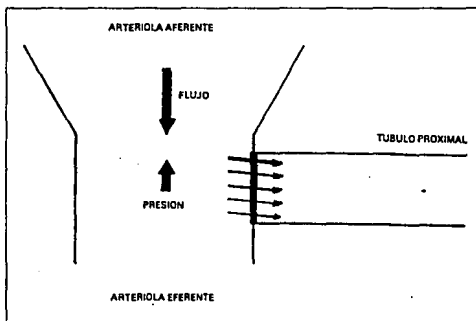


Fig. 1.3 Aumento de la presión intraglomerular por reducción de la resistencia arteriolar aferente y eferente, con predominio de la primera, en la etapa precoz de las alteraciones hemodinámicas en la diabetes.

Los factores antes mencionados influyen en el pasaje de las pequeñas cantidades de proteínas que filtran desde el polo vascular hacia el polo urinario en circunstancias normales. Los factores que intervienen en el pasaje de macromoléculas desde el polo vascular hacia el mesangio son menos conocidos, pero se sabe que son modificados por cambios metabólicos o hemodinámicos.

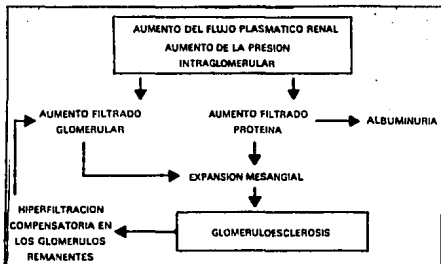


Fig. 1.4 Factores hemodinámicos en la patogenia de la nefropatía diabética.

El mesangio es un órgano que presenta receptores para gran cantidad de hormonas y sustancias vasoactivas, su relajación o contracción parecen influir sobre el coeficiente de ultrafiltración y, de esta forma, juega un papel central en muchas patologías.

En las primeras etapas, el riñón diabético presenta hipertrofia, hiperfiltrado y microalbuminuria intermitente (durante el mal control metabólico y el ejercicio físico intenso).

El aumento del tamaño bilateral del riñón es anterior a los cambios hemodinámicos y más difícil de revertir, aun con la administración de insulina. Este crecimiento se puede deber a alteraciones en los factores de crecimiento. La hipertrofia es un factor decisivo en el desarrollo de la glomerulosclerosis.

En esta etapa precoz, el aumento del filtrado glomerular puede llegar a un 40% y el flujo plasmático renal hasta 18% y aparece la microalbuminuria patológica por encima de 20 mg/día.

Se ha demostrado un aumento de la presión intraglomerular, como primera anomalía hemodinámica, que se produce por la reducción de la resistencia arteriolar aferente y eferente con predominio de la primera. En consecuencia la vasodilatación producida aumentará el flujo



Fig. 1.5 Microfotografías electrónicas de capilares renales de un sujeto normal (arriba) y un paciente diabético (abajo)

plasmático renal y la presión intraglomerular, expresándose este cambio en el aumento del filtrado glomerular. Fig 1.3

La función renal se deteriora lentamente. Al principio, proteínas que usualmente eran retenidas por el riñón empiezan a aparecer en la orina en cantidades mayores. Esto significa que el riñón no está filtrando adecuadamente. Esa proteína (albúmina) es desechada en la orina en cantidades que van aumentando. Mientras tanto, más de los productos de desecho son retenidos en la sangre, dando uremia. Al mismo tiempo, el agua es retenida, causando edema. La presión sanguínea llega a ser elevada y los clásicos signos de la uremia llegan a ser característicos.(Fig 1.4)

Anormalidades Estructurales

El tamaño de los riñones de la nefropatía diabética, es variable. Al comienzo, presentan aumento de volumen que puede persistir hasta el período clínico cuando los pacientes presentan síndrome nefrótico. El incremento de tamaño y peso se debe a la hipertrofia e hiperplasia celular y no a la acumulación de agua. Posteriormente, reducen su tamaño al alcanzar la etapa de riñón terminal. (35)

Las anomalías estructurales microscópicas se dividen en dos grupos: Lesiones glomerulares y lesiones tubulares.



Fig. 1.6 Lesiones difusas (arriba) y nodulares (abajo) de nefropatía diabética

a) *Lesiones glomerulares:* las primeras anomalías son engrosamiento difuso de la membrana basal capilar del glomérulo, aumento de la matriz y proliferación de las células mesangiales. Estas alteraciones son precoces y pueden aparecer varios años antes de la presentación de una microalbuminuria patológica. Fig 1.5

Al avanzar la evolución, aparecen ramificaciones del material de la membrana basal glomerular de las células endoteliales. Se presentan lesiones difusas que se muestran como acumulación de una sustancia amorfa en la pared del capilar glomerular y en el mesangio. Posteriormente, constituyen la forma nodular considerada patognomónica. Fig 1.6

El material de la membrana basal en la nefropatía diabética tiene una estructura similar a la normal, con algunas diferencias en los aminoácidos de las cadenas polipeptídicas, especialmente hidroxiprolina e hidroxilisina, y un aumento en las unidades de disacáridos por aumento de la actividad de la glucosiltransferasa y de la galactosiltransferasa. (36)

En la evolución de la nefropatía se pueden observar otras lesiones, como las exudativas, que se presentan en diabéticos que mantienen pobre control de la glucemia y se caracterizan por el depósito de un material hialinolipídico alrededor de los nódulos en

forma de casquete o gorro de fibrina. Las lesiones exudativas no son específicas y pueden

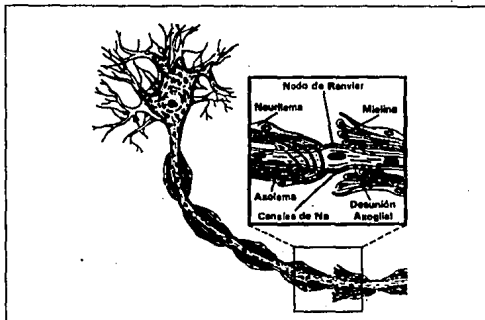


Fig 1.7 Desunión axonal y migración de los canales de sodio.

presentarse en la nefropatía lúpica, en la nefrosclerosis y en la glomerulonefritis.

También se puede presentar la gota capsular, un acúmulo de fibrina depositado en la cara interna de la cápsula de Bowman.

b) *Lesiones tubulares*: el depósito de glucógeno en las células tubulares, especialmente en el asa de Henle, constituye la nefrosis glucogénica descrita por Armani y Erstein y también se presenta en diabéticos con hiperglucemia persistente. Se observa el engosamiento de la membrana basal de los túbulos. A estas alteraciones se agrega la hialinosis de las arteriolas aferentes y eferentes y el depósito de inmunoglobulinas, especialmente IgG e IgM.

1.3.4 Neuropatía

Numerosos problemas relacionados con los nervios son denominados bajo el término de Neuropatía diabética o neuropatía. La lesión neurológica es la más frecuente y precoz de las

complicaciones degenerativas de la diabetes además de confusas, y son, a menudo, difíciles de diagnosticar con certeza (17). Casi cualquier vía nerviosa en cualquier parte del cuerpo puede ser afectada por neuropatía diabética. En ocasiones, la mayoría de las neuropatías son suaves e incómodas, pero también pueden ser imposibles y penosas. No obstante, la inhabilitación severa que algunas neuropatías pueden causar, casi nunca causan la muerte sin que otra complicación esté presente. (43)

La causa de la neuropatía no está completamente conocida, pero se han realizado varias teorías a lo largo de los años. Se acusa a insuficiencia nutricional o destrucción de los nervios, trombosis en los vasos sanguíneos, insuficiencia vitamínica y muchas otras razones.

Numerosos estudios histopatológicos, realizados en pacientes diabéticos, han demostrado la existencia de lesiones, tanto en el sistema nervioso periférico como en el autónomo.

Las lesiones han sido identificadas en las células de Schwann, en las células perineurales, en los axones y en los elementos vasculares endoneurales. Las modificaciones más características son: atrofia de las fibras largas y cortas de los axones mielinizados con evidencia de degeneración Walleriana, desmielinización segmentaria, fragmentación axonal, proliferación del tejido conectivo endoneural, así como engrosamiento y duplicación de la membrana basal de los capilares del endoneuro y perineuro. Las lesiones se acentúan cuanto más distal es el nervio.

El engrosamiento nodal, la desunión axoglial y la desmielinización nodal son posteriores a modificaciones funcionales, las que dependen fundamentalmente del aumento del sorbitol y de la disminución del contenido de mioinositol del nervio. Estos cambios se encuentran directamente ligados a la calidad del control de la hiperglucemia. (43) Fig 1.7

La pérdida de fibras y la atrofia axonal pueden producirse no sólo de las fibras mielinizadas grandes, sino también de las mielinizadas pequeñas y aun desmielinizadas.

La neuropatía diabética es consecuencia de diversos factores etiopatogénicos y fisiopatológicos. Es difícil definir cual es el factor que desencadena y perpetúa las alteraciones funcionales y anatómicas de la neuropatía diabética. (47)

En la producción de la neuropatía diabética, pueden participar una serie de acontecimientos con mayor o menor importancia. Inicialmente, los factores metabólicos pueden ser los causales de alteraciones funcionales y estructurales, especialmente las del nodo y paranodo. Al mismo tiempo, como consecuencia de la glucación no enzimática, se acentúan la desmielinización segmentaria y la modificación del transporte axoplásmico. Posteriormente, luego de transcurrido al-

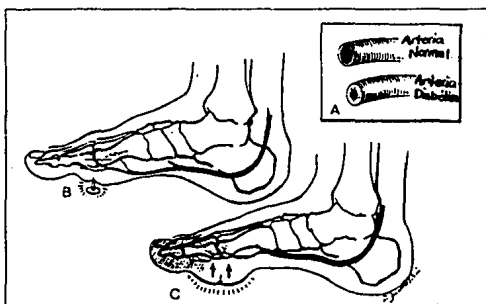


Fig 1.8 Complicaciones en el pie son causadas frecuentemente por la disminución del riego sanguíneo. (A) La adelgazada luz arterial de una persona con diabetes avanzada permite una menor circulación de la sangre que una arteria normal. (B) Una herida que causa inflamación requiere un mayor abastecimiento de sangre, lo que no ocurre. (C) El pie infectado se inflama, comprimiendo las arterias impidiendo aún más el abastecimiento de sangre.

gún tiempo de la enfermedad, la atrofia axonal que resulta de las lesiones isquémicas, anóxicas o ambas, puede dar a las lesiones nerviosas las características definitivas, que comprenden un amplio espectro de lesiones estructurales.



Fig. 1.9 Mononeuropatía diabética que produce parálisis del motor ocular externo

Las neuropatías son de dos categorías: Una es la sensorial o periférica, la cual afecta la sensación de control de nervios en los pies, manos y articulaciones; y la otra es la autonómica, la cual afecta la función de los nervios controlando varios órganos tales como el tracto digestivo o urinario.

a) *Neuropatía diabética sensorial o periférica*: los síntomas que presenta son entumecimiento, frío, hormigueo, una sensación de caminar sobre "lana" y dolor. Las extremidades (brazos y más a menudo piernas) son frecuentemente las más afectadas, pero ocasionalmente bandas que atraviesan el pecho y abdomen pueden ser afectadas. Estas sensaciones se presentan más a menudo en la noche, en frío, humedad, días lluviosos y en el invierno. La piel de los pies, piernas y muslos puede ser tan sensitiva que el peso de las sábanas puede ser intolerable. La incomodidad puede variar de suave a grave, de ocasional a constante. De hecho, los síntomas pueden cambiar en casi la pérdida completa de la sensación a dolor grave. Estos síntomas no respetan la edad ni el sexo; cualquier persona que padezca diabetes puede tener estas manifestaciones.

Un periodo de diabetes incontrolado, generalmente precede la aparición de síntomas. Algunas veces, el primer síntoma fuerte empieza después del inicio del tratamiento, pero más a menudo estos ocurren después de larga duración de diabetes (17). En ocasiones estos pueden empeorar

por un momento, quizá pocas semanas o meses. Afortunadamente, el dolor algunas veces disminuye con cuidados, y tratamientos prolongados de la diabetes.

Aunque la neuropatía periférica puede ocurrir cerca de cualquier nervio, algunos nervios son más afectados que otros. Las neuropatías sensoriales son las más comunes, pero los nervios que controlan los músculos pueden ser afectados también. Esto es más frecuente en los pies que en las manos, en este caso, cuando los síntomas incluyen pérdida de sensación pueden ocurrir problemas adicionales en los pies, que son el cambio en las líneas de fuerza del pie estableciéndose líneas de apoyo anormales. Desafortunadamente, la gente algunas veces falla para reconocer daños menores, ampollas y traumas; la hiperqueratosis es el siguiente paso y posteriormente se produce inflamación y ulceración, comenzando así el problema del pie diabético. Un tratamiento médico inmediato de las lesiones del pie por pequeñas que parezcan es importante para evitarlo.

Fig 1.8

La amiotrofia (desgaste del músculo) es una forma especial de neuropatía diabética. Esta combina sensibilidad extrema de la piel de los muslos, dolor y debilidad. Disminuye la masa del músculo, haciendo difícil para una persona levantarse de una silla o subir las escaleras. La pérdida de apetito y de peso corporal son comunes. Esta condición es tratada cuidadosamente por tratamiento de la diabetes y uso de medicación analgésica de los nervios. Un incremento de la actividad física puede restaurar los músculos a la condición previa.

Ocasionalmente un nervio solo que opera a un músculo o grupo de músculos es afectado. Este tipo de neuropatía puede causar doble visión si los músculos del ojo son afectados. Estos síntomas pueden continuar desde 3 a 6 semanas. La condición puede aparecer más de una vez en la misma persona, pero a menudo, diferentes músculos se ven involucrados. **Fig 1.9**

Un tipo de neuropatía menos común es el dolor radicular, el cual causa un encirculamiento o dolor tipo cinturón en el pecho o nervios del tronco. Este es agudo, punzante, ardoroso y ocasionalmente puede confundirse con angina. Por lo general desaparece gradualmente.

b) *Neuropatía diabética autonómica*: el sistema nervioso autónomo ha sido considerado tradicionalmente como un sistema eferente, que inerva la musculatura lisa y las vísceras huecas, así

como algunos tejidos de función exócrina y endócrina. Además de su importante participación aferente en la transmisión de la sensibilidad visceral.

Las lesiones del sistema nervioso autónomo se presentan en forma de modificaciones motoras, sensitivas y reflejas que repercuten sobre el sistema visceral. Es incorrecto clasificar los hallazgos como debidos a lesiones simpáticas o parasimpáticas, porque, en la gran mayoría de los casos, ambos sistemas se hallan involucrados. La aparición de la lesión autonómica puede constatararse en etapas muy precoces de la diabetes. (47)

Las formas sintomáticas, que se presentan en diabéticos con antigüedad de la enfermedad de más de 10 años, se caracterizan fundamentalmente por hipotensión postural, diarrea nocturna e impotencia sexual. En estos pacientes, la presencia de otros síndromes autonómicos demuestran la presencia de neuropatía autonómica florida.

Algunos de los daños son:

➤ Lesiones del sistema cardiovascular: la denervación total o parcial del sistema cardiovascular puede permanecer asintomática durante mucho tiempo. Se caracteriza por anorm

alidades de la

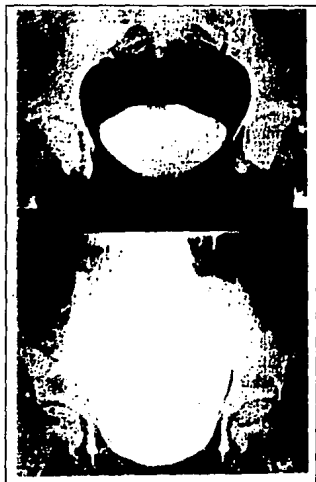


FIG. 1.10 Radiografías contrastadas. Arriba, vejiga normal y Abajo, vejiga neurogénica.

frecuencia cardíaca en respuesta a diferentes estímulos, hipotensión postural y falta de dolor durante el infarto de miocardio en pacientes diabéticos.

Las anomalías de la frecuencia cardíaca más frecuentes son la taquicardia del reposo y la ausencia de cambios en la frecuencia cardíaca en respuesta a estímulos.

La hipotensión ortostática es uno de los componentes más comunes del síndrome de disfunción autonómica en diabéticos. Se debe considerar la presencia de esta complicación cuando los pacientes se quejan de mareos, astenia, alteraciones visuales y hasta desmayos durante los cambios de posición. Estos síntomas se pueden encontrar exacerbados cuando se ingieren diuréticos, fenotiazinas o vasodilatadores.

El infarto silencioso se presenta en aproximadamente el 20% de los diabéticos, ya que presentan insuficiencia coronaria aguda.

➤ **Alteraciones de la sudoración:** Los trastornos de la sudoración se conocen con el nombre de anhidrosis diabética. Existe una intolerancia a las temperaturas elevadas, acompañada de hiperhidrosis de la mitad superior de cuerpo, en especial de cara, cuello, axilas y manos. Por el contrario, estos mismos pacientes no transpiran del ombligo hacia abajo.

El mecanismo de la sudoración es reflejo y su estímulo se inicia con el aumento de temperatura en la piel, de la sangre, o ambas, que es captado por las fibras simpáticas aferentes que terminan en el hipotálamo, el cual responde enviando impulsos a las astas laterales medulares, desde donde son enviados a las fibras simpáticas eferentes pre y postganglionares, las cuales son las afectadas. El síndrome debe ser considerado como una lesión de las fibras simpáticas eferentes del arco reflejo, que acompañan a los nervios periféricos.

➤ **Alteraciones gastrointestinales:** en los diabéticos, por lo general, las alteraciones gastrointestinales son asintomáticas. De las funciones del aparato digestivo, la más alterada es la motilidad, dando lugar a manifestaciones en los distintos segmentos del aparato digestivo.

En el estómago, las alteraciones producidas por la diabetes son especialmente de la motilidad y de la secreción gástrica, se caracterizan por la permanencia de la comida por más de 100 minutos en el estómago. Los niveles de glucemia pueden afectar a la motilidad gástrica, estando ésta deprimida cuando los niveles de glucemia son elevados.

Las alteraciones de la motilidad y evacuación del estómago casi siempre están asociadas con diarrea. Se trata, por lo general, de pacientes insulino dependientes, con dificultades para lograr un buen control metabólico, que presentan frecuentes episodios hipoglucémicos. (43) .Estos se deben a que los alimentos permanecen en el estómago y no pasan al intestino



Fig. 1.11 (Arriba) Arteriografía que muestra lesiones estenóticas y oclusivas en ambas femorales.

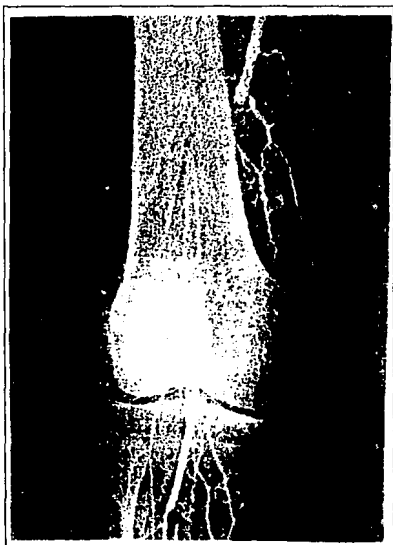


Fig. 1.12 Arteriografía que muestra oclusión segmentaria de la femoral en su tercio distal, con reconstitución de la poplítea a través de circulación colateral.

delgado para su absorción, haciendo difícil una adecuada coordinación entre la alimentación y la insulino terapia.

➤ Alteraciones urogenitales: la vejiga neurogénica se caracteriza por la pérdida de la sensación de repleción de la vejiga. El paciente puede estar asintomático o presentar infecciones urinarias repetidas o incontinencia, debido a rebasamiento vesical. Es necesario realizar una cuidadosa semiología de la micción con especial atención al ritmo miccional. (47)

La medición de la primera micción matinal constituye un dato de singular valor. Un valor mayor a 400 ml debe hacer sospechar de vejiga neurogénica y justifica realizar estudios complementarios. Fig 1.10

La frecuencia de disfunción sexual en hombres diabéticos es del 50%. La respuesta sexual masculina se desarrolla en etapas, que son reguladas por reflejos mediados a través de plexos simpáticos y parasimpáticos. La alteración más frecuente es la abolición o disminución de la erección, que impide la penetración vaginal.

La disfunción sexual más frecuente hallada en mujeres diabéticas es una disminución de la lubricación vaginal y del deseo sexual. (47)

1.3.5 Problemas Cardiovasculares.

El sistema cardiovascular incluye el corazón y los vasos sanguíneos. Las enfermedades de este sistema tienen muchos efectos en el cuerpo. El bloqueo de las arterias coronarias, las cuales proveen sangre al corazón pueden causar angina o un ataque cardíaco. Un bloqueo en la circulación hacia el cerebro puede causar un accidente cerebrovascular. Este accidente puede ser causado por coágulos construidos en los vasos sanguíneos. Un coágulo rompe un vaso sanguíneo y viaja al cerebro donde se deposita en un vaso más pequeño y lo bloquea dando una embolia. Un bloqueo

en los vasos sanguíneos que proveen la sangre a piernas y pies puede causar dolor cuando la persona camina alguna distancia.

Los cambios vasculares en los diabéticos, producen lesiones que involucran por igual arterias de gran, mediano y pequeño calibre, así como arteriolas y esto se encuentra íntimamente ligado con el tiempo de evolución de la enfermedad, ya que las alteraciones clínicas se hacen evidentes, por lo general, después de 10 años.

El aceptable control metabólico del paciente con diabetes mellitus, logrado gracias al empleo de la insulina, hipoglucemiantes orales y dietas adecuadas, ha hecho que, en las últimas décadas, la supervivencia de enfermos de este tipo se haya prolongado y, por tanto, se han ido observando, cada vez con mayor frecuencia, las complicaciones tardías de la metabopatía.

La aterosclerosis es una de las más frecuentes y afecta diversos grupos arteriales. Una de las áreas afectadas se localiza en la aorta terminal, vasos iliacos y distales de las extremidades inferiores. Como es conocido, la diabetes mellitus le confiere ciertas características especiales al desarrollo y progresión de la aterosclerosis, de tal manera que dichos cambios vasculares se observan a edades más tempranas, llegan a ser de localización más difusa y en territorios distales a la rodilla, involucrando por igual a hombres y mujeres. (43, 42)

Desde el punto de vista clínico, las manifestaciones relacionadas con la claudicación intermitente pueden aparecer a distancias largas, medianas o cortas y localizarse en la pantorrilla si la obstrucción parcial o total se encuentra en la femoral distal; poplítea o bifurcación del muslo si el problema está en la iliaca externa; o femoral común y a los glúteos cuando se originan a nivel de la aorta terminal y su bifurcación. Fig 1.11 y 1.12

2. PRODUCTOS FINALES DE GLICOSILACION AVANZADA:

2.1 Principios Generales:

Los mecanismos celulares y bioquímicos que llevan a las complicaciones a largo plazo de la diabetes mellitus son pobremente entendidas. Diversas evidencias clínicas indican que la aparición de las complicaciones crónicas en el diabético están relacionadas con el grado de control metabólico. La glucemia es el parámetro comúnmente empleado para valorar dicho control. (9)

La hiperglicemia es el mayor factor de desarrollo de algunas complicaciones en pacientes con diabetes. La hiperglicemia crónica lleva a la acumulación de productos derivados de la glicosilación no enzimática de proteínas o productos finales de glicosilación avanzada (AGE's).

2.1.1 Definición y reacción de formación de AGE's:

La glicosilación no enzimática de proteínas -glucación- es una reacción de condensación entre un glúcido reductor y a) el grupo épsilon amino de los residuos de lisina, b) el grupo alfa amino del N terminal de la cadena polipeptídica o c) los grupos amino de las bases de ácidos nucleicos.

En esta reacción no sólo participa la glucosa sino que también lo pueden hacer otros monosacáridos. En el primer caso, el proceso se denomina glicosilación no enzimática o glucación, en el segundo se emplea el término más general de glicosilación o glicación.

La reacción entre el grupo aldehído del monosacárido y el grupo amino de la proteína produce una aldimina inestable o Base de Schiff (fig 2.1). La velocidad a la cual se forma la base (K1) es casi igual a las de su disociación (-K1) por lo que su concentración aumenta en función de la glucosa, alcanzándose el equilibrio de la reacción en pocas horas.

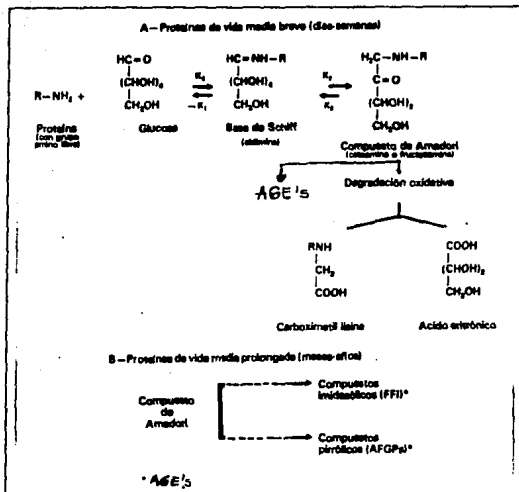


Fig. 2.1 Etapas Iniciales (A) y tardías (B) de la glucosilación no enzimática de las proteínas.

FFI: 2-furoil-4(5)-(2-furanil)-1-H-imidazol.

AFGP: 1-alkil-2-formil-3,4-diglicéol piroles.

La base de Schiff experimenta un reordenamiento intramolecular lento que la transforma en un compuesto más estable, una cetoamina, fructosamina o Compuesto de Amadori (fig 2.1). Esta transformación es una reacción reversible pero con el equilibrio, que se establece en aproximadamente 4 semanas, desplazado hacia la formación de un compuesto de Amadori ($K_2/K_1 = 8.4$). El establecimiento de este equilibrio es un indicador integrativo de los valores medios de glucemias ocurridos en periodos previos. El periodo será más o menos retrospectivo de acuerdo a la vida media de la proteína; por ejemplo 6-8 semanas para la hemoglobina ó 2-3 semanas para las fructosaminas del suero. (43)

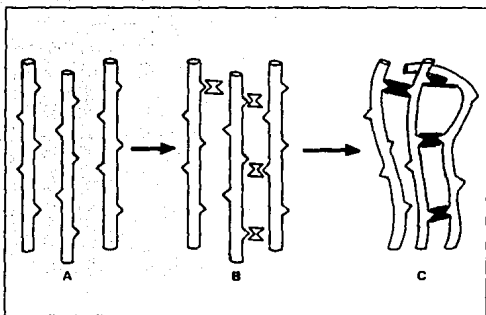


Fig. 2.2 Los compuestos de Amadori (B), producto de las etapas tempranas de la glucosilación, reaccionan entre sí produciendo puentes intercatenarios (C). Estos puentes modifican la estructura y función de la proteína original (A).

La concentración de estos productos iniciales de la glucación protéica (aldiminas y cetoaminas) varía en función de los cambios ocurridos en los niveles de glucemia, ascendiendo cuando hay hiperglucemia y descendiendo cuando hay hipoglucemia (20). La concentración de glucosa en el medio, el tiempo durante el cual permanece la proteína en dicha solución, la accesibilidad del grupo amino y su pK , son las determinantes del grado de la glucosilación no enzimática in vivo. Esta es la razón por la cual ciertas proteínas son glicadas con mayor intensidad y facilidad que otras y que ello ocurre preferentemente en determinadas regiones de su molécula.

El aumento de la concentración de glucosa determina un incremento proporcional en la velocidad de acumulación del compuesto de Amadori por una simple acción de masas. Este puede seguir luego tres caminos diferentes:

- a) Transformarse nuevamente en base de Schiff, proceso que ocurre a muy baja velocidad.
- b) Transformarse en productos finales de glicosilación avanzada (AGE's).
- c) Degradarse.

Este último ocurre por medio de una degradación oxidativa que lo transforma en ácido eritrónico y carboximetilisina. (fig 2.1). La identificación de estos dos productos en la orina sugiere que dicha degradación ocurre in vivo. Su existencia es importante porque sería un mecanismo de disminución de sustrato para la formación de AGE's.

La conversión del compuesto de Amadori en AGE's es un proceso que ocurre en proteínas estructurales, muy abundantes en el organismo y de vida media larga como actina, miosina, colágena, elastina y mielina. Involucra una secuencia de deshidrataciones y reacomodaciones moleculares que concluyen con la formación de productos frecuentemente pigmentados o fluorescentes que tienen la propiedad de establecer puentes intercatenarios o enlaces cruzados. (fig 2.2).

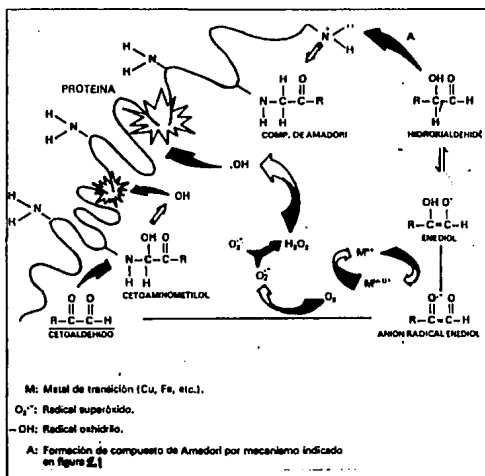


Fig. 2.3 Hipótesis de la glicosilación de una proteína (adaptado de Wolff y Dean, 1987) por autooxidación de la glucosa catalizada por metales. El cetaldéhidoo al reaccionar con un grupo amino- produce cetooaminometilol que se descompone originando un compuesto de Amadori y un radical hidroxilo. Los radicales superóxido e hidroxilo generados como intermediarios, pueden producir alteraciones macromoleculares.

Al revés de lo que ocurre con el producto de Amadori que está en equilibrio con la glucosa, los AGE's son compuestos estables y su formación es un proceso irreversible. En consecuencia, su contenido se mantiene elevado, aun cuando la glucemia descienda al rango normal, y continúa incrementándose a lo largo de la vida de la proteína.

El compuesto de Amadori puede experimentar numerosos reacomodamientos en su molécula, dando origen a diversos productos finales de glicosilación. Uno de ellos asemeja a un derivado heterocíclico del imidazol: el 2-furoil-4(5)-(2-furanil) 1-H imidazol (FFI) y resulta de la combinación de dos moléculas de compuesto de Amadori. Su color es amarillo-marrón, es fluorescente y se ha aislado de algunos tejidos mediante hidrólisis enzimática.

El otro AGE resulta de la combinación de una molécula de compuesto de Amadori y otra de uno de sus derivados: la 3-desoxiglucosona. Esta reacción da origen a un producto cíclico tipo pirrólico intermedio, que mediante sus grupos hidroxilo se combina con los grupos amino de otras moléculas. Se forman así distintos productos finales, uno de los cuales es el 1-alkil-2-formil-3,4-diglicosil pirroles (AFGP's), que unidos a la arginina-ribosalisina constituye un compuesto fluorescente llamado "pentosidina" o Producto Fluorescente 1 de Maillard.

La cinética de formación de los AGE's no ha sido completamente definida, pero ciertos indicios sugieren que su formación en función del tiempo es de tipo exponencial.

Wolff y Dean (43) sugirieron en 1987, que la glucosa al igual que los otros alfa-hidroxialdehidos es capaz de generar peróxido de hidrógeno, o radicales hidroxilo y cetoaldehidos, mediante un proceso de oxidación catalizada por metales de transición (glucooxidación). (fig 2.3). Los cetoaldehidos resultantes de esta oxidación se unen en forma covalente a las proteínas, contribuyendo de manera sustancial a su glicosilación, por lo menos in vitro. Los compuestos de Amadori formados se convertirán, si la proteína es de vida media larga, en AGE's.

La glucooxidación puede inhibirse mediante el empleo de diferentes agentes, entre ellos los quelantes (EDTA, DETAPAC) y antioxidantes como los tocoferoles (vitamina E) y el ácido ascórbico (vitamina C). La inhibición de la glucooxidación podría ser un recurso terapéutico eficaz en la prevención de factores que condicionan la aparición de las complicaciones crónicas de la diabetes.

El mecanismo por el cual los productos iniciales (cetoaminas y fructuosaminas) y los finales (AGE's) afectan las propiedades de las proteínas parece ser diferente. En el primer caso se trata de modificaciones de la carga eléctrica, solubilidad y movilidad, mientras que en el caso de los segundos se generan puentes que unen una cadena polipeptídica con otra, modificándose la estructura original de la proteína (fig 2.2).

Las alteraciones consecutivas a la glucosilación en proteínas estructurales son:

1. **Cristalino:** dado el lento proceso de recambio que experimentan las proteínas del cristalino, su glucación se acompaña de la producción de AGE's. Comienza así una opacificación similar a la que ocurre en la catarata diabética (15).

La opacidad del cristalino sería causada por la formación de agregados de proteínas generados por la aparición de los puentes intercatenarios.

2. **Colágena:** su prolongada vida media hace que esté expuesta a la glucosa por lapsos muy prolongados. La colágena glucada es mucho menos sensible a la degradación enzimática.

Este proceso ocurre tanto en el componente fibroso denso como en la laxa red de la membrana basal. La aparición ulterior de los AGE's, y la formación de puentes intercatenarios, especialmente a nivel de la membrana basal, modifican significativamente la flexibilidad, carga eléctrica y permeabilidad capilar. Esto explicaría, al menos en parte, la proteinuria y el aumento de la permeabilidad capilar, presentes en el diabético mal compensado. (49)

Los AGE's y los puentes intercatenarios producen grupos reactivos capaces de retener, condensar o formar uniones covalentes entre la colágena y componentes del plasma como la

albúmina, inmunoglobulinas y lipoproteínas. Las proteínas fijadas a la colágena por este mecanismo pueden luego formar complejos inmunes al unirse a sus respectivos anticuerpos; de esta manera la glucación proteica sería capaz de poner en marcha o perpetuar una lesión por injuria inmunológica. Este fenómeno explicaría el depósito de albúmina e IgG en la matriz microvascular de los pacientes diabéticos.

3. DNA: la glucación también afecta a los grupos amino del DNA con la consiguiente producción de AGE's y puentes intercatenarios modificando su comportamiento.

2.1.2 Diferencia entre productos tempranos y finales de glicosilación avanzada.

La glucosa forma químicamente productos tempranos de glicosilación con proteínas (base de Schiff), los cuales son reversibles en un rango proporcional a la concentración de glucosa. Estas bases de Schiff se rearreglan para tener una forma más estable y dar los productos tempranos de glicosilación tipo Amadori. Los niveles al equilibrio entre las bases de Schiff y los productos de Amadori son alcanzados en horas y semanas respectivamente (1,12), este equilibrio es químicamente reversible. La cantidad total de los productos tempranos de glicosilación incluso en proteínas de vida media larga alcanza el equilibrio en un periodo corto de tiempo.

La cantidad de productos tempranos de glicosilación ya sea en hemoglobina o en membrana basal aumenta cuando los niveles de glucosa en sangre son altos y regresa a la normalidad después que los niveles de glucosa son normalizados por tratamiento. Como estos productos tempranos de glicosilación no continúan acumulándose en colágena ni en otras proteínas estables durante los años de diabetes crónica; no es de extrañarse que su concentración no guarde correlación alguna con la presencia o la severidad de la retinopatía diabética. (51)

Sin embargo, algunos de los productos tempranos de glicosilación en colágena y otras proteínas de vida media larga de la pared capilar no se disocian. En vez de esto, éstos experimentan una lenta y compleja serie de rearreglos químicos para formar los productos finales de glicosilación avanzada irreversibles. Los niveles de estos productos no regresan a lo normal cuando la

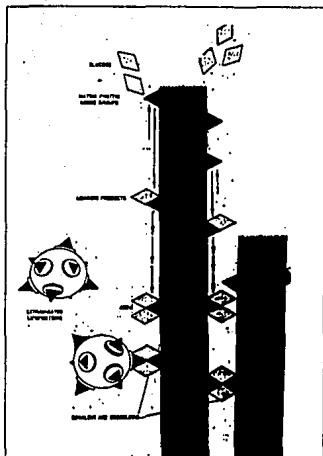


Fig 2.4 Formación de puentes intercatenarios en la matriz de proteínas debido a AGE's

hiperglicemia es corregida, en vez de esto, los AGE's se acumulan en las proteínas de la pared capilar conforme pasa el tiempo. Parte de estos productos finales irreversibles son capaces de formar enlaces covalentes con grupos amino de otras proteínas a través de reacciones de adición nucleofílica. (11,27)

La estructura química de un enlace cruzado intercatenario de una proteína fluorescente resultante de la formación de varios AGE's in vivo e in vitro revelan que la unión cruzada ocurre por medio de condensación heterocíclica de dos moléculas de glucosa y dos grupos amino-lisina-derivados. (fig 2.4). (24)

Debido a que los AGE's están irreversiblemente unidos a proteínas, se acumulan continuamente en las proteínas de vida media larga de las paredes capilares. El ritmo de esta acumulación es proporcional al nivel de glucosa en sangre durante el tiempo integral en largos periodos de tiempo. In vivo, un incremento lineal con respecto a la edad en la acumulación de AGE's ha sido demostrado en dura colágena (36) de la arteria coronaria y en membrana basal del glomérulo. Cantidades sustancialmente mayores han sido observadas en tejidos de pacientes con diabetes.

En contraste a la falta de correlación entre el grado de complicaciones diabéticas y los niveles de productos tempranos de glicosilación, una altamente significativa relación existe entre los niveles de AGE's acumulados en colágena y la severidad de las complicaciones. Esto es, debido a que los productos tempranos son reversibles y no se acumulan, y los productos finales son irreversibles y se acumulan en las proteínas. (38)

2.2 Receptor específico en macrófagos para AGE's.

Los monocitos/macrófagos tienen un importante papel en la regulación de la homeostasis de la matriz extracelular de proteínas y de células no diferenciadas.

Los monocitos/macrófagos poseen receptores específicos de alta afinidad que les permiten reconocer proteínas glicosiladas. Estos receptores reaccionan con los AGE's que aparecen en las proteínas tanto intra como extracelulares e incluso con aquellas localizadas en la membrana celular; por lo tanto, los monocitos/macrófagos pueden no sólo remover moléculas sino también células glicosiladas.

Este receptor reconoce específicamente proteínas enlazadas con AGE's, las proteínas que sólo tienen productos tempranos de glicosilación no son reconocidas. Así, este receptor permite al macrófago estimular preferentemente la remoción y reemplazo de macromoléculas envejecidas con enlaces cruzados y desnaturalizadas por largos periodos de exposición a la glucosa. (43)

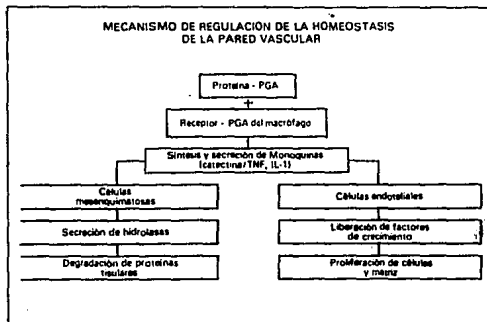


Fig. 15 Esquema de las reacciones desencadenadas a partir de la interacción de los AGEs con sus receptores celulares específicos. Las dos cascadas de reacciones conducen a procesos antagonistas. (Adaptado de Browsee y col.)

La unión de los AGE's con sus receptores desencadena una serie de reacciones (fig 2.5) que conducen a la formación de diversas sustancias, las que estimulan simultáneamente procesos de degradación y proliferación de células y matriz celular. Por lo tanto, el balance adecuado entre ambos procesos antagónicos asegura una correcta remodelación y reposición celular y tisular.

Las enzimas degradativas que remueven las proteínas con AGE's de las paredes vasculares no parece que sean secretadas por los mismos macrófagos. En cambio, la unión de la proteína que contiene AGE's con el receptor del macrófago induce a la síntesis y secreción de TNF e IL-1 a niveles mayores del valor normal (52). Estas monoquinas amplifican la señal original de remoción al estimular a las células no diferenciadas cercanas a sintetizar y liberar colagenasa y otras proteasas extracelulares. Simultáneamente, las mismas monoquinas estimulan la degradación de proteoglicanos de los tejidos.

La habilidad de los AGE's de estimular su propia degradación por macrófagos, es compensatorio para lograr un proceso de reemplazo bien coordinado, y bajo condiciones normales, la homeostasis de la pared vascular es mantenida.(fig 2.4)

El receptor de monocito/macrófago ha sido extensamente caracterizado, y fue aislado recientemente (41,49) . El análisis destructivo de enlaces indicó que existen 1.06×10^5 receptores por célula, con una constante de afinidad (K_a) de 1.75×10^7 por mol.

2.3 Consecuencias de la acumulación excesiva de AGE's en tejidos de pacientes diabéticos.

La glucosilación no enzimática de las proteínas es la unión de moléculas de glucosa a aminoácidos de proteínas sin la participación catalítica de enzimas específicas. Este proceso afecta a proteínas intracelulares de células que no dependen de la insulina, proteínas de membrana celular, proteínas extracelulares como las de la membrana basal de los capilares y proteínas circulantes.

Las modificaciones consecutivas a la producción de AGE's que contribuyen al desarrollo y progresión de complicaciones como la micro y macroangiopatía, pueden dividirse en:

a) Las derivadas de la formación de puentes intercatenarios en las proteínas de la matriz extracelular; los AGE's inducen un aumento del tamaño del poro y modificación de las cargas eléctricas de la matriz, extravasación, depósito e inmovilización de proteínas plasmáticas y disminución de la labilidad de estas proteínas a la degradación enzimática, además de hipertrofia e hiperplasia celular debida a una disminución de la ligadura del heparán sulfato de proteoglicanos (inhibidor de crecimiento).

b) Las que involucran interacción de los AGE's con los receptores celulares (macrófagos/mo-nocitos). Fig 2.5

c) Las secundarias a la aparición de puentes intercatenarios en el DNA celular.

En la tabla 2.1 se enlistan los mecanismos que por excesiva acumulación de AGE's en proteínas pueden producir tantos rasgos fisiopatológicos centrales como complicaciones diabéticas. El incremento de la permeabilidad capilar puede ser el resultado de la disfunción de las células endoteliales y de la matriz extracelular inducida por los AGE's. La proporción a la cual estos vasos hiperpermeables llegan a ser progresivamente ocluidos aparece como respuesta a varios procesos inducidos por AGE's al mismo tiempo que decrece la remoción de proteínas, incrementa el depósito de nuevas proteínas y se estimula la proliferación celular.

La naturaleza reversible de los cambios de la permeabilidad en estados primarios o tempranos de diabetes puede reflejar una respuesta endotelial con variación de niveles de secreción de Factor de Necrosis Tumoral (TNF) de macrófagos que están respondiendo a la insulina.

Los cambios irreversibles en la permeabilidad de los vasos sanguíneos de pacientes diabéticos muy probablemente muestren alteraciones estructurales permanentes en los componentes de la

matriz extracelular. Es evidente la reducción específica del componente proteoglicano cargado negativamente de la membrana basal debido al incremento persistente de la pérdida de proteínas plasmáticas negativas (44,45). Esto sugiere que los enlaces intercatenarios con componentes integrales de la membrana basal distorsionan importantes sitios de reconocimiento de proteoglicanos.(10,28)

En adición al decremento de enlaces entre proteoglicanos aniónicos y proteínas con AGE's, la degradación de proteoglicanos puede ser incrementada por la secreción de monoquinas cuando las proteínas con AGE's se enlazan al receptor del macrófago (31). Esto favorece que se acentúen los efectos por la pérdida de moléculas de barrera electrostática en la permeabilidad capilar.

Finalmente, la pérdida progresiva de los poros de medida selectiva normal de la barrera de filtración glomerular en pacientes diabéticos y la derivación de proteínas a áreas locales por destrucción de la pared capilar (48) parece constituir la expresión in vivo de asociación anormal y ensamble de los componentes de la membrana basal que resultan de la formación de los puentes intercatenarios con AGE's. (49,55)

Una de las estructuras de la retina más comprometidas por la formación de AGE's es la membrana basal de los capilares . Este cambio químico no sólo hace a la membrana más gruesa, sino que, además, contribuye a alterar sus características físicas. Así, muchas proteínas glucosiladas de la membrana basal son menos susceptibles a la proteólisis.

La colágena glucosilada de la membrana basal puede ligar IgG. Se postula que esto podría volver inmunogénica a la colágena. Sin embargo, hasta la fecha no se han demostrado reacciones inmunes contra la retina.

| CONSECUENCIA | MECANISMO | TEJIDO (COMPONENTE INVOLUCRADO) |
|---|---|------------------------------------|
| Incremento en la permeabilidad vascular | Respuesta a la secreción de monoquinas inducida por AGE's (TNF, IL-1). | Endotelio |
| | Disminución de enlaces entre proteoglicanos aniónicos y proteínas con AGE's | Matriz extracelular |
| | Degradación de proteoglicanos aniónicos en respuesta a la secreción de monoquinas inducida por AGE's | Matriz extracelular |
| | Ensamble anormal de los componentes de la membrana basal con AGE's | Matriz extracelular |
| Pared vascular inelástica y angostada | Resistencia a la degradación enzimática de proteínas con enlaces cruzados con AGE's | Matriz extracelular |
| | Acumulación de depósitos de proteínas plasmáticas a través de enlaces cruzados con AGE's | Matriz extracelular |
| | Proliferación de matriz(ces) y células en respuesta a la inducción de secreción de promotores de crecimiento de monoquinas (macrófago y células endoteliales) dada por AGE's. | Pared vascular |
| | Posiblemente, proliferación de matriz y células en respuesta a la secreción de PDGF inducida por matriz con AGE's enlazados a proteínas plasmáticas. | Pared vascular |

PDGF es el factor de crecimiento derivado de plaquetas

Las células endoteliales se afectan indirectamente por la formación de AGE's ya que la albúmina glucosilada es captada ávidamente por estas células, lo que afecta su función.

La acelerada formación de puentes intercatenarios entre proteínas plasmáticas extra-vasales con componentes de la matriz celular por acumulación de AGE's, incrementa la concentración total de proteína depositada en pared vascular. La matriz, que con proteínas ha formado enlaces cruzados a través de AGE's, puede también incrementar la expansión de la pared vascular por estimulación de agregación plaquetaria y liberación de factor de crecimiento derivado de las plaquetas (40). Al mismo tiempo, un incremento en la síntesis y secreción de componentes de matriz y proliferación celular, es el resultado de la secreción de factor promotor del crecimiento

inducido por enlace entre AGE's y el receptor del macrófago, que puede favorecer el estrechamiento y oclusión de la luz vascular.

2.4 Inhibición farmacológica de AGE's.

Las consecuencias patológicas de la formación de puentes intercatenarios de los AGE's pueden ser prevenidas si los reactivos intermediarios, es decir, los productos tempranos de glicosilación son bloqueados.

Para tal efecto, fueron separados algunos compuestos de hidrazina, y se seleccionó el clorhi-

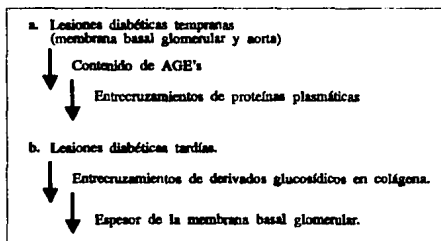


Tabla 2. Efectos de la administración *in vivo* de aminoguanidina.
Adaptado de Brownlee y col.

drato de aminoguanidina para un estudio intensivo (6,7,55). La aminoguanidina es químicamente más reactiva que el grupo épsilon-amino de las proteínas, debido a esto, existe la hipótesis de que podrían obtenerse así, productos tempranos de glicosilación avanzada no reactivos, e impedir de esta forma la formación de AGE's. (fig 2.5)

Los experimentos iniciales *in vitro*, demostraron que el clorhidrato de aminoguanidina, efectivamente inhibe la formación de AGE's, ya que bloquea los grupos carbonilo reactivos de los compuestos de Amadori y de sus derivados (32) (3-desoxiglucosona y glucoaldehído), evitando así la formación de puentes intercatenarios entre las proteínas solubles del plasma y la colágena;

de la colágena con ella misma y de puentes que inducen a la formación de enlaces defectuosos entre proteoglicanos polianiónicos y colágena, fibroconectina y membrana basal.

Por otra parte, la aminoguanidina tiene baja acción tóxica (DL 50 = 1800 mg/Kg), al menos en roedores y no interfiere con la formación normal de uniones o puentes producidos por acción enzimática. En la tabla 2 se resumen los efectos obtenidos mediante la administración *in vivo* de aminoguanidina.

2.5 Técnicas para medición y cuantificación de AGE's:

Más del 90% de la proteína presente en los glóbulos rojos de los humanos es la hemoglobina A (2). Entre los menores componentes de la hemoglobina, el más abundante es la hemoglobina Alc, que comprende del 4 al 7% de la hemoglobina total. La hemoglobina Alc es una aldimina, o base de Schiff, producto de condensación entre una hexosa y el grupo N terminal del residuo de valina en la cadena beta de la hemoglobina (26).

El interés por la hemoglobina Alc se despertó por el descubrimiento de que sus niveles en los pacientes diabéticos son de aproximadamente el doble que en los pacientes no diabéticos. La hemoglobina Alc es formada por la reacción entre la glucosa y la hemoglobina A, esto fue originalmente propuesto por Dixon y corroborado y amplificado por Bunn y col. (14), quien demostró que la condensación entre la D-glucosa y la valina es seguida de rearrreglo de Amadori de la aldimina a cetoamina. Subsecuentemente, Butt et al (13) postularon que la reacción es no enzimática, la hemoglobina Alc es formada lentamente durante los 120 días de vida del eritrocito; y los niveles de hemoglobina Alc reflejarán, por tanto, el adecuado control de la glucosa en los diabéticos durante

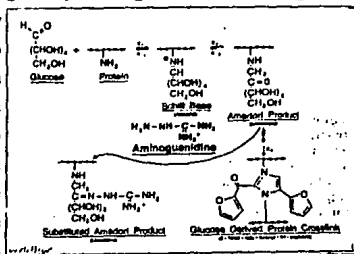


Fig 2.6 Prevención de la formación de los puentes intercatenarios entre AGE's y proteasas por acción de la aminoguanidina

este periodo de tiempo. Flüdeiger y Winterhalter confirmaron que la glucosilación de la hemoglobina es no enzimática (25).

La utilidad de la hemoglobina Alc como medida clínica fue recalcada por los siguientes descubrimientos: primero, en los pacientes diabéticos, los niveles de hemoglobina Alc y el área bajo la curva de la prueba de tolerancia a la glucosa son linealmente correspondientes (29); segundo, los niveles de hemoglobina Alc reflejan el grado de control de los carbohidratos; y tercero, después de la normalización de los niveles sanguíneos de glucosa, los niveles de hemoglobina Alc decrecen en razón proporcional a la aparición de nuevos eritrocitos (29). La medida de la hemoglobina Alc así provee un objetivo y retrospectivo indicio del control de la glucemia.

Además de ser usada como medida clínica, la formación no enzimática de la hemoglobina Alc ha provisto de bases conceptuales de la patogénesis de las complicaciones crónicas de la diabetes: si una proteína como la hemoglobina puede experimentar glucosilación (14), entonces otras proteínas funcionales o estructurales pueden también ser modificadas por reaccionar con glucosa encontrada en abundancia en la diabetes (25.29)

En ausencia de una rutina de ensayos químicos AGE-específicos, se utilizan otros métodos (36.38), como el Ensayo de Fluorescencia Relativa AGE-dependiente, este método, aunque muy usado, sufre de contribuciones totales o parciales por la interferencia de aductos no AGE-proteicos. Este problema ha sido resuelto por la implantación del Ensayo del Radioreceptor para muestras de AGE's tanto en proteínas nativas como enzimáticamente digeridas.

La medición directa de AGE's en proteínas es particularmente difícil. Los niveles de hemoglobina Alc reflejan los niveles de AGE's en suero. Para la determinación de los niveles de AGE's en pacientes diabéticos, se colectan muestras de sangre y se sigue cualquiera de los dos métodos anteriores: Ensayo de fluorescencia relativa o de Radioreceptor.

- *Ensayo de Fluorescencia para AGE's:*

Las muestras de sangre de los pacientes diabéticos son centrifugadas y se separa el suero. La concentración de proteínas de las muestras se ajusta a 1 mg/ml. La fluorescencia se mide a 450 nm en excitación a 390 nm en un Espectrofotómetro de fluorescencia (36,37,38). Las medidas de fluorescencia se expresan en porcentaje de fluorescencia relativa comparadas con un estándar de AGE-albúmina sérica bovina.

- Ensayo de Radioreceptor:

Utiliza células enteras. Está basado en la afinidad de la unión de los AGE's con el receptor de la superficie de los macrófagos RAW 264.7.

La muestra se incuba con albúmina sérica bovina a fin de formar un complejo AGE-BSA. Las células RAW 264.7 se incuban con alícuotas de la muestra que tendrá AGE sin marca y con estándar de AGE-BSA marcado con ^{125}I . Los resultados son expresados en unidades de AGE's por mg de proteína, determinado por el contenido de hidroxiprolina en la proteína (Apéndice 1) (21). Una unidad de AGE's se define como la cantidad suficiente para inhibir la unión del ^{125}I -AGE-BSA al receptor en un 50%.

CONCLUSIONES

- La diabetes mellitus es una de las enfermedades crónicas más frecuentes. Su prevalencia en algunas regiones es afectada por diversos factores como el estado nutricional y la raza, entre otros. Sin embargo, aproximadamente la mitad de los diabéticos no han sido diagnosticados.
- La hiperglucemia es el factor desencadenante del desarrollo de las complicaciones crónicas. Existe una correlación entre el grado de hiperglucemia y la frecuencia, gravedad y rapidez de progresión de las complicaciones.
- Las complicaciones crónicas de la diabetes son las responsables de su elevado costo socioeconómico y la disminución franca de la calidad de vida del diabético. Una vez manifestadas es difícil controlarlas y evitar su progresión.
- Cada vez son mayores las evidencias respecto al papel que desempeñan los AGE's, consecutivos a la hiperglicemia crónica, en la génesis de las complicaciones. Por consiguiente, para prevenir la aparición de complicaciones es importante evitar la glucosilación mediante una terapia capaz de lograr valores de euglucemia o próximos a ella, a partir del diagnóstico de la diabetes.
- Otra alternativa a lo anterior, sería tratar de impedir la generación de AGE's bloqueando sus intermediarios; esto podría lograrse mediante el empleo de fármacos como la aminoguanidina. Este campo de la farmacología puede brindar un nuevo recurso terapéutico que quizá permita la prevención efectiva de las complicaciones crónicas de la diabetes mellitus.

APENDICE

Ensayo modificado para la determinación de hidroxiprolina en tejido hidrolizado.

Material:

1. Reactivo de cloramina T:

1.41gr de cloramina T (Eatsman) se disuelve en agua destilada y se afora a 100ml.

* Este reactivo es de poca estabilidad, por lo que se debe preparar para ser utilizado inmediatamente.

2. Reactivo de aldehído-ácido perclórico:

- 15gr. de p-dimetil-amino-benzaldehído (Eatsman).

- 60ml. de n-propanol.

- 26ml. de ácido perclórico (grado reactivo 70%).

Llevar lo anterior al aforo con agua destilada.

*Este reactivo es estable aproximadamente por una hora, preparar con poco tiempo de anticipación a su uso.

3. Solución Buffer:

- 133gr. de ácido cítrico monohidratado.

- 32gr. de ácido acético glacial.

- 320gr. de acetato sódico trihidratado.

- 91gr. de hidróxido de sodio.

- 800ml. de n-propanol.

Mezclar y aforar a 300ml. con agua destilada.

Ajustar el pH entre 6-6.5 con solución de NaOH 0.2M.

Ajustar volumen a 4000ml. con agua destilada.

Añadir 1-2ml. de tolueno como preservativo.

*Este reactivo es estable por dos meses en refrigeración y frasco ámbar.

4. Stándar de hidroxiprolina:

a) Stándar primario: 0.5gr. de hidroxiprolina se disuelven en 1000ml. de solución buffer (500mcg. de hidroxiprolina por ml. de solución buffer).

b) Stándar secundario: 20ml. del std. primario se llevan a un volumen final de 100ml. con solución buffer (100mcg./ml)

4mcg/ml :4ml. del std secundario a volumen final de 100ml.

2mcg/ml :2ml. del std secundario a volumen final de 100ml.

0mcg/ml :solución buffer únicamente.

Procedimiento:

1. El tejido es obtenido y pesado.
2. El tejido puede ser secado y repesarse para determinar su contenido de agua.
3. Hidrólisis: 10mg de tejido/1ml. de HCl 6M. Calentar a 120°C en un recipiente o vasija de presión por 2-4 horas.
4. Las muestras se secan durante toda la noche en un desecador de vacío.
5. Se añade el buffer para diluir las muestras del ensayo a un rango sensible. Se preparan los estándares.
6. Se añaden los estándares a las muestras.
7. Se prepara el reactivo de cloramina T. Se añade 1ml. a cada tubo y se deja reaccionar por 20 minutos. Durante el periodo de reacción se prepara el reactivo de Aldehído-ácido perclórico.
8. 1ml. del reactivo anterior se añade a cada muestra. Las muestras se colocan en un baño de agua caliente (60°C) y se dejan reaccionar durante 15 minutos.
9. Se enfrían las muestras. Se lee absorbancia a 500nm para cada muestra y el std. La concentración es determinada por la curva std. de adición.

Desarrollo:

Las muestras de tejido con peso conocido se colocan en el homogeneizador. El tejido puede ser fresco o seco. Se añade ácido clorhídrico 6M en proporción de 1ml. por cada 10mg. de tejido (peso húmedo), Si el tejido es fresco, no se requiere. La muestra se seca por freeze-drying o por desecado al vacío. Se homogeneiza una cantidad suficiente de tejido como para obtener 4 muestras de la suspensión homogénea. Las alícuotas de 2ml. del homogeneizado son colocadas en 4 tubos de ensayo pyrex para hidrólisis. En este momento, cada uno de los tubos contendrá idéntica cantidad de tejido.

En la boca de los tubos se colocan canicas de vidrio para evitar pérdidas de muestra por la ebullición. Los tubos se colocan en la vasija de presión (olla express), que debe contener 2cm de agua y se calienta a 120°C a presión absoluta de 210KPa (1Pa= 1N/m²). La hidrólisis se completa aproximadamente en 2-4 horas.

Una vez terminada la hidrólisis, los tubos se pasan al desecador de vacío y se les quitan las canicas. Los tubos con las muestras son calentados en vacío a 50-60°C. El vacío no debe ser muy fuerte porque las muestras hervirían violentamente. Una trampa fría (acetona y hielo seco) y una trampa de NaOH (NaOH sólido en una cámara de vacío) deberán ser colocados a lo largo de la línea de vacío para prevenir mezclas y que el HCl dañe la bomba de vacío. Los tubos deberán permanecer a la izquierda del desecador hasta que el HCl ha sido removido y las muestras están secas. El secado usualmente se completa durante toda la noche, dependiendo de la fuerza del vacío.

Todo remanente de HCl es neutralizado por adición de buffer. Las muestras se ajustan a concentración de 0.1 a 4.0mcg. de hidroxiprolina/ml. de buffer. Un volumen igual de buffer es añadido a cada una de las muestras equivalentes. Para más tejido, añadir 2-4ml. de buffer para llevar a la muestra a la concentración apropiada. Sin embargo, para ciertos tejidos con contenido alto de colágena como piel y tendones, se llevará a la dilución que éstos requieran. La dilución

exacta se calcula empíricamente. Un volumen de 2ml, es removido de cada tubo de muestra y se transfiere a tubos limpios para la determinación de hidroxiprolina.

Las soluciones std. de hidroxiprolina preparadas previamente, se adicionan a los 4 equivalentes de 2ml. cada uno obtenidas en el paso anterior de una manera específica:

- Muestra 1: 1ml del std de 0mcg/ml.
- Muestra 2: 1ml del std de 1mcg/ml.
- Muestra 3: 1ml del std de 2mcg/ml.
- Muestra 4: 1ml del std de 4mcg/ml.

El blanco consiste en 3ml. de buffer preparado y tratado igual que las muestras, provisto de lectura basal espectrofotométrica.

Sólo el volumen necesario de reactivo de Cloramina T se prepara ahora, ya que es inestable. Se añaden 1.5ml. de reactivo de Cloramina T 0.05M a cada uno de los tubos y se deja reaccionar por 15-20 minutos. Durante este tiempo se prepara el reactivo aldehído-ácido perclórico, y se añaden 1.5ml. de éste reactivo a cada tubo después del tiempo de reacción de la Cloramina T. Los tubos se colocan en baño de agua a 60°C por 15 minutos; durante éste tiempo, se desarrolla el color rojo. Las muestras se enfrían a temperatura ambiente o en baño de agua helada por corto tiempo. La absorbancia se lee antes de 3 horas a 550nm. No debe rebasarse este tiempo, ya que el color rojo baja y por lo tanto, la absorbancia decrece.

Se grafica absorbancia vs. concentración std. de hidroxiprolina en solución. La ecuación de la recta se calcula por mínimos cuadrados o por regresión lineal con los puntos obtenidos. El punto en el cual la absorbancia es igual a cero, se refiere a la concentración de hidroxiprolina en solución debido al tejido hidrolizado. Después de corregir todas las diluciones hechas al tejido hidrolizado, el contenido de hidroxiprolina en los tejidos puede ser determinado.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.-Alberti KGMM, Press CM: The biochemistry of the complications of diabetes mellitus. In : Keen H, Jarret J, eds. *Complications of diabetes*, 2nd ed. London: Edward Arnold, 1982:231-70.
- 2.-Allen DW, Schoeder WA, Balog J: Observation on the chromatographic heterogeneity of normal adult and fetal human hemoglobin. A study of the effects of the crystallization and chromatography on the heterogeneity and isoleucine content. *J Am Chem Soc* 1985; 80 : 1628-34 In *Dustan Dvornik: Aldose reductase inhibition: An approach to the prevention of diabetes complications*. Ed Biomedical information corporation a division of Mc Graw-Hill. USA 1987.
- 3.-Baynes JW, Monnier VM, eds *The Maillard reaction in aging, diabetes and nutrition*. Citado por Rull, Zorrilla, Jadzinsky, Santiago. *Diabetes Mellitus: Complicaciones crónicas*. Ed. Interamericana-Mc Graw Hill. 1ra edición, 1991.
- 4.-Bookchin RM, Gallop PM: Structure of hemoglobin A1c ; nature of N terminal-chain blocking groups. *Biochem Biophys Res Comm*. 1968;32:86-93. In *Dustan Dvornik: Aldose reductase inhibition: An approach to the prevention of diabetes complications*. Ed Biomedical information corporation a division of Mc Graw-Hill. USA 1987.
- 5.-Browlee M, Vlassara H, Cerami A. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med*. 1988;318:1315-21.
- 6.-Browlee M, Vlassara H, Kooney A, Ulrich P, Cerami A. Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross linking. *Science* . 1986;232:1629-32.
- 7.-Browlee M, Vlassara H, Kooney A, Cerami A. Inhibition of glucose derived protein crosslinking and prevention of early diabetic changes in glomerular basement membrane by aminoguanidine . *Diabetes* 1986;36. suppl. 42 A abstract.
- 8.-Browlee M, Vlassara H, Cerami A. Advanced products of nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic vascular disease. *Diabetes/Metabolism reviews*. 1988;4:437.
- 9.-Browlee M, Vlassara H, Cerami A. The pathogenic role of nonenzymatic glycosylation in diabetic complications. 1987;94:139.
- 10.-Brownlee M, Vlassara H, Cerami A. Aminoguanidine prevents hyperglycemia induced defect in binding of heparin by matrix molecules. *Diabetes*. 1987;36:Suppl 1:85A. abstract. In *Browlee M, Vlassara H, Cerami A. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications*. *N Engl J Med*. 1988;318:1315-21.
- 11.-Brownlee M, Pongor S, Cerami A. Covalent attachment of soluble proteins by nonenzymatically glycosylated collagen: role in the in situ formation of immune complex. *J Exp Med*. 1983;158:1739-44. In *Browlee M, Vlassara H, Cerami A. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications*. *N Engl J Med*. 1988;318:1315-21.
- 12.-Brownlee M, Vlassara H, Cerami A. Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. *Ann Intern Med*. 1984;101:527-37.
- 13.-Buna HF, Haney DN, Karim S, Gabbay KH, Gallop PM. The biosynthesis of human hemoglobin A1c: Slow glycosylation of hemoglobin in vivo. *J Clin Invest*. 1976;57:1652-59. In *Dustan Dvornik: Aldose reductase*

inhibition:An approach to the prevention of diabetes complications. Ed Biomedical information corporation a division of Mc Graw-Hill. USA 1987.

14.-Bunn HF, Haney DN, Gabbay KH, Gallop PM. Further identification of the nature and linkage of the carbohydrates in hemoglobin A_{1c}. Biochem Biophys Res Comm. 1975; 67:103-109. In Dustan Dvornik: Aldose reductase inhibition:An approach to the prevention of diabetes complications. Ed Biomedical information corporation a division of Mc Graw-Hill. USA 1987.

15.-Caird FI, Pirie A, Ramsen TG : Diabetes and the eye. Oxford, Blackwell Scientific Publication, 1969, pp 1-7 In Dustan Dvornik: Aldose reductase inhibition:An approach to the prevention of diabetes complications. Ed Biomedical information corporation a division of Mc Graw-Hill. USA 1987.

16.-Candiano G, Ghiggen GM, Delfino G et al. Reaction of lysine with aldoses. Carbohydr Res. 1985;145:99-112. In Dustan Dvornik: Aldose reductase inhibition:An approach to the prevention of diabetes complications. Ed Biomedical information corporation a division of Mc Graw-Hill. USA 1987.

17.-Cerami A, Vlassara H, Brownlee M. Glucose and aging. Sci Am 1987; 256(5):90-6.

18.-Czechmp, Karlund JK, Yagaloff KA, Bradford AP, Lewis RE. Insulin Receptor Signaling. J. Biol. Chem. 1988; 263:11017-20.

19.-Darnell J., Lodish H., Baltimore D. Molecular cell Biology. Chapters 16 and 17, Scientific American Books.

20.-Dustan Dvornik: Aldose reductase inhibition:An approach to the prevention of diabetes complications. Ed Biomedical information corporation a division of Mc Graw-Hill. USA 1987.

21.-Edwards CA & O'Brien WD Jr. Modified assay for determination of hydroxyproline in a tissue hydrolyzate. Clin Chem Acta. 1980;104:161-167.

22.-Erllich HA. HAL class II sequences and genetic susceptibility to insulin dependent diabetes mellitus. Balliere's Clinical Endocrinology and Metabolism. 1991;5:395-412.

23.-Fajans SS. Classification and diagnosis of diabetes. En Riffrin M, Porte D. eds. Diabetes mellitus theory and practice, 4 ed. New York : Elsevier , 1990; 346-56. En Rull, Zorrilla, Jadzinsky, Santiago. Diabetes Mellitus: Complicaciones crónicas. Ed. Interamericana-Mc Graw Hill. 1ra edición, 1991.

24.-Famar JC, Ulrich PC, Cerami A. Sulfite trapping of nonenzymatic browning intermediates. J Organic Chem (in press). In Browlee M, Vlassara H, Cerami A. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. N Engl J Med. 1988;318:1315-21.

25.-Flückinger R, Winterhalter KH. In vitro synthesis of hemoglobin A_{1c}. FEBS. Lett 1976;71:356-60. In Dustan Dvornik: Aldose reductase inhibition:An approach to the prevention of diabetes complications. Ed Biomedical information corporation a division of Mc Graw-Hill. USA 1987.

26.-Holmquist WR,Schroeder WA. A new terminal blocking groups involving Schiff base in hemoglobin A_{1c}. Biochemistry. 1966;5:2489-2503. In Dustan Dvornik: Aldose reductase inhibition:An approach to the prevention of diabetes complications. Ed Biomedical information corporation a division of Mc Graw-Hill. USA 1987.

27.-Kent MJC, Light ND, Bailey AJ. Evidence of glucose-mediated covalent cross-linking of collagen after glycosylation in vitro. Biochem J. 1985;225:745-52. In Browlee M, Vlassara H, Cerami A. Advanced

glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med.* 1988;318:1315-21.

28.-Klein DJ, Brown DM, Oegema TR. Glomerular proteoglycans in diabetes: partial structural characterization and metabolism of the novo synthesized heparan-³⁵S, and dermatan-³⁵S, proteoglycans in streptozocin-induced diabetic rats. *Diabetes.* 1986;35:1130-42. In Browlee M, Vlassara H, Cerami A. *Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications.* *N Engl J Med.* 1988;318:1315-21.

29.-Koenig RJ, Peterson CM, Kilo C, Cerami A, Williamson JR. Hemoglobin A1c as an indicator of degree of glucose tolerance in diabetes. *Diabetes.* 1976;25:230-32. In Dustan Dvornik: *Aldose reductase inhibition: An approach to the prevention of diabetes complications.* Ed Biomedical information corporation a division of Mc Graw-Hill. USA 1987.

30.-Koenig RJ, Peterson CM, Jones RL, et al. Correlation of a glucose regeneration and hemoglobin A1c in diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1976;295:417-20. In Dustan Dvornik: *Aldose reductase inhibition: An approach to the prevention of diabetes complications.* Ed Biomedical information corporation a division of Mc Graw-Hill. USA 1987.

31.-Le J, Vilce KJ. Tumor necrosis factor and interleukin I: cytokines with multiple overlapping biological activities. *Lab invest.* 1987;56:234-48.

32.-Le Pape A, Gutman N, Guitton JD, Legrand Y, Muh JP. Nonenzymatic glycosylation increases platelet aggregating potency of collagen from placent of diabetic humans beings. *Biochem Biophys Res Comm.* 1983;111:602-10. In Browlee M, Vlassara H, Cerami A. *Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications.* *N Engl J Med.* 1988;318:1315-21.

33.-Lenmark A. Etiology and predictive factors in type I diabetes. En: Jagger PI. ed. *The Endocrine Society 43 Postgraduate Assembly Syllabus.* Bethesda: The Endocrine Society. 1991;486-76

34.-Makita S, Vlassara H, Cerami A, Bucala R. Immunochemical detection of advanced glycosylation end products in vivo. *J Biol Chem.* 1992;267:5133-38.

35.-Makita, Radoff, Elliot, Rayfield, Yang, Skolnik, Delaney, Friedman, Cerami & Vlassara. Advanced glycosylation end products in patients with diabetic nephropaty. *N Engl J Med.* 1991;19:863-42.

36.-Monnier VM, Kohn RR, Cerami A. Accelerated age-related browning of human collagen in diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1984; 81:583-7. In Browlee M, Vlassara H, Cerami A. *Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications.* *N Engl J Med.* 1988;318:1315-21.

37.-Monnier VM, Sell DR, Abdul-Karim FW, Emancipator SN. Collagen browning and a cross-linking are increases in chronic experimental hypoglucaemia. *Diabetes* 1988; 37:867-72.

38.-Monnier VM, Vishwanath V, Frank KE, Elmets CA, Douchot P, Kohn RR. Relation between complications of type I diabetes mellitus and collagen-linked fluorescence. *N Engl J Med.* 1986;314:403-8.

39.-National Diabetes Data Group. Classification and Diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes.* 1979; 28 : 1039-57

40.-Radoff S, Vlassara H, Cerami A. Characterization of a solubilized cell surface binding proteins on macrophage specific for proteins modified nonenzymatically glycosylated end products. *Arch Biochem Biophys.* 1988;263:418-23

- 41.-Radoff S, Vlassara H, Cerami A. Isolation of a macrophage receptor of proteins modified by advanced glycosylation end products (AGE's). *Fed Proc.* 1987;46:2116 abstract.
- 42.-Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis-an update. *N Engl J Med.* 1986;314:488-500
- 43.-Rull, Zorrilla, Jadzinsky, Santiago. *Diabetes Mellitus: Complicaciones crónicas.* Ed. Interamericana-Mc Graw Hill. 1ra edición, 1991.
- 44.-Shemesh O, Jones HW, Myers BD. Pathophysiology of proteinuria in diabetic neuropathy. In Robinson RR, ed *Proceedings of the Ninth international congress of nephrology.* Vol 2. New York: Springer-Verlag 1984:1081-93. In Browlee M, Vlassara H, Cerami A. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med.* 1988;318:1315-21.
- 45.-Shimomura H, Spiro RG. Studies on macromolecular components of human glomerular basement membrane and alterations in diabetes: decreases levels of heparan sulfate proteoglycans and laminin. *Diabetes* 1987;36:374-81.
- 46.-Synder S.H., The molecular basis of communication between cells. *Scientific American Books.* 1985: 203(4) : 132-141.
- 47.-The Long term complications of diabetes. 270-291.
- 48.-Tomljanovich S, Deen WM, Jones HW III, Schwrtz HC, Myers bd. Functional nature of glomerular injury in progressive diabetic glomerulopathy. *Diabetes.* 1987;36:556-65. In Browlee M, Vlassara H, Cerami A. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med.* 1988;318:1315-21.
- 49.-Tsilibary EC, Charonis AS, Furcht LT. Changes of the main noncollagenous NCI domain of type IV collagen after in vivo nonenzymatic glycosylation. *Diabetes.* 1987;36: Suppl 1:85A, abstract. In Browlee M, Vlassara H, Cerami A. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med.* 1988;318:1315-21.
- 50.-Unger RH, Grundy S. Hyperglucemia as an inducer as well as a consequence of impaired islet cell function and insulin resistance: implications for the management of diabetes. *Diabetologia.* 1985; 28 : 119-1121.
- 51.-Vishwanath V, Frank KE, Elmets CA, Dauchot PJ, Monnier VM. Glycation of skin collagen in type I diabetes mellitus: correlation with long term complications. *Diabetes.* 1980;35:916-21.
- 52.-Vlassara H, Browlee M, Manogue K, Pasagian K, Cerami A. Cachectin/TNF and IL-2 syntesis and secretion are induced by glucose-modified protein binding to a high affinity macrophage receptor. *Science (in press)* In Browlee M, Vlassara H, Cerami A. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med.* 1988;318:1315-21.
- 53.-Voet & Voet. *Biochemistry: Molecular physiology.* U.S.A., 1990.
- 54.-Wang Y, Haol, Lafferty J. The pathogenesis of immunological mediated diabetes. En Rull, Zorrilla, Jadzinsky, Santiago. *Diabetes Mellitus: Complicaciones crónicas.* Ed. Interamericana-Mc Graw Hill. 1ra edición, 1991.
- 55.-Yurchenco PD, Tsilibary EC, Charonis AS, Furthmayr H. Models for hte self-assembly of basement membrane. *J Histochem Cytochem.* 1986;34:93-102. In Browlee M, Vlassara H, Cerami A. Advanced

glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med.* 1988;318:1315-21.