



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**“Asociación de las concentraciones circulantes de los productos finales de glicación avanzada (AGEs) y sus productos de degradación con el daño de la función renal en el paciente diabético”.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Q. F. B. José Antonio Alvarado Ríos.

Dr. Armando Roberto Tovar Palacio.  
[Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.](#)

Dr. Eulises Díaz Díaz.  
[Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.](#)

Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes.  
[Facultad de Química.](#)

Ciudad de México. Mayo, 2017



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 esta 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 Dios que me ha dado una existencia llena de felicidad.

A mis padres, María Félix y César Joel, por su amor incondicional, su apoyo en todo momento y sus enseñanzas. Estoy agradecido con Dios y la vida por ser su hijo.

A mis hermanos, César Alberto y Sergio David, por ser mis primeros amigos, su confianza, cariño y todos los buenos momentos que hemos compartido.

A aquellas personas importantes en mi vida: Carlos Antonio, por todo su apoyo, amor y amistad sincera; a mis amigos y amigas: América, Alejandra, Omar, Dalia, Diego, Alejandro, Gabriela y Aideé, que han estado conmigo en cualquier circunstancia.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado en Ciencias Bioquímicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, por su excelente formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada para la realización de mis estudios de Maestría (Número de becario: 329565) y por el apoyo otorgado del Fondo Sectorial para la Investigación en Salud y Seguridad Social (SALUD-2011-1-161976) al proyecto titulado: “Desarrollo y validación de un inmunoensayo para la cuantificación de productos finales de glicación avanzada: evaluación de su valor diagnóstico para predecir las complicaciones crónicas de la Diabetes Mellitus”.

Al Laboratorio de Hormonas Proteicas del Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, por permitirme la realización del trabajo experimental en sus instalaciones.

A los miembros de mi comité tutor, los doctores Armando Roberto Tovar Palacio, Eulises Díaz Díaz y Marco Antonio Cerbón Cervantes, por su dirección y apoyo durante mis estudios de Maestría.

A todos los laboratorios y personal de los distintos departamentos e instituciones que colaboraron en éste proyecto.

A los miembros del jurado que dedicaron su tiempo en la revisión y corrección del presente trabajo.

## ABREVIATURAS

<b>°C</b>	Grado Celsius.	<b>HSA</b>	Albumina sérica Humana.
<b>µg</b>	Microgramos.	<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G.
<b>µL</b>	Microlitros.	<b>IgM</b>	Inmunoglobulina M.
<b>µm</b>	Micrometros.	<b>KDa</b>	Kilodaltones.
<b>µU</b>	Microunidades.	<b>LDL</b>	Lipoproteínas de baja densidad.
<b>3-DG</b>	3-desoxiglucosona.	<b>Log</b>	Logaritmo.
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico.	<b>LP</b>	Lipoproteína.
<b>AGEs</b>	Productos Finales de Glicación Avanzada.	<b>M</b>	Molaridad.
<b>AM</b>	Albuminuria moderada.	<b>MBG</b>	Membrana Basal Glomerular.
<b>Bo</b>	Unión específica máxima.	<b>mg</b>	Miligramos.
<b>BSA</b>	Albumina sérica bovina.	<b>min</b>	Minutos.
<b>CEL</b>	Carboxietil lisina.	<b>mL</b>	Mililitros.
<b>cm</b>	Centímetros.	<b>mM</b>	Milimolar.
<b>CML</b>	Carboximetil lisina.	<b>MOLD</b>	Dímero de lisina y metilgloxal.
<b>CPM</b>	Conteos por minuto.	<b>mU</b>	Miliunidades.
<b>CV</b>	Coefficiente de variación.	<b>N</b>	Normalidad.
<b>dL</b>	Decilitro.	<b>nm</b>	Nanómetros.
<b>DM</b>	Diabetes mellitus.	<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud.
<b>DM II</b>	Diabetes mellitus tipo 2.	<b>OPD</b>	o-fenilendiamina.
<b>DOLD</b>	Dímero de lisina y desoxiglucosona.	<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino.
<b>ELISA</b>	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima.	<b>Pcg</b>	Presión capilar glomerular.
<b>ENSANUT</b>	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición.	<b>pH</b>	Potencial de hidrogeno.
<b>ERC</b>	Enfermedad Renal Crónica.	<b>RAGE</b>	Receptor de AGE.
<b>ERO</b>	Especies reactivas de oxígeno.	<b>RIA</b>	Radioinmunoanálisis.
<b>GOLD</b>	Dímero de lisina y gloxal.	<b>TA</b>	Temperatura ambiente.
<b>HbA1c</b>	Hemoglobina glicosilada.	<b>TFG</b>	Tasa de filtrado glomerular.
<b>HDL</b>	Lipoproteínas de alta densidad.	<b>UNE</b>	Unión no específica.
<b>HRP</b>	Peroxidasa de rábano picante.		



8.1. Reactivos, materiales y equipos.....	33
8.2. Métodos analíticos empleados.....	33
8.2.1. Radioinmunoanálisis para la medición de AGEs .....	33
8.2.2. Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzima para la medición de AGEs.....	34
8.2.2.1. Síntesis de AGE-RNAsa.....	34
8.2.2.2. Normalización del ELISA para la medición de AGEs .....	35
8.2.3. Identificación de interferencias analíticas en la cuantificación de AGEs por ELISA.....	36
8.2.3.1. Análisis electroforético de las proteínas con capacidad de unión al AGE-BSA.....	38
8.2.4. Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzima para la detección anticuerpos del isotipo IgG .....	38
8.2.5. Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzima para la detección de anticuerpos del isotipo IgM.....	39
8.3. Relación de las concentraciones séricas de AGEs con la presencia de la enfermedad renal crónica en el paciente diabético.....	40
8.3.1. Sujetos de estudio .....	40
8.3.2. Procedimientos para garantizar aspectos éticos .....	40
8.3.3. Criterios de inclusión.....	40
8.3.4. Criterios de exclusión.....	41
8.3.5. Mediciones bioquímicas.....	41
8.3.6. Análisis estadístico .....	42
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43
9.1. Resultados previos.....	43
9.2. Identificación de interferencias analíticas en la cuantificación de AGEs por ELISA .....	47
9.3. Normalización del ELISA para medir AGEs utilizando placas recubiertas con AGE-RNAsa .....	52
9.4. Relación de las concentraciones séricas de AGEs con la presencia de la enfermedad renal crónica en el paciente diabético.....	53
9.4.1. Asociación de las concentraciones de AGEs medidos por el RIA con los parámetros clínicos y metabólicos estudiados.....	59

9.4.2. Asociación de las concentraciones de AGEs medidos por el ELISA con los parámetros clínicos y metabólicos estudiados.....	61
9.4.3. Estimación del valor de corte óptimo para las concentraciones séricas de AGEs medidas por RIA y su valor diagnóstico para el tamizaje de pacientes con nefropatía diabética.....	63
9.4.4. Estimación del valor de corte óptimo para las concentraciones séricas de AGEs medidas por ELISA y su valor diagnóstico para el tamizaje de pacientes con nefropatía diabética.....	65
10. CONCLUSIONES.....	69
11. RECOMENDACIONES .....	70
REFERENCIAS.....	71
ANEXOS .....	75



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los estadios de la ERC de acuerdo a la TFG. ....	22
Tabla 2. Medición de AGEs séricos medidos por RIA y ELISA. ....	45
Tabla 3. Detección de anticuerpos anti-AGEs en suero por ELISA utilizando el AGE-BSA como recubrimiento .....	46
Tabla 4. Contenido en AGEs totales en muestras de café y galletas. Los resultados se expresan como el valor medio en KU de AGEs/g de producto $\pm$ la desviación estándar. Las medidas se realizaron por duplicado. ....	46
Tabla 5. Características analíticas de los inmunoensayos RIA y ELISA para la cuantificación de AGEs. ....	53
Tabla 6. Características metabólicas de los sujetos controles, diabéticos sin y con daño renal crónico. ....	55
Tabla 7. Concentraciones séricas de AGEs medidos por RIA y ELISA en sujetos normoglicemicos controles agrupados por grupos de edades. ....	59
Tabla 8. Asociación entre las concentraciones séricas de AGEs medidas por el RIA con el resto de los parámetros clínicos y metabólicos estudiados. ....	59
Tabla 9. Asociación entre las concentraciones séricas de AGEs medidas por el ELISA con el resto de los parámetros clínicos y metabólicos estudiados. ....	61
Tabla 10. Capacidad analítica de la cuantificación de AGEs séricos por RIA para el tamizaje de pacientes con nefropatía diabética. ....	64
Tabla 11. Probabilidad de tener concentraciones séricas de AGEs medias por RIA $\geq 1120 \mu\text{U/mL}$ y padecer de daño renal crónico. ....	65
Tabla 12. Capacidad analítica de la cuantificación de AGEs séricos por ELISA para el tamizaje de pacientes con nefropatía diabética. ....	66
Tabla 13. Probabilidad de tener concentraciones séricas de AGEs medias por ELISA $\geq 220 \text{ mU/mL}$ y padecer de daño renal crónico. ....	67

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Formación de la base de Schiff.....	11
Figura 2. Formación del producto de Amadori..	12
Figura 3. Esquema de la síntesis de un AGE derivado de glucosa con actividad de entrecruzamiento de proteínas.....	13
Figura 4. Formación de AGEs. Proceso de generación de AGEs en el cual se incorpora la ruta de los polioles y la formación de oxoaldehídos..	15
Figura 5. Estructura química de varios AGEs y sus nombres triviales.	16
Figura 6. Tiempo de evolución y pruebas diagnósticas de la enfermedad renal crónica.....	25
Figura 7. Mecanismo de participación de los AGEs en el deterioro de la membrana basal glomerular que conduce al desarrollo de la nefropatía diabética y a la pérdida de proteínas séricas..	27
Figura 8. Curvas típicas de los inmunoensayos RIA (A) y ELISA (B) para medir AGEs derivados de glucosa.	44
Figura 9. Cromatograma de exclusión molecular en Bio-Gel P-200 de las moléculas con afinidad por el AGE-BSA.	48
Figura 10. Inhibición inducida por las proteínas con afinidad por el AGE-BSA presentes en las diferentes fracciones de la purificación por exclusión molecular en Bio-Gel P-200 del pool de sueros humanos.....	49
Figura 11. Presencia de anticuerpos anti-AGEs y anti-HSA de los isotipos IgG (A) y del isotipo IgM (B), unidos a las placas recubiertas de AGE-BSA, AGE-RNAsa y HSA respectivamente.	50
Figura 12. Análisis electroforético en gel de poliacrilamida al 10% con SDS de las proteínas con afinidad por el AGE-BSA.....	51
Figura 13. Curva típica del ensayo de ELISA para medir AGEs derivados de glucosa, rediseñado utilizando AGE-RNAsa como recubrimiento.....	52
Figura 14. Asociación entre las concentraciones séricas de AGEs medidas por el RIA y el ELISA rediseñado.....	56

Figura 15. Asociación de la concentración de AGEs medidos por RIA con la edad biológica.. .....	57
Figura 16. Asociación de la concentración de AGEs medidos por ELISA con la edad biológica.....	58
Figura 17. Asociación de las concentraciones séricas de AGEs medidas por RIA con las concentraciones séricas de creatinina.. .....	60
Figura 18. Asociación de las concentraciones séricas de AGEs medidas por RIA con las concentraciones séricas de creatinina.. .....	62
Figura 19. Determinación del valor de corte óptimo de la medición de AGEs por RIA para el tamizaje de pacientes diabéticos con daño renal crónico (creatinina sérica $\geq 1.3$ mg/dL).....	63
Figura 20. Determinación del valor de corte óptimo de la medición de AGEs por ELISA para el tamizaje de pacientes diabéticos con daño renal crónico (creatinina sérica $\geq 1.3$ mg/dL).....	65

## 1. RESUMEN

**Antecedente:** Los productos finales de glicación avanzada (AGEs) son un conjunto de estructuras heterogéneas que se forman por la interacción no enzimática de la glucosa y otros azúcares reductores con los grupos amino de las proteínas. Se generan de manera normal durante el proceso de envejecimiento, pero durante la diabetes mellitus se acelera su formación y acumulación.

En las últimas décadas la investigación biomédica ha aportado gran información en lo referente al papel que desempeñan los AGEs en los procesos fisiopatológicos que conducen al desarrollo de las complicaciones vasculares crónicas de la diabetes. Un ejemplo de ello es lo que ocurre en el riñón del paciente diabético, donde la formación de AGEs sobre las proteínas que conforman la membrana basal del glomérulo, trae como consecuencia la pérdida de las propiedades de filtración selectiva y, por tanto, la incapacidad del glomérulo para retener proteínas, lo que resulta en proteinuria y progresivamente en falla renal. A pesar de que existe mucha información científica sobre la interrelación de la formación de AGEs y las complicaciones crónicas de la diabetes mellitus, por problemas metodológicos en la actualidad no hay disponible una amplia gama de métodos que permitan la medición confiable de AGEs en suero.

**Objetivo:** Evaluar las causas de las interferencias analíticas encontradas durante la medición de AGEs en suero, por el ELISA previamente desarrollado. Rediseñar dicho inmunoensayo para garantizar una medición confiable de AGEs en suero. Estudiar de forma comparativa la capacidad diagnóstica de los dos inmunoensayos desarrollados por nuestro grupo de trabajo, para establecer la asociación entre las concentraciones séricas de AGEs y el deterioro de la función renal en el paciente diabético.

**Materiales y métodos:** Se realizó la medición de las concentraciones séricas de AGEs utilizando los dos inmunoensayos desarrollados (RIA y ELISA) en 110 sujetos normoglicémicos controles, 46 pacientes diabéticos sin daño renal crónico y 121 pacientes diabéticos con daño renal crónico. Se estudió la asociación entre las concentraciones séricas de AGEs y la presencia de daño renal crónico, establecido en función de las concentraciones séricas de creatininas. Se evaluó

comparativamente la capacidad diagnóstica de la medición de las concentraciones séricas de AGEs medidas por ambos métodos, para el tamizaje de pacientes diabéticos con daño renal crónico.

**Resultados:** Las concentraciones séricas de AGEs medidas por ambos métodos fueron menores en el grupo de sujetos controles, se incrementaron en los pacientes diabéticos sin complicaciones y fueron mucho mayores en los pacientes diabéticos con daño renal crónico. Las concentraciones séricas de AGEs medidas por ambos métodos se asociaron positiva y significativamente con las concentraciones séricas de creatinina; demostrando la interrelación entre el incremento de las concentraciones séricas de AGEs y el deterioro de la función renal en el paciente diabético. Los valores de corte óptimos para el tamizaje de pacientes con nefropatía diabética fueron de  $\geq 1120 \mu\text{U/mL}$  para el RIA y de  $\geq 220 \text{ mU/mL}$  para el ELISA. Con estos valores de corte óptimos, el RIA que mide solo los AGEs intactos logró clasificar correctamente el 88.5% de los pacientes. Por su lado, el ELISA que mide una mezcla de AGEs intactos, productos de degradación de AGEs y anticuerpos anti-AGEs, logró clasificar correctamente al 83.8% de los pacientes. Los pacientes diabéticos con concentraciones séricas de AGEs medidas por RIA  $\geq 1120 \mu\text{U/mL}$ , tuvieron 61 veces más probabilidad de padecer daño renal crónico. Mientras que los sujetos diabéticos con concentraciones séricas de AGEs medidas por ELISA  $\geq 220 \text{ mU/mL}$ , tuvieron 26 veces más probabilidad de desarrollar daño renal crónico.

**Conclusión:** Ambos inmunoensayos desarrollados fueron útiles para la medición confiable de las concentraciones séricas de AGEs en pacientes diabéticos, pudiéndose establecer su asociación con el grado de control metabólico; así como su capacidad para identificar sujetos con mayores probabilidades de desarrollar enfermedad renal crónica. La detección oportuna de los pacientes diabéticos con concentraciones elevadas de AGEs, mismos que tienen las mayores probabilidades de desarrollar complicaciones crónicas tales como el daño renal crónico; pudiera favorecer la disminución de la incidencia de esta complicación y contribuir a la reducción de los altos costos derivados de la atención médica especializada requerida para el manejo de dichas complicaciones.

## 2. ABSTRACT

**Background:** Advanced glycation end products (AGEs) are a heterogeneous set of structures formed by the non-enzymatic interaction of glucose and other reducing sugars with the amino groups of proteins. They are normally generated during the aging process but during diabetes mellitus their formation and accumulation is accelerated. In the last decades, biomedical research has provided great information regarding the role played by the AGEs in the pathophysiological processes that lead to the development of chronic vascular complications of diabetes. An example of this is what happens in the diabetic patient's kidney, where the formation of AGEs on the proteins that make up the basement membrane of the glomerulus, results in the loss of selective filtration properties and, therefore, the inability of the glomerulus to retain proteins, resulting in proteinuria and progressively in renal failure. Despite extensive information on the interrelationship of AGEs formation and chronic complications of diabetes mellitus, there are not many available methods in the market that allows the reliable measurement of serum AGEs.

**Objective:** To evaluate the causes of the analytical interferences found during the measurement of AGEs in serum by the previously developed ELISA. Redesign this immunoassay to ensure reliable measurement of serum AGEs. To study in a comparative way the diagnostic capacity of two immunoassays developed by our work group to establish the association between the serum concentrations of AGEs and the deterioration of the renal function in the diabetic patient.

**Materials and methods:** We measured the serum AGEs concentrations using the two immunoassays developed (RIA and ELISA) in 110 normoglycemic controls subjects, 46 diabetic patients without chronic kidney damage and 121 diabetic patients with chronic kidney damage. We studied the association between serum AGEs concentrations and the presence of chronic kidney damage, established as a function of serum creatinine concentrations. The diagnostic capacity of the measurement of the serum AGEs concentrations by both methods for the screening of diabetic patients with chronic kidney damage was comparatively evaluated.

**Results:** Serum AGEs concentrations measured by both methods were lower in the control group, increased in diabetic patients without complications, and were much higher in diabetic patients with chronic kidney damage. Serum AGE concentrations measured by both methods were positively and significantly associated with serum creatinine concentrations; demonstrating the interrelationship between the increase of the serum AGEs concentrations and the deterioration of renal function in the diabetic patient. The optimal cut-off values for screening for diabetic nephropathy were  $\geq 1120 \mu\text{U/mL}$  for RIA and  $\geq 220 \text{ mU/mL}$  for ELISA. With these optimal cut-off values, the RIA measuring only intact AGEs was able to correctly classify 88.5% of patients. On the other hand, the ELISA that measures a mixture of intact AGEs, degradation products of AGEs and anti-AGEs antibodies, was able to correctly classify 83.8% of the patients. The diabetic patients studied with serum AGEs concentrations measured by RIA  $\geq 1120 \mu\text{U/mL}$ , had 61 times more likely to suffer from chronic kidney damage. While diabetic subjects with serum AGEs concentrations measured by ELISA  $\geq 220 \text{ mU/mL}$ , had 26 times more likely to develop chronic kidney damage.

**Conclusion:** Both developed immunoassays were useful for the reliable measurement of serum AGEs concentrations in diabetic patients, being possible to establish their association with the degree of metabolic control; as well as its capacity to identify subjects with greater likelihood of developing chronic kidney disease. The timely detection of diabetic patients with high concentrations of AGEs, which are most likely to develop chronic complications such as chronic kidney damage; could favor the decrease of the incidence of this complication and contribute to the reduction of the high costs derived from the specialized medical attention required for the management of such complications.

### 3. INTRODUCCIÓN

Los Productos Finales de Glicación Avanzada (AGEs, por sus siglas en inglés: advanced glycation end products), son estructuras moleculares complejas que se forman en la circulación de los pacientes con diabetes no controlada, como consecuencia del estado de hiperglicemia sostenida durante largos períodos de tiempo, por interacciones no enzimáticas de la glucosa y otros azúcares reductores, con los grupos aminos de las proteínas séricas y de la matriz extracelular, fundamentalmente de los órganos del sistema circulatorio y renal. Estos cambios modifican las características química-físicas y por tanto las funciones de las proteínas glicadas y a su vez de los órganos afectados. En las últimas décadas, la investigación biomédica ha aportado gran información en lo referente a la participación de los AGEs en las complicaciones cardiovasculares y renales de los pacientes diabéticos; y han sido considerados como un elemento que favorece de forma significativa el proceso de envejecimiento acelerado y por tanto de las complicaciones crónicas de los pacientes diabéticos.

Los AGEs son estructuras que se forman lentamente por lo que requieren concentraciones elevadas de glucosa sostenidas en el tiempo, cuando se forman reflejan mejor el deterioro prolongado del estado de la glicemia y por tanto se asocia con daños tisulares en períodos de tiempos largos. Aparentemente, los AGEs pueden mantenerse en la circulación hasta un año después de su síntesis, y su actividad nociva de entrecruzamiento con otras proteínas y de depósito en los tejidos, continúa aún después de que las concentraciones séricas de glucosa regresen a su valor normal como consecuencia de un tratamiento médico efectivo. Por tal razón, los AGEs son sin duda alguna un mejor indicador del estado de control glicémico a largo plazo y del daño acumulado en los tejidos del paciente diabético.

Por lo tanto, se postula que la medición de los niveles circulantes de AGEs podría ser útil para predecir la aparición y progresión del daño renal en pacientes diabéticos, sin embargo, debido a complicaciones metodológicas, no existe aún una variedad de métodos disponibles comercialmente para medir de forma confiable los niveles circulantes de AGEs. El diagnóstico precoz a través de un



cribado universal es la mejor estrategia para detectar proactivamente el deterioro del estado metabólico de los pacientes diabéticos y de esta manera reducir los costos de los tratamientos e intervenciones necesarias para la atención de las complicaciones crónicas de estos pacientes.

Con base a lo anterior, el presente trabajo tiene como objetivo estudiar la asociación de las concentraciones circulantes de los AGEs derivados de glucosa y sus productos de degradación, con el daño de la función renal en el paciente diabético, mediante inmunoanálisis (RIA y ELISA) desarrollados en nuestro laboratorio.

## 4. ANTECEDENTES

### 4.1. Diabetes mellitus

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad sistémica, crónico-degenerativa, de origen heterogéneo, con grados variables de predisposición hereditaria y con participación de diversos factores ambientales, que se caracteriza por hiperglicemia crónica debido a la ausencia y/o deficiencia en la producción, o en la acción de la insulina, lo que afecta al metabolismo intermedio de los hidratos de carbono, proteínas y grasas (Secretaría de Salud, 2010).

#### 4.1.1. Clasificación de la diabetes mellitus

- Diabetes gestacional: es la alteración en el metabolismo de los hidratos de carbono que se detecta por primera vez durante el embarazo, debido a una insuficiente adaptación al efecto de la resistencia de la insulina que se produce en la mujer gestante fundamentalmente en el tercer trimestre (Secretaría de Salud, 2010). La resistencia a la insulina durante el tercer trimestre del embarazo, parece ser una respuesta adaptativa que propicia una mayor disponibilidad de nutrientes para ser transportados preferentemente hacia el feto. Este mecanismo, en conjunto con los efectos combinados del lactógeno placentario humano, la progesterona, el estradiol y el cortisol, que actúan como hormonas contra-reguladoras, garantiza un apropiado suministro de nutrientes necesarios para el crecimiento y desarrollo fetal (Butte, 2000). A pesar de que el incremento de la resistencia a la insulina, es un fenómeno normal durante el embarazo, cuando es desproporcional, genera la DM gestacional, y también favorece el desarrollo de la hipertensión gestacional, otra condición patológica que se puede observar durante el embarazo (Seely y Solomon CG, 2003).
- Diabetes tipo 1: se caracteriza por la destrucción de células  $\beta$  del páncreas, generando una deficiencia en la producción de insulina. Los pacientes pueden ser de cualquier edad, pero se presenta frecuentemente durante la adolescencia, la mayoría suelen ser delgados y presentar un comienzo abrupto

de signos y síntomas asociados a la insulinopenia antes de los 30 años de edad.

- **Diabetes tipo 2:** es el tipo de diabetes en la que se presenta resistencia a la insulina y en estadios avanzados, se puede manifestar en forma concomitante una deficiencia en su producción, que puede ser relativa o absoluta. Los pacientes suelen ser mayores de 30 años y al realizarse el diagnóstico son frecuentemente sujetos con sobrepeso u obesidad (Secretaría de Salud, 2010).

La DM es un padecimiento complejo, caracterizado por la presencia de una serie de alteraciones fisiológicas que comprometen el control metabólico de los pacientes, lo cual favorece el desarrollo de complicaciones, tanto agudas como crónicas. Dentro de las primeras, la hiperglicemia es un riesgo latente, otras son la cetoacidosis diabética y el coma hiperosmolar no cetósico. Si bien, las agudas son más graves a corto plazo, la educación diabetológica y la mejora en la atención primaria de salud, han contribuido considerablemente a la disminución estas complicaciones. Las complicaciones crónicas se relacionan con los años de evolución de la enfermedad y el grado de control conseguido, tanto de la hiperglicemia en sí, como de los otros factores de riesgo vascular (Piniés, 2002). Las complicaciones crónicas de la enfermedad se pueden clasificar en macrovasculares, entre las cuales se encuentran la cardiopatía isquémica, arteriopatía periférica y enfermedad renal isquémica, y microvasculares como la nefropatía, retinopatía y neuropatía (Piniés, 2002).

#### **4.1.2. Incidencia en la población**

La epidemia de la DM es reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una amenaza mundial, se calcula que en el mundo existen más de 347 millones de personas con diabetes. El reto en términos de lo que representa para la sociedad es doble: por un lado, el monto importante de recursos que requieren los prestadores de servicios de salud para su atención, y por el otro el

costo económico y emocional para las personas con diabetes y sus familias (OMS, 2012).

De acuerdo a la información de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) 2016 existe un total de más de 6 millones de adultos mexicanos con diabetes, es decir, 9.4% de los adultos en México han recibido ya un diagnóstico de diabetes. El total de personas adultas con diabetes podría ser incluso el doble, de acuerdo a la evidencia sobre el porcentaje de diabéticos que no conocen su condición. En México, la DM ocupa el primer lugar en número de defunciones por año, tanto en hombres como en mujeres las tasas de mortalidad presentan una tendencia ascendente en ambos sexos con más de 70 mil muertes y 400,000 casos nuevos anuales (Secretaría de Salud, 2016).

## **4.2. Productos finales de glicación avanzada**

### **4.2.1. Antecedentes sobre la glicación**

Las primeras observaciones sobre las reacciones entre carbohidratos y aminoácidos se realizaron por el químico francés Louis Camille Maillard en 1912 al realizar estudios sobre la conservación de alimentos. El describió la formación de productos café-oscuros o amarillo marrón, que se originaban durante el calentamiento de mezclas de aminoácidos y carbohidratos (Méndez, 2003; Rodríguez, 2009; Cárdenas et al., 2009).

En las ciencias biomédicas la reacción de Maillard, también llamada glicosilación no enzimática y recientemente denominada glicación (este último término aceptado preferentemente) se refiere a un amplio conjunto de reacciones no enzimáticas ocurridas entre azúcares reductores y grupos amino libres de proteínas, pero también, en menor grado con lípidos y ácidos nucleicos, que se desarrollan en varias etapas: las iniciales son reversibles y se llevan a cabo en tiempos relativamente cortos, mientras que las posteriores transcurren más lentamente y son irreversibles, originando una serie de compuestos denominados genéricamente como productos finales de glicación avanzada (AGEs) (Méndez, 2003; Cárdenas et al., 2009). La velocidad con la que se forman los AGEs depende directamente de la concentración y del tipo de azúcares que estén

reaccionando; la glucosa reacciona lentamente, mientras que los azúcares intracelulares como la glucosa-6-fosfato o la fructosa forman AGEs más rápidamente (Sinhg et al., 2001).

En los años 70, con los estudios realizados sobre la hemoglobina glicosilada, se retomó la atención sobre la reacción de Maillard, y se le dio la debida importancia, como la vía a través de la cual la estructura y función de proteínas son modificadas *“in vivo”*. Se descubrió una variante de hemoglobina denominada hemoglobina A1c (HbA1c), que es el resultado de una modificación postraducciona de la hemoglobina por la glucosa. Se comprobó que la HbA1c aumentaba en función de la glicemia en los pacientes diabéticos y empezó a medirse por los laboratorios clínicos para el seguimiento del control glicémico de estos pacientes (Bishop et al., 2010; Rodríguez, 2009).

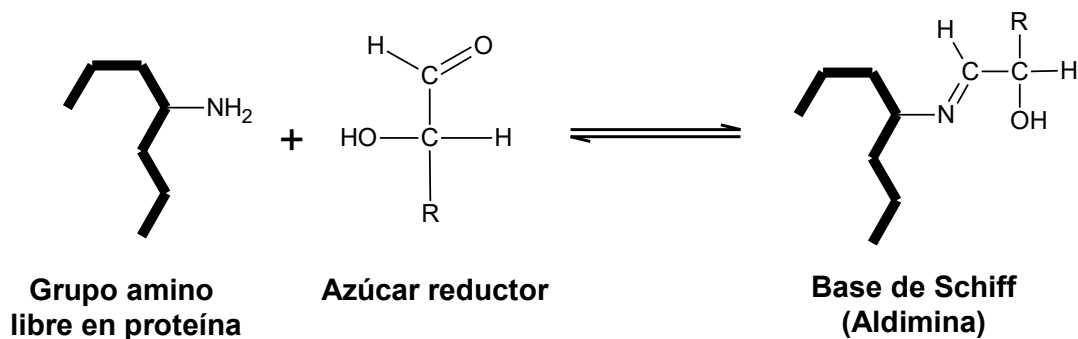
#### **4.2.2. Formación y estructura de AGEs**

La glicación de proteínas inicia por una reacción amino-carbonilo entre el grupo amino libre de las proteínas (N-terminal  $\alpha$  aa ó  $\epsilon$ -aa de arginina y lisina) y el grupo carbonilo de un azúcar reductor (reacción de Maillard) para formar una Base de Schiff; la cual sufre una serie de re-arreglos para formar una molécula más estable conocidas como productos de Amadori. Un ejemplo de esta reacción es la HbA1c, que resulta de la interacción de una molécula de glucosa con el grupo amino (N)-terminal de la valina de la cadena  $\beta$  de la hemoglobina (John y Lamb, 1993).

Los productos de Amadori experimentan, a su vez, diferentes reacciones produciendo así una amplia gama de productos intermedios, los cuales sufren entre otras reacciones condensación, deshidratación, para así formar aductos estables o productos de entrecruzamiento covalentes. Estos productos finales son heterogéneos y han sido llamados colectivamente como AGEs. El grado de glicación que pueden sufrir las proteínas, depende de la concentración de glucosa y el tiempo de interacción que con ella tengan las proteínas séricas o de la matriz extracelular de los tejidos y órganos como el riñón. La formación de los AGEs es un proceso lento y paulatino, cuyas fases iniciales son reversibles y sus fases o reacciones más avanzadas son irreversibles.

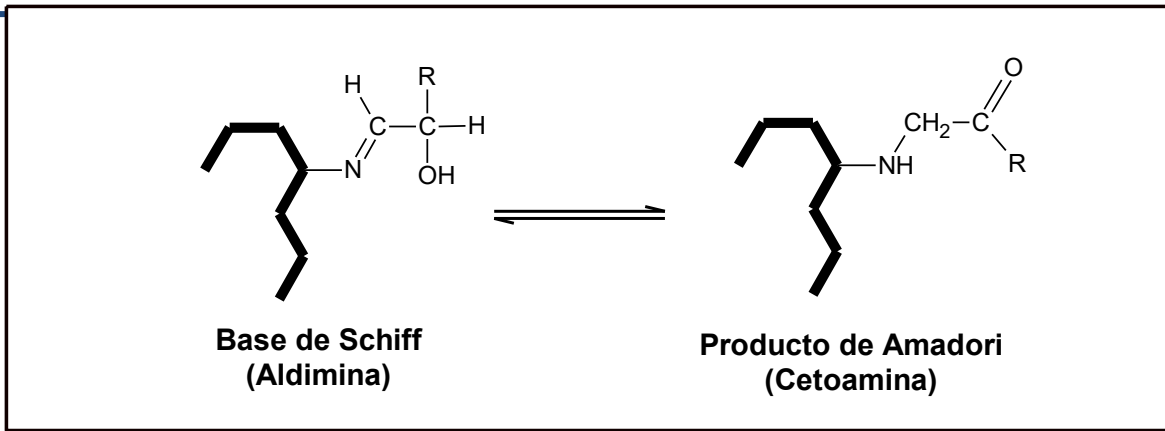
Las primeras reacciones que conllevan a la formación de los productos iniciales de glicación ocurren rápidamente, de horas a días e incluyen la formación de las bases de Schiff. Las etapas siguientes, hasta la formación de los productos de Amadori (productos de glicación intermedios) ocurren en semanas; tanto estas como las primeras reacciones son reversibles si las concentraciones de glucosa disminuyen. Las siguientes etapas requieren más tiempo para llevarse a cabo del orden de meses y son irreversibles conduciendo a la formación de los AGEs.

En la primera etapa de la reacción de Maillard el grupo carbonilo de los azúcares reductores como glucosa y fructosa, reacciona con grupos amino libres de las proteínas; principalmente con el amino terminal y con los residuos de arginina y lisina, sin la participación de enzimas. Originándose así una aldimina reversible denominada base de Schiff, la cual se forma en horas (Figura 1) (Méndez, 2003; Cárdenas et al., 2009).



**Figura 1. Formación de la base de Schiff. Los azúcares reductores reaccionan con los grupos amino libres de las proteínas, sin la participación de enzimas, para formar una aldimina reversible.**

A continuación este producto intermedio sufre un reacomodo interno del doble enlace para formar una cetoamina reversible llamada producto de Amadori o fructosamina (1-amino-1-desoxifruktosa, si el azúcar es la glucosa), esta transformación ocurre en días (Figura 2) (Méndez, 2003; Cárdenas et al., 2009).



**Figura 2. Formación del producto de Amadori. Por reacondo interno del doble enlace, la base de Schiff forma una cetoamina reversible.**

Hasta este punto las reacciones son completamente reversibles y los productos no se acumulan indefinidamente sino que alcanzan su concentración de equilibrio y su nivel *“in vivo”* dependerá fundamentalmente de la concentración de glucosa presente (Rodríguez, 2009). Ejemplos de esta primera etapa son la hemoglobina y proteínas séricas glicadas, que se determinan en el laboratorio clínico bajo el nombre de prueba de HbA1c y prueba de fructosamina respectivamente, para monitorear el control de glicemia en pacientes diabéticos durante períodos cortos de tiempo de hasta 3 meses; estas proteínas son productos de Amadori, estructuras intermedias en la formación de los AGEs (Bishop et al., 2010; Gugliucci, 2000; Sinhg et al., 2001).

Si el estado de hiperglicemia se prolonga, los productos de Amadori sufren una serie de reacciones de deshidratación, condensación, oxidación y ciclización, generándose un grupo heterogéneo de estructuras unidas a las proteínas llamados AGEs. Este último proceso es irreversible y toma semanas o meses, por lo que ocurre principalmente sobre proteínas de vida media larga, como las que forman parte de la matriz extracelular (colágeno y elastina) y sobre proteínas plasmáticas tales como las inmunoglobinas, albumina y lipoproteínas de baja densidad (Méndez, 2003; Cárdenas et al., 2009; Sinhg et al., 2001).

En la Figura 3 se observa una representación esquemática del proceso de formación de un tipo de AGE derivado de glucosa con actividad de entrecruzamiento.

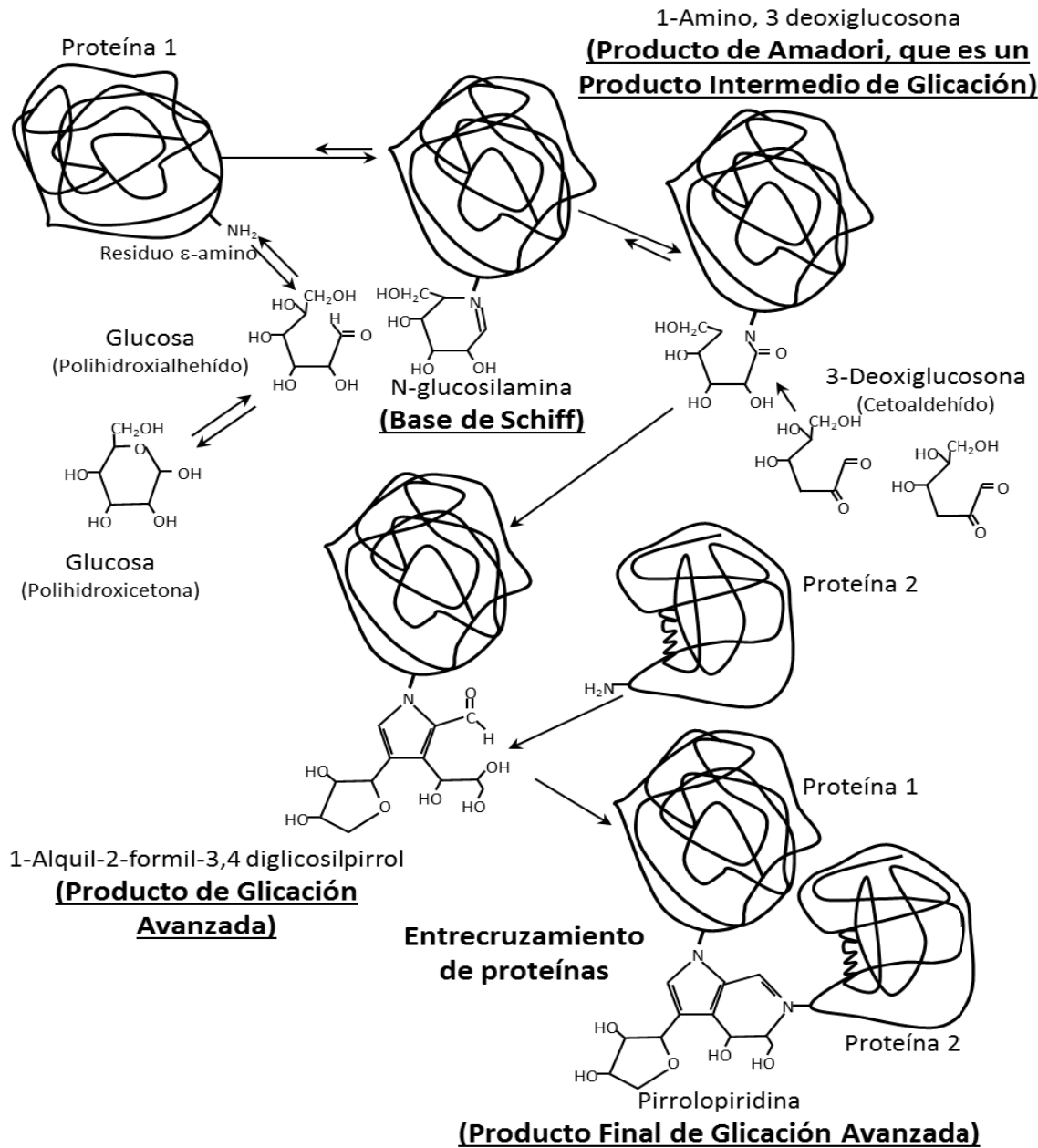


Figura 3. Esquema de la síntesis de un AGE derivado de glucosa con actividad de entrecruzamiento de proteínas.

Los AGEs pueden formarse por medio de reacciones oxidativas y no oxidativas. Cuando las reacciones que les dan origen son oxidativas, el proceso en conjunto se conoce como glicoxidación y mediante este, se forman AGEs tales como la carboximetil lisina (CML) y pentosidina; mientras que por procesos no oxidativos se forman AGEs como pirralina, entre otros muchos (Cárdenas et al., 2009; Sinhg



et al., 2001). De gran importancia durante la reacción de Maillard es la formación de productos intermediarios reactivos. Estos productos son conocidos como oxoaldehídos e incluyen compuestos como glioxal, metilglioxal y 3-desoxiglucosona (3-DG), sin embargo, estos compuestos también pueden generarse a partir de otras rutas metabólicas como la de los polioles o a través del catabolismo de los cuerpos cetónicos (Sinhg et al., 2001). Los oxoaldehídos pueden dar lugar a AGEs como CML, carboxietil lisina (CEL) y pirralina, y también a los productos de entrecruzamiento o dímeros de lisina: dímero de lisina y glioxal (GOLD), dímero de lisina y metilglioxal (MOLD) y dímero de lisina y desoxiglucosona (DOLD) (Figura 4) (Cárdenas et al., 2009; Sinhg et al., 2001).

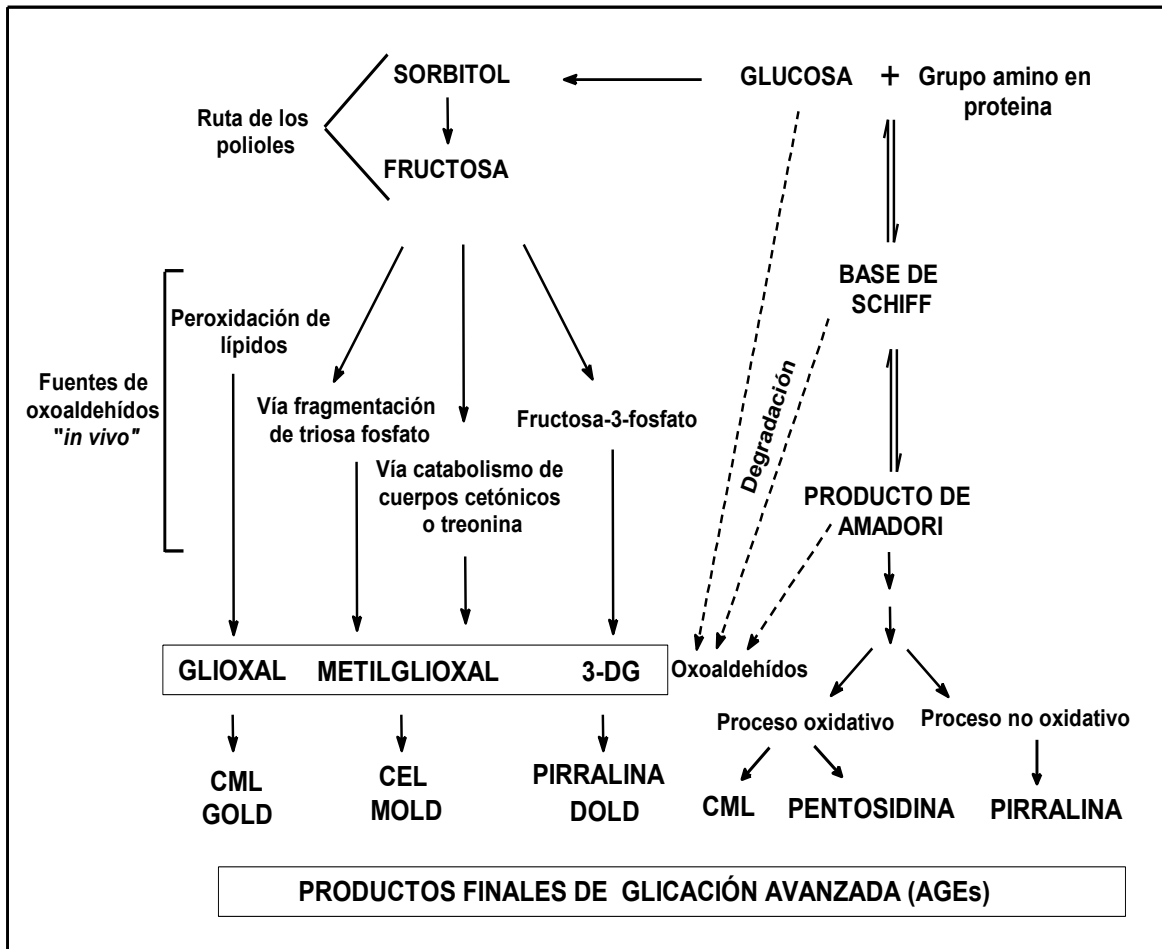


Figura 4. Formación de AGEs. Proceso de generación de AGEs en el cual se incorpora la ruta de los polioles y la formación de oxalaldehídos.

Los AGEs son compuestos estructuralmente heterogéneos y de vida media larga. Muchos de estos productos están fuertemente pigmentados y algunos de ellos fluorescentes, así mismo, algunos tienen la propiedad de formar entrecruzamiento AGE-AGE (Figura 5). Entre los diferentes tipos de AGEs, la CML y la pentosidina son los que más comúnmente se forman tanto *in vivo* como *in vitro*. Los estudios realizados a la fecha, sugieren que los AGEs conocidos constituyen sólo una pequeña fracción de aquellos que se producen *in vivo*. A pesar de los avances, se desconocen en gran medida, tanto los procesos que llevan a la formación de AGEs *in vivo*, como la estructura de los mismos; sin embargo, se considera que los AGEs obtenidos *in vitro* bajo condiciones similares a las patológicas que caracterizan a la DM (hiperglicemia), comparten epítopes y

dominios comunes con las proteínas modificadas por AGEs “*in vivo*” (Cárdenas et al., 2009).

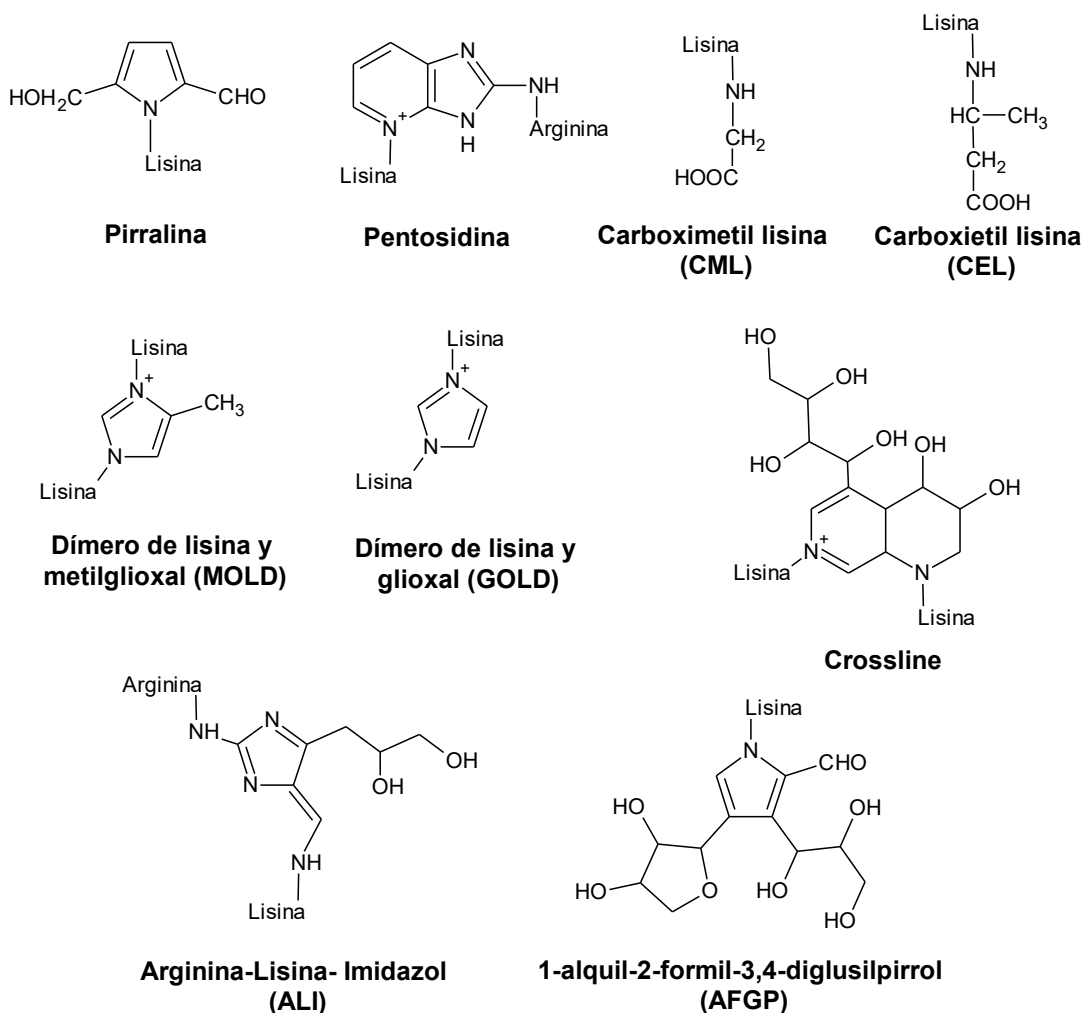


Figura 5. Estructura química de varios AGEs y sus nombres triviales.

#### 4.2.3. Mecanismos de daño inducido por AGEs

Entre los mecanismos a través de los cuales los AGEs producen daño a tejidos y órganos, se encuentran los siguientes: modificación de proteínas funcionales extracelulares, de proteínas estructurales, generación de procesos de señalización intracelulares a través de uniones a receptores de membrana, y modificación de proteínas intracelulares (Cárdenas et al., 2009; Goldin et al., 2006).

#### 4.2.3.1. Modificación de proteínas funcionales extracelulares y estructurales

La formación de AGEs modifica las propiedades funcionales de las moléculas de la matriz extracelular. La glicación del colágeno o cualquier otra proteína de la matriz, favorece la formación de entrecruzamientos AGE-AGE entre diferentes zonas de la misma proteína, entre diferentes proteínas, así como también, con proteínas del plasma sanguíneo (como albumina, inmunoglobulinas y lipoproteínas de baja densidad). Estos productos de entrecruzamiento forman aglomerados insolubles y resistentes a proteasas, produciendo engrosamiento de la membrana basal e hipertrofia de la matriz extracelular. En los capilares sanguíneos esto trae como consecuencia aumento de la permeabilidad, reducción de la luz, pérdida de la flexibilidad vascular, estado protrombótico y disminución del flujo sanguíneo; lo cual conlleva a la aparición de alteraciones microvasculares en la retina y en el glomérulo, entre otros (Gugliucci, 2000; Cárdenas et al., 2009; Goldin et al., 2006). En estudios "*in vitro*" e "*in vivo*" se ha demostrado que en el caso de la nefropatía diabética, la formación de AGEs en la colágena tipo IV, laminina, fibronectina y proteoglicanos heparán sulfato, proteínas que forman parte de la membrana basal glomerular (MBG), altera la estructura de ésta. Dichas moléculas, a su vez, son las que aportan la carga negativa a la MBG que evita el paso de proteínas. Estos cambios traen como consecuencia la pérdida de las propiedades de filtración selectiva de la MBG y, por lo tanto, la incapacidad del glomérulo para retener proteínas, lo cual resulta en proteinuria.

Se considera que el riñón normal elimina eficientemente los AGEs circulantes, pero que en la disfunción renal, y particularmente en asociación con la diabetes, estos productos se acumulan en el suero. Por lo tanto, en la nefropatía diabética ocurre una alta tasa de producción de AGEs y éstos a su vez, no son eliminados adecuadamente por el riñón, lo cual favorece el incremento de su vida media en el torrente sanguíneo, así como su acumulación, favoreciendo sus efectos nocivos sobre tejidos y órganos (Gugliucci, 2000; Cárdenas et al., 2009).

Entre las diferentes proteínas funcionales extracelulares, las lipoproteínas de baja densidad (LDL) han sido de las más estudiadas en relación a como son afectadas por la glicación, debido a que tienen una participación clave en el proceso

aterogénico y por tanto en el desarrollo de las complicaciones micro y macroangiopáticas de la diabetes. Las LDL transportan la mayor parte del colesterol plasmático y lo distribuyen a las células que lo requieren. Las células captan estas lipoproteínas (LP) por fijación a receptores de membrana, a través de la fracción apoB, para que posteriormente puedan catabolizarlas. En los pacientes diabéticos, si bien la concentración de LDL se mantiene muchas veces dentro del rango normal, se producen alteraciones en las fracciones componentes, en el diámetro, en la densidad y en la composición lipídica, que las hacen más aterogénicas (Actis y Rebolledo, 2000). También en los diabéticos, una gran porción de LDL se encuentra glicada y oxidada, lo que interfiere en el reconocimiento de la LDL por sus receptores específicos de membrana en las células, disminuyendo su fijación y degradación, y favoreciendo el aumento del nivel plasmático de LDL. Así mismo, las LDL modificadas son captadas por los macrófagos, a través de los receptores de AGEs o de los receptores para LP, transformándose en células espumosas en la íntima de las arterias, con la consiguiente formación de ateromas (Sinhg et al., 2001).

#### **4.2.3.2. Efectos mediados por receptores**

Se considera que muchos de los efectos patológicos de los AGEs se generan a través de su unión a los receptores específicos (RAGE por sus siglas en inglés: Receptor of AGEs). En células endoteliales, la interacción de AGE con RAGE activa vías de señalización intracelular, que incluyen la proteína cinasa C y las MAP cinasas, entre otras. Éstas inducen la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO), vía activación de la NADPH oxidasa, disfunción de la cadena de transporte de electrones mitocondrial y depleción de glutatión reducido y vitamina C. Por otro lado, la unión de AGE con RAGE disminuye la producción de óxido nítrico, al reducir la actividad de la óxido nítrico sintasa endotelial, disminuyendo la capacidad de relajación del tono vascular. El incremento del estrés oxidativo, a través de estos procesos, favorece la ocurrencia de cambios potencialmente dañinos en la expresión génica, misma que modifica la función celular por la inducción de respuestas inflamatorias, vasoconstricción y expresión de genes

protrombóticos, eventos relacionados con disfunción endotelial y aterosclerosis (Gugliucci, 2000; Cárdenas et al., 2009; Sinhg et al., 2001; Goldin et al., 2006).

#### **4.2.3.3. Modificación de proteínas intracelulares**

Los AGES también se pueden formar dentro de las células, como consecuencia de la hiperglucemia intracelular. El proceso de glicación intracelular se lleva a cabo con la participación de azúcares como glucosa-6-fosfato, gliceraldehído-3-fosfato y fructosa, esta última derivada de la vía de los polioles. El factor básico de crecimiento de fibroblastos en células endoteliales, además de las proteínas histonas de hepatocitos y en células beta de islotes de Langerhans, son ejemplos de proteínas intracelulares modificadas por AGES. También se ha detectado insulina glicada dentro de células beta pancreáticas y en plasma, con concentraciones elevadas, en ratones y sujetos diabéticos. La glicación afecta la actividad biológica de estas proteínas y podría contribuir a la resistencia a la insulina, en la DM tipo 2 (DM II) (Gugliucci, 2000; Cárdenas et al., 2009).

#### **4.2.4. Degradación y eliminación de AGEs**

Bajo condiciones fisiológicas, la generación de AGEs ocurre de manera constante y baja y es controlada por mecanismos de degradación y eliminación de los mismos. Se ha propuesto que el principal mecanismo de degradación de AGEs ocurre a través de endocitosis mediada por receptores presentes en los macrófagos (Cárdenas et al., 2009).

La proteólisis de AGEs produce péptidos-AGE y aductos-AGE libres (AGE unidos a uno o dos aminoácidos), los cuales son liberados a la circulación. Los aductos-AGE son eliminados directamente por vía renal, mientras que los péptidos-AGE son retomados por endocitosis en el túbulo contorneado proximal del riñón y degradados en aductos-AGE, aunque algunos péptidos-AGE regresan íntegramente a la circulación. Estos péptidos-AGE se pueden unir covalentemente a otras proteínas como colágeno, LDL y fosfolípidos, originando una segunda generación de AGEs más reactivos y agresivos que los AGEs de los cuales

derivan. Estos AGEs más reactivos, se incrementan en situaciones de daño renal, más aún asociado a DM, por lo que probablemente contribuyen a acelerar el daño vascular extrarrenal en estos pacientes (Gugliucci, 2000; Cárdenas et al., 2009; Sinhg et al., 2001).

#### **4.3. Enfermedad renal crónica: principal complicación de la diabetes mellitus**

La DM II es un padecimiento crónico de etiología multifactorial, (Kolb y Mandrup-Poulsen, 2009; Raciti et al., 2015). La DM II se caracteriza por una inflamación crónica y una resistencia al efecto de la insulina asociadas con una elevación crónica del estrés oxidativo (Matough et al., 2012), todas estas alteraciones inducidas por un estado de hiperglicemia crónica. Los criterios de diagnósticos son: 1) Glucosa plasmática en ayuno (de por lo menos 8 horas)  $\geq 126$  mg/dL; 2) Glucosa  $> 200$  mg/dL a las 2 horas después de una prueba de tolerancia oral a la glucosa; 3) Concentración de glucosa plasmática casual  $\geq 200$  mg/dL (American Diabetes Association, 2013).

La prevalencia mundial de DM II en adultos en el 2010 fue de 6.4%, afectando a 285 millones de personas, se estima que aumentará a 7.7%, con 439 millones de adultos para el 2030; y que entre el 2010 y 2030 habrá un incremento del 69% en el número de adultos con diabetes en países en vía de desarrollo y el 20% en países desarrollados (Shaw et al., 2010).

En México, se ha observado un incremento en la prevalencia de DM, de acuerdo a la ENSANUT 2016, la prevalencia de DM en los adultos fue de 9.4%, mientras que en el 2012 era de 9.2% y 7.3% en el año 2006 (Jiménez-Corona et al., 2013).

Las complicaciones de la DM son la principal causa de mortalidad en México y en el mundo (Organization, 2008). Estas han sido divididas en macro y micro-vasculares. Entre las complicaciones macro-vasculares se encuentran aterosclerosis, enfermedad cerebrovascular. Mientras que entre las complicaciones de la micro-vasculatura se encuentran la neuropatía, retinopatía y la nefropatía (Russell y Cooper, 2015).

Las complicaciones de la DM generan costos directos asociados al gasto en la atención médica (incluyendo servicios médicos y medicamentos) e indirectos,

aquéllos relacionados con el efecto que tienen la mortalidad prematura y la discapacidad en la capacidad de participación de una persona en el mercado laboral y su desempeño en el mismo. Un estudio realizado en el 2013 (Barraza-Lloréns M, et al., 2015) encontró que “la carga económica de la diabetes se estimó en 362,859.82 millones de pesos, es decir 2.25% del PIB de ese mismo año. Los costos directos de la DM II en México se estimaron en \$179,495.3 millones de pesos en el año 2013, lo que representa el 1.11% del Producto Interno Bruto (PIB) de ese mismo año. El costo de la atención médica de las principales complicaciones de la DM II representa el mayor porcentaje (87%) de los costos directos”.

En conjunto, la atención médica de las complicaciones y la pérdida de ingresos por la muerte prematura, representan el 80% de la carga económica por esta enfermedad, y cada una asciende a poco menos de un punto porcentual del PIB (0.97% y 0.83%), respectivamente.

Entre las complicaciones de la diabetes, la de mayor impacto en los costos de la atención médica es la nefropatía en etapa 5, con 38% del costo total asociado a las complicaciones. La fase más severa de la nefropatía corresponde a la insuficiencia renal crónica, y los pacientes que la padecen requieren el uso continuo de intervenciones muy costosas, como diálisis peritoneal ó hemodiálisis.

La Enfermedad Renal Crónica (ERC) en el paciente diabético es una de las principales complicaciones de la DM II. La DM II junto con la hipertensión arterial son consideradas las primeras causas de enfermedad renal crónica terminal (Thomas y Karalliedde, 2015). La ERC en el paciente diabético se caracteriza inicialmente por la pérdida de proteínas en orina y posteriormente por la disminución de la tasa de filtrado glomerular (TFG) con un periodo de progresión de 10 a 20 años (González Suarez et al., 2013).

De acuerdo con las Guías KDIGO (Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group, 2013), la definición de ERC es daño renal por más de tres meses ya sea por anormalidades estructurales o funcionales del riñón con o sin disminución de la TFG manifestada por irregularidades patológicas o marcadores de daño renal en sangre u orina, o pruebas de imagen.



De acuerdo a la progresión del deterioro de la función renal se han establecido cinco estadios que van desde una TFG normal-elevada hasta la pérdida total de la capacidad de filtración (Tabla 1).

**Tabla 1. Clasificación de los estadios de la ERC de acuerdo a la TFG.**

Estadio TFG	TFG (mL/min/1.73 m <sup>2</sup> )	Descripción
<b>G1</b>	≥90	Normal o elevada
<b>G2</b>	60-89	Levemente disminuida*
<b>G3a</b>	45-59	Ligera a moderadamente disminuida
<b>G3b</b>	39-44	Moderada a gravemente disminuida
<b>G4</b>	15-29	Gravemente disminuida
<b>G5</b>	<15 (o diálisis)	Falla renal

\*En adultos jóvenes; en ausencia de evidencia de daño renal, la categoría G2 cumple con los criterios de ERC.

#### 4.3.1. Pruebas de diagnóstico y vigilancia de la nefropatía diabética

La TFG brinda un cálculo aproximado de la cantidad de sangre que pasa a través de los glomérulos, es expresada como mL/min, y es considerado como el mejor indicador para medir el daño renal crónico (Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group, 2013).

Para la estimación de la TFG intervienen diferentes factores como son: tamaño corporal, sexo (siendo en los hombres aproximadamente 8% mayor comparado con las mujeres), raza, edad, estado fisiológico, consumo de proteína, y la tasa de filtración por unidad de tiempo de alguna sustancia en suero, usualmente creatinina (Rosner y Bolton, 2006).

El uso de creatinina sérica como indicador de TFG se basa en tres aspectos teóricos: 1) La creatinina es un marcador ideal de filtración glomerular pues es un compuesto que difunde libremente a través del glomérulo; 2) La tasa de excreción creatinina es constante a lo largo del tiempo; y 3) La medición es reproducible en cualquier laboratorio. Sin embargo, lo anterior no siempre es estrictamente cierto, dado que la medición de creatinina depende tanto de la excreción, como del catabolismo del tejido muscular, mismo que es dependiente de la magnitud de la

masa muscular, del sexo, y del consumo dietético de proteínas. Por esta razón las Guías KDIGO de Práctica Clínica sugieren que “las ecuaciones matemáticas para evaluar la TFG basadas en la medición de creatinina sérica son más precisas que la estimación de TFG hecha a partir de la medición aislada de creatinina sérica”.

A lo largo del tiempo se han propuesto diferentes fórmulas para el cálculo de la TFG, actualmente se reconoce que la ecuación propuesta por Levey en el 2009 es la más precisa; esta propone ecuaciones tanto para hombres como para mujeres dependiendo de los niveles de creatinina sérica, así como por grupos étnicos (Levey et al., 2009).

Para lograr una mejor estimación, se sugiere ajustar por el área de superficie corporal los resultados derivados de la fórmula matemática (Chew-Harris et al., 2015; Hongwei et al., 2015). Una vez hecho este ajuste, los datos serán expresados como: mL/min/1.73 m<sup>2</sup> de superficie corporal.

Existen diferentes pruebas complementarias y factores de riesgo que se deben tener en cuenta para el diagnóstico y vigilancia del daño renal, entre ellas destaca el uso de la microalbuminuria y pruebas histopatológicas o de imagen. Estas últimas son más precisas, sin embargo, por su propia naturaleza invasiva y altos costos, resultan poco utilizadas. Dentro de los factores de riesgo deben tenerse en consideración la presencia o no de hipertensión y diabetes.

En la práctica clínica, la microalbuminuria o recientemente nombrada albuminuria moderada (AM), es una de las pruebas diagnósticas de daño renal más empleadas en los pacientes de riesgo. Ésta detecta la aparición de pequeñas cantidades de albumina en orina. La AM se define como la excreción urinaria de albúmina de 30-300 mg/día en una recolección programada de orina de 24 horas; o de 17-250 mg/g creatinina urinaria para hombres o de 25-335 mg/g de creatinina urinaria para mujeres, en muestras aleatorias. Sin embargo, dado que existen factores que afectan la excreción urinaria de albumina como edad, sexo, estado fisiológico hipertensión, diabetes, infecciones de vías urinarias o consumo excesivo de proteínas existe controversia por el uso de la AM “aislada” como prueba diagnóstica de daño renal. En sujetos con factores de riesgo, existen algoritmos para el tamizaje y tratamiento del paciente (Ruggenti y Remuzzi,

1998), los cuales consisten en tomar dos o tres mediciones consecutivas en un período de tres a seis meses para confirmar la presencia de albuminuria, así como la evaluación del control glicémico en los pacientes diabéticos.

En la nefropatía diabética, la hiperglicemia es la causa fundamental del deterioro de la función renal. Por lo que otro de los marcadores de vigilancia propuesto por las Guías KDIGO es la Hemoglobina Glicosilada A1c (HbA1c), estas guías recomiendan mantener concentraciones alrededor 7.0% para prevenir o frenar la progresión de la microalbuminuria.

#### **4.3.2. Historia natural de la enfermedad renal crónica en el paciente diabético y pruebas diagnósticas**

De acuerdo a la historia natural de la ERC en el paciente diabético, entre el 20 y 40% de los pacientes con DM tipo 2 que presentan microalbuminuria desarrollarán daño renal, y de estos aproximadamente el 20% evolucionará a enfermedad renal crónica terminal (Molitch et al., 2004). El tiempo de evolución de la ERC y las pruebas diagnósticas sugeridas para cada etapa, se presentan en la Figura 6.

En una primera etapa, conocida como nefropatía incipiente, se experimenta un estado de hiperfiltración, es decir, hay un aumento en la actividad de las nefronas para compensar el daño tisular. En este estadio la prueba de tamizaje que permite una valoración de la función renal corresponde a la albuminuria moderada dado que la creatinina sérica y la TFG se mantienen en los niveles de “normalidad”.

Posteriormente, alrededor de diez a quince años de haber iniciado el deterioro de la función renal se presenta una disminución progresiva e irreversible de la TFG (nefropatía crónica), donde aún la microalbuminuria pudiera estar enmascarando la disminución franca de la filtración glomerular, misma que en un periodo de 15 a 20 años evolucionará a un estado terminal. Por otro lado no es sino hasta que hay una pérdida del 50% de la capacidad renal funcional que tanto la TFG como la creatinina sérica brindan un diagnóstico franco de daño (Guyton y Hall, 2001).

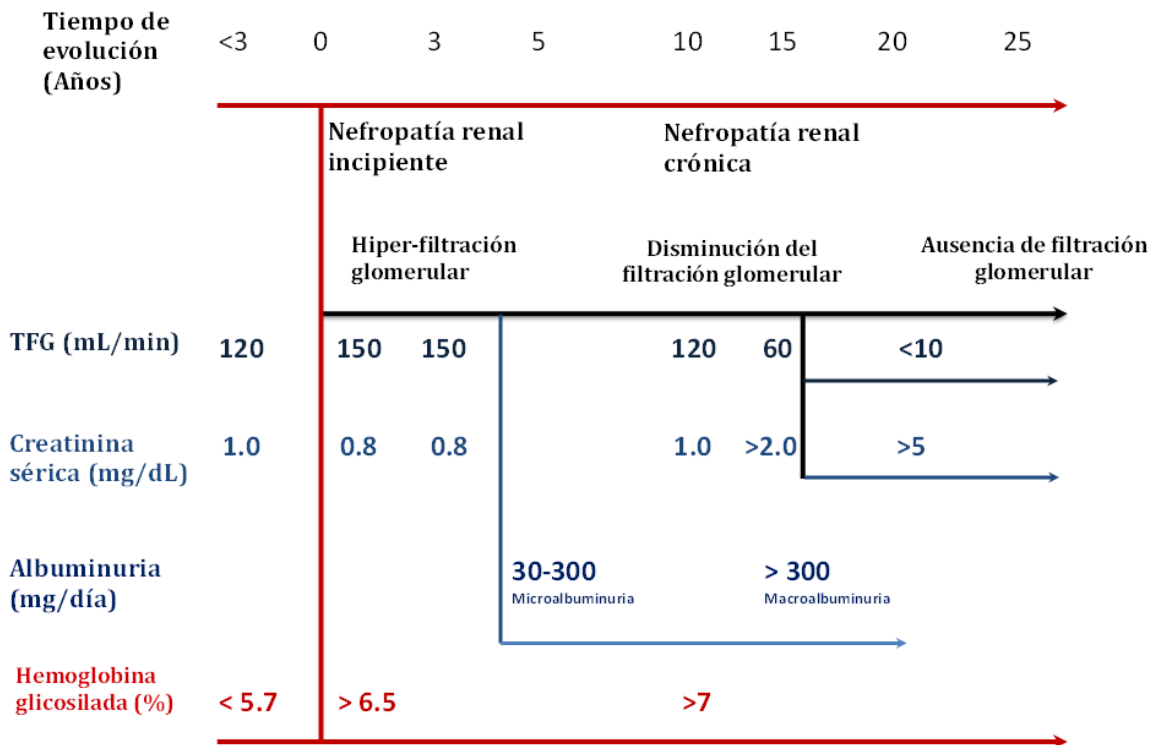


Figura 6. Tiempo de evolución y pruebas diagnósticas de la enfermedad renal crónica.

En cuanto a la HbA1c, cuyos valores normales se encuentran alrededor de 5.7%, es una prueba de control glicémico que en la práctica clínica se ha utilizado como un indicador proxy de riesgo para macroalbuminuria en el paciente diabético. De acuerdo con las Guías KDIGO valores <math>< 7.0\%</math> se asocian con prevención o retraso de la progresión de la nefropatía diabética. Sin embargo, debido a la naturaleza de la hemoglobina como una proteína transportadora de vida media relativamente corta no permite hacer una evaluación del estado de glucémico más allá de 3 meses.

#### 4.3.3. Efecto de la hiperglicemia sobre el deterioro de la función renal

La hiperglicemia induce a daños tisulares por diferentes mecanismos moleculares, se ha propuesto los siguientes: 1) Aumento de la ruta de los polioles, 2) Activación de la ruta diacilglicerol (DAG)/proteína C kinasa (PKC), 3) Aumento del estrés oxidativo y 4) El aumento de la formación y acción de los AGEs (Aronson, 2008; Negre-Salvayre et al., 2009).

La glicación de proteínas es un proceso que ocurre a través de reacciones no enzimáticas entre los grupos aminos de las proteínas y los grupos aldehídos de los azúcares reductores, fundamentalmente la glucosa. La formación de AGEs es un proceso típico durante el envejecimiento, pero se acelera bajo condiciones patológicas de hiperglicemia (Takahashi, 2015). A pesar de que dentro de los azúcares reductores, la glucosa presenta la menor velocidad de glicación comparada con la fructosa, glucosa-6-fosfato o gliceraldehído-3-fosfato (Vlassara y Uribarri, 2014), debido a que la glucosa se encuentra en concentraciones mucho más elevadas en un ambiente hiperglicémico, es la glucosa el azúcar que más favorece la formación de AGEs. Dichos AGEs formados a partir de la glucosa reciben el nombre de AGEs derivados de glucosa y reflejan mucho mejor el estado de control glicémico a largo plazo.

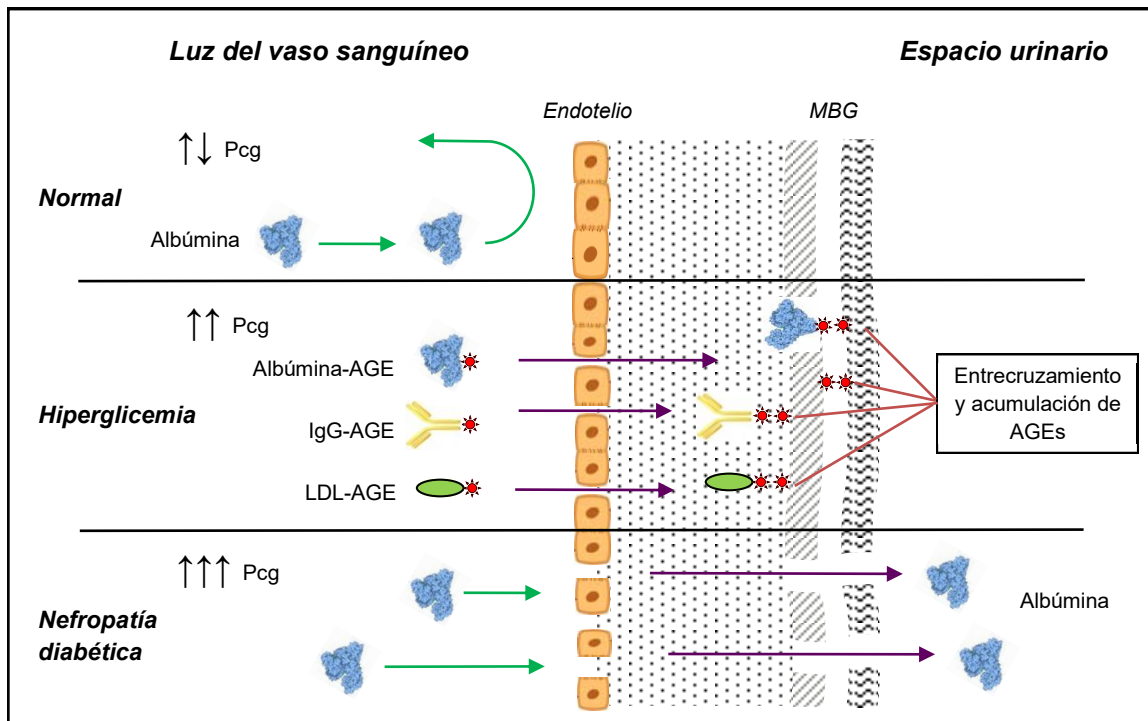
#### **4.3.4. Participación de los AGEs en el desarrollo del daño renal**

La formación de proteínas AGEs ocurre en los grupos aminos libres de las proteínas, los cuales frecuentemente se encuentran envueltos en actividades enzimáticas, esto tiene por resultado la inactivación de enzimas y disfunción del metabolismo celular. En particular la inactivación de enzimas anti-estrés oxidativo o enzimas de detoxificación carbonilica disminuye la capacidad del organismo de reaccionar contra estrés oxidativo y estrés carbonílico, lo que contribuye negativamente a la homeostasis celular.

Los AGEs juegan un papel clave en las alteraciones glomerulares tanto por su acumulación en la MBG así como, su interacción con las células mesangiales, endoteliales, podocitos y del túbulo contorneado proximal a través de la interacción con sus receptores de membrana tipo RAGE para la generación de ERO, citocinas pro-inflamatorias y apoptosis, todos estos fenómenos se encuentran relacionados con el daño glomerular, la aparición de la proteinuria y la predisposición general para la nefropatía diabética (Petrica et al., 2015).

En la Figura 7 se esquematiza las estructuras de la barrera glomerular de los vasos sanguíneos hasta el espacio urinario en condiciones normales, durante la

hiperglicemia y una vez establecido el daño renal mediado asociado a la formación de AGEs.



**Figura 7. Mecanismo de participación de los AGEs en el deterioro de la membrana basal glomerular que conduce al desarrollo de la nefropatía diabética y a la pérdida de proteínas séricas. Pcg: presión capilar glomerular, MBG: membrana basal glomerular.**

Como se puede observar, en condiciones normales existen diferentes mecanismos tanto hemodinámicos como la presión capilar glomerular (Pcg) y estructurales o mecánicos como son la integridad del endotelio vascular y de la MBG para mantener una permeabilidad selectiva de las moléculas de desecho.

Durante la hiperglicemia crónica, la glicación de proteínas funcionales y estructurales por descontrol glicémico se presenta aún antes de las primeras manifestaciones de la pérdida de proteínas en orina; posteriormente hay una disfunción de las estructuras glomerulares que conducen a la pérdida de la capacidad de filtración selectiva, fundamentalmente debida a la pérdida de las cargas negativas de la MBG y al incremento de espacios intracelulares en el endotelio que favorecen inicialmente la pérdida de proteínas séricas. Posteriormente y debido a los procesos pro-inflamatorios y a la cicatrización tisular se produce una drástica reducción en la tasa de filtración glomerular que conduce

a la necesidad del empleo de algún tipo de terapia de sustitución de la función renal, ya sea diálisis, hemodiálisis o trasplante renal (Soldatos y Cooper, 2006).

La producción de ERO relacionadas con la producción de AGEs y su efecto sobre la expresión de receptores de membrana tipo RAGE, así como la glicación de las proteínas mitocondriales y ADN son algunos de los posibles mecanismos para la propagación de una "memoria metabólica" que conduce a una expresión génica alterada que puede ser persistente incluso cuando la glicemia se ha normalizado (Jax, 2010; Zhang y Wu, 2014).

La interacción de AGEs con su receptor específico (RAGE), induce por una parte, la formación de ERO en las células mesangiales y de los túbulos intersticiales. Estimula la producción de factores pro-escleróticos como factor de necrosis tumoral  $\beta$  y factor de crecimiento de tejido conectivo a través de la vía MAPK (Petrica et al., 2015; Tanji et al., 2000). Por otro lado, dicha interacción favorece la inhibición de factores de transcripción de la familia FOXO en especial de FOXO4, lo que resta capacidad de respuesta celular ante el estrés oxidativo, inhibe el ciclo celular, altera el metabolismo celular y tiene efectos negativos sobre la reparación del daño del ADN, lo que promueve la apoptosis del podocito, del endotelio vascular y de los túbulos contorneados proximales, conduciendo al desarrollo de la enfermedad renal crónica asociada a la DM (Yamagishi y Matsui, 2010).

## 5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los AGEs son un grupo heterogéneo de estructuras químicas formadas por reacciones no enzimáticas entre la glucosa, u otros azúcares reductores, con proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Estos compuestos se forman en varias etapas: las iniciales son reversibles y se llevan a cabo en tiempos relativamente cortos, mientras que las posteriores transcurren más lentamente y son irreversibles. Los AGEs se generan de manera normal durante el proceso de envejecimiento, pero durante la DM se acelera su formación y acumulación.

En las últimas décadas la investigación biomédica ha aportado gran información en lo referente al papel que desempeñan los AGEs en los procesos fisiopatológicos que conducen al desarrollo de las complicaciones vasculares crónicas de la diabetes. Se sabe que estos compuestos alteran el funcionamiento de los tejidos, debido a que modifican las propiedades estructurales de las proteínas; por ejemplo, la formación de AGEs en las proteínas que conforman la membrana basal del glomérulo, trae como consecuencia la pérdida de las propiedades de filtración selectiva y, por tanto, la incapacidad del glomérulo para retener proteínas, lo que resulta en proteinuria y progresivamente en falla renal. Además los AGEs son capaces de modular múltiples procesos celulares por la unión a receptores específicos (RAGE), los cuales se encuentran en una gran variedad de células, lo que trae como consecuencia, el incremento del estrés oxidativo que altera el funcionamiento celular.

Diversos estudios han tratado de correlacionar las concentraciones circulantes de AGEs, con el nivel de gravedad de las complicaciones asociadas a la DM, lo que constituiría una herramienta de gran utilidad para el control de la enfermedad y la prevención de las complicaciones crónicas en los pacientes diabéticos. A pesar de ello, esto se ha visto limitado debido a la poca disponibilidad de ensayos comerciales para medir de forma confiable las concentraciones de estos compuestos. Los métodos existentes, como HPLC y espectrometría de masas, tienen la gran desventaja de no poder implementarse en laboratorios clínicos de rutina, debido a la utilización de equipo muy sofisticado para su realización, así como su baja capacidad de procesamiento simultáneo de muestras. Por lo cual,



algunos laboratorios han comenzado a desarrollar métodos para cuantificar estos compuestos mediante inmunoensayos, utilizando procedimientos propios para la generación de anticuerpos específicos anti-AGEs.

Recientemente, nuestro grupo de trabajo en el Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", ha desarrollado una metodología efectiva para producir anticuerpos específicos contra AGEs derivados de glucosa. Así mismo, hemos validado un radioinmunoanálisis (RIA) de competición en fase líquida con precipitación por segundo anticuerpo y estamos completando la validación analítica de un ensayo inmunoenzimático (ELISA). El RIA en fase líquida mide las proteínas glicadas intactas, mientras que el ELISA (en fase sólida), mide tanto proteínas glicadas intactas, como subproductos de su degradación tales como péptidos y aductos AGEs (de 1 a 3 aminácidos glicados).

En el presente estudio nos proponemos, con el empleo de estos métodos, establecer de forma comparativa las concentraciones típicas de AGEs en sujetos normoglicémicos controles y en sujetos diabéticos sin (creatinina sérica  $<1.3$  mg/dL) y con (creatinina sérica  $\geq 1.3$  mg/dL) daño renal crónico. Así como establecer valores de corte para las concentraciones séricas de AGEs medidos por ambos métodos, con el objetivo de evaluar comparativamente las capacidades analíticas de estos métodos para el tamizaje de sujetos con nefropatía diabética. Estas herramientas analíticas podrían ser de utilidad para la identificación de pacientes diabéticos que han estado sometidos a un proceso mayor de síntesis y acumulación de AGEs, mismos que a su vez, son aquellos sujetos que han acumulado más daños tisulares sin manifestaciones clínicas evidentes, debido al efecto tóxico de la hiperglicemia y que por ende son los pacientes que más probabilidades tienen de desarrollar alguna de las complicaciones crónicas de la DM. La introducción de la medición de AGEs pudiera convertirse en un procedimiento analítico preventivo, que puede contribuir significativamente a la reducción de los costos elevados de los tratamientos encaminados al manejo de las complicaciones crónicas de la DM.



## 6. OBJETIVOS

- 1) Evaluar las causas de las interferencias analíticas encontradas durante la medición de AGEs en suero por el ELISA previamente desarrollado. Rediseñar dicho inmunoensayo para garantizar una medición confiable de AGEs en suero.
- 2) Estudiar de forma comparativa la capacidad diagnóstica de los dos inmunoensayos desarrollados por nuestro grupo de trabajo, para establecer la asociación entre las concentraciones séricas de AGEs y el deterioro de la función renal en el paciente diabético.

## 7. HIPÓTESIS

Si se pueden desarrollar métodos analíticos para la cuantificación confiable de las concentraciones séricas de AGEs, entonces éstos se podrían utilizar en el monitoreo del control metabólico a largo plazo del paciente diabético. Los métodos analíticos desarrollados reportarán bajas concentraciones séricas de AGEs en los sujetos normoglicémicos controles, que serán mayores en los pacientes diabéticos sin complicaciones crónicas y mucho mayores en los pacientes diabéticos con daño renal crónico. Por tanto, la medición de AGEs utilizando nuestros inmunoensayos sería de utilidad para identificar a los pacientes diabéticos que tengan mayores probabilidades de desarrollar complicaciones crónicas tales como la nefropatía diabética.

## **8. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **8.1. Reactivos, materiales y equipos**

La D-(+)-glucosa anhidra, RNAsa y el conjugado anti-IgG humana-Peroxidasa fueron de la marca Sigma Aldrich Corporation, MO, EUA.

El Affigel-102 y el Bio-Gel P-200 fueron de la marca Bio-Rad Laboratories Inc., CA, EUA.

El Conjugado anti-IgM humana-fosfatasa alcalina fue de la marca ZYMED, CA, EUA.

Los métodos enzimáticos colorimétricos se realizaron utilizando reactivos de la marca Pointe Scientific Inc., MO, EUA.

Se utilizaron sistemas desechables de filtración con membrana de acetato de celulosa de 0.22  $\mu\text{m}$  de la marca Corning Incorporated, NY, EUA.

Las membranas de diálisis utilizadas fueron Spectra de 6-8 KDa de la marca Spectrum Medical Industries Inc., TX, EUA.

Las placas de poliestireno de alta capacidad de unión de 96 pozos fueron de la marca Costar, Corning Incorporated, NY, EUA.

El lector de microplacas fue el equipo StatFax 2100 de la marca Awareness Technology Inc., FL, EUA.

Se utilizó Mini-PROTEAN Tetra System y una fuente de poder Power Pac Universal Power Supply de la marca Bio-Rad Laboratories Inc., CA, EUA.

El analizador bioquímico automatizado fue el equipo Mindray BS-200 de la marca Mindray Medical International Limited, Shenzhen, China.

El equipo VARIAT II, Hemoglobin Testing System fue de la marca Bio-Rad Laboratories Inc., CA, EUA).

El equipo Immunolate 2000 fue de la marca Siemens, TX, EUA.

### **8.2. Métodos analíticos empleados**

#### **8.2.1. Radioinmunoanálisis para la medición de AGEs**

Se empleó un RIA en fase líquida con precipitación por segundo anticuerpo (anexo 1). Brevemente: 100  $\mu\text{L}$  de estándar, muestras o controles fueron mezclados con

100  $\mu$ L del anticuerpo anti-AGEs purificado por cromatografía de afinidad y diluido 1/7000 con PBS-BSA 1% y 100  $\mu$ L del trazador AGE-BSA-I<sup>125</sup> con una actividad de 20000 cuentas por minuto (CPM); y agitados con un vortex e incubados durante toda la noche a 4°C. Al otro día se les adicionaron 200  $\mu$ L del reactivo de precipitación (amortiguador PBS, 0.25% BSA, 4% polietilenglicol 8000 y antisuero anti-IgG de conejo producido en borrego diluido 1/10), se mezclaron e incubaron 30 min a temperatura ambiente (TA). Posteriormente los tubos se centrifugaron a 3000 rpm a 4°C durante 30 min. Una vez centrifugados, los tubos se decantaron para eliminar la fracción no unida y la radioactividad del precipitado (fracción unida) se cuantificó en un contador de radiaciones gamma como conteos por minuto (CPM). Con la relación dosis-respuesta se pudo establecer el rango lineal del ensayo. (ver anexo 1).

## **8.2.2. Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzima para la medición de AGEs**

### **8.2.2.1. Síntesis de AGE-RNAsa**

Se disolvieron 10 g de D-(+)-glucosa anhidra y 1.3 g de RNAsa en 55 mL de amortiguador fosfatos 0.2 M, EDTA 0.5 mM, pH 7.4. La disolución se esterilizó por filtración, en campana de flujo laminar, utilizando un sistema desechable de filtración con membrana de acetato de celulosa de 0.22  $\mu$ m y se incubó a 37 °C por 14 semanas en condiciones de oscuridad. Transcurridas las 14 semanas de incubación, la solución de AGE-RNAsa se redujo para estabilizar las bases de Schiff formadas y permitir la completa formación de los AGEs. Para lo cual, se adicionó lentamente 1.1 mL de una solución de 200 mg/mL de borohidruro de sodio a la solución de AGE-RNAsa ( $\approx$  55 mL), y se mantuvo en agitación durante 1 hora, a TA. Posteriormente, se dializó extensamente contra PBS, pH 7.4 durante 3 días con cambios sucesivos del amortiguador, utilizando membranas de diálisis Spectra de 6-8 KDa. Finalmente, se tomó una alícuota del AGE-RNAsa para cuantificar su concentración de proteína mediante método de Lowry, y se realizó la evaluación por fluorescencia utilizando un fluorómetro (Luminescence

Spectrometer LS-50B; Perkin Elmer Inc., Massachusetts, USA) a 370/440 nm (longitud de excitación/emisión), con rejillas de 2.5 nm de apertura. Se estableció la actividad específica como la relación de la fluorescencia 370/440 nm y se definió su concentración como U/mL (Unidades Arbitrarias de Fluorescencia que tenía una solución de 1 mg/mL de AGE-RNAsa). El AGE-RNAsa obtenido bajo el procedimiento descrito tuvo una concentración final de proteínas de 21.7 mg/mL y una actividad específica de 133 U/mL.

### **8.2.2.2. Normalización del ELISA para la medición de AGEs**

Se evaluaron dos tipos de placas de poliestireno de alta capacidad de unión de 96 pozos: una recubierta con AGE-BSA y otra con AGE-RNAsa. Para la preparación de la curva estándar para el ensayo de ELISA se utilizó el mismo estándar empleado en el método de RIA (una preparación de AGE-BSA previamente sintetizada y caracterizada por fluorescencia y espectrometría de masas con una actividad específica de 300 U/mL es decir 300 Unidades Arbitrarias de Fluorescencia/(mg/mL de proteína). La curva estándar para el ensayo de ELISA utilizando inicialmente la placa recubierta con AGE-BSA se estableció con 5 concentraciones del estándar de AGE-BSA: 69, 207, 621, 1863 y 5589 mU/mL (que en masa equivale a un rango de concentraciones de 0.23 a 18.63 µg/mL), disuelto en PBS-BSA 1%. La curva estándar para el ensayo utilizando la placa recubierta con AGE-RNAsa se estableció con 4 concentraciones del estándar de AGE-BSA: 287, 738, 1853, 5115 mU/mL (que en masa equivale a un rango de concentraciones de 0.96 a 17.05 µg/mL), disuelto en PBS-BSA 1%. También fueron preparados dos controles internos de calidad (CIC): CIC 1= 258 mU/mL y CIC 2= 1092 mU/mL (1.04 y 3.65 µg/mL, respectivamente).

La normalización del ensayo se realizó como se describe brevemente a continuación: Al primer pocillo se le adicionó 100 µL de la solución de AGE-BSA con alta concentración (51.2 U/mL) por lo que neutraliza todo el conjugado adicionado, siendo el pozo A1 la unión no específica (UNE o blanco), a los siguientes 2 pocillos (B1 y C1) de cada placa se les adicionaron 100 µL del amortiguador de ensayo (unión máxima, dosis cero). En cada placa se adicionaron

por duplicado, 100  $\mu$ L de cada estándar (pocillos D1 a C2) y 100  $\mu$ L de cada control (pocillos D2 a G2). A partir del pocillo H2 y hasta el H12, se les adicionó 100  $\mu$ L de cada muestra a analizar. Posteriormente, se adicionaron a todos los pocillos 50  $\mu$ L de la dilución de trabajo del conjugado anti-AGEs-Peroxidasa (diluido 1:70 en amortiguador PBS-BSA 1%, SDS 0.3%, Triton X-100 0.05%, pH 7.4; amortiguador del conjugado), la placa fue cuidadosamente agitada con pequeños golpecitos y se incubó durante 30 minutos a TA para que la reacción antígeno-anticuerpo se llevara a cabo. Al cabo del tiempo de incubación, se lavó la placa 3 veces con amortiguador de lavado (PBS 0.5X, Triton X-100 0.05%, pH 7.4). Seguidamente se reveló el conjugado unido a la fase sólida adicionando a cada pocillo 100  $\mu$ L de la mezcla de sustrato y cromógeno ( $H_2O_2$  0.004%, OPD 0.45 mg/mL, en amortiguador fosfato 50 mM, pH: 5). Se dejó que la reacción procediera a TA durante 30 minutos y se detuvo con 20  $\mu$ L de ácido sulfúrico 2 N. Se midió la absorbancia en un lector de microplacas a 492 nm, restándole la absorbancia 630 nm para corregir las imperfecciones de la placa. Se estimó la concentración de AGEs utilizando la relación dosis-respuesta de la curva estándar (ver anexo 2).

### **8.2.3. Identificación de interferencias analíticas en la cuantificación de AGEs por ELISA**

Para identificar el origen de la interferencia analítica observada en el ELISA que utilizaba placas recubiertas con AGE-BSA, preparamos una mezcla de sueros de 340 sujetos. La mezcla resultante fue filtrada con membrana de acetato de celulosa de 0.22  $\mu$ m y posteriormente purificado por cromatografía de inmunoafinidad. Para lo cual la mezcla de sueros fue diluida 1 en 3 con amortiguador PBS pH: 7.4 y se le adicionó Triton X-100 hasta una concentración final de 0.4%. Se aplicó una alícuota de 250 mL de la dilución de la mezcla a una columna que contenía 20 mL de la matriz de Affigel-102 misma que tenía unida covalentemente AGE-BSA. Una vez lavada la columna con 20 veces el volumen del lecho cromatográfico con PBS-Triton X-100 0.4%, pH: 7.4 (400 mL), los anticuerpos unidos fueron eluidos inicialmente con 200 mL de amortiguador glicina

100 mM, NaCl 0.5 M, Triton X-100 0.05%, pH: 3 (para eluir anticuerpos cuya unión a la matriz cromatográfica era sensible al pH ácido) y posteriormente con 200 mL de amortiguador trietanolamina 100 mM, NaCl 0.5 M, Triton X-100 0.05%, pH: 11 (para eluir anticuerpos cuya unión a la matriz cromatográfica era sensible al pH básico). Ambos volúmenes de elución fueron unidos, concentrados por ultrafiltración y dializado contra PBS pH 7.4. Posteriormente, una alícuota de 2 mL (volumen que representó el 8% del volumen del lecho cromatográfico) de la solución de las proteínas purificadas, dializadas y concentradas hasta 3.6 mg/mL, se aplicó a una cromatografía de exclusión molecular de Bio-Gel P-200, previamente equilibrada con PBS pH: 7.4, utilizando una columna cromatográfica de 1X30 cm con un volumen de lecho de 24 mL, para fraccionar las proteínas e identificar el peso molecular de las moléculas presentes, que habían demostrado tener afinidad por el AGE-BSA. Esto con el objetivo de discriminar si eran anticuerpos o receptor soluble de AGEs. Se utilizó PBS pH: 7.4 como fase móvil y se recolectaron 40 alícuotas de 2 mL por tubo a un flujo de 0.25 mL/min.

Una vez concluida la cromatografía de exclusión molecular en Bio-Gel P-200, cada una de las fracciones obtenidas se emplearon en los siguientes ensayos: Primeramente se adicionaron 50  $\mu$ L de cada fracción más otros 50  $\mu$ L de PBS-BSA 1%, pH: 7.4 a dos placas de ELISA, una recubierta con AGE-BSA y otra recubierta con AGE-RNAsa y se le adicionaron 50  $\mu$ L de la dilución de trabajo del conjugado anti-AGE-Peroxidasa (1/70) disuelto en amortiguador PBS-BSA 1%, SDS 0.3%, Triton X-100 0.05% (amortiguador de conjugado). A una tercera placa recubierta con albúmina sérica humana (HSA), se le adicionaron de igual forma los 50  $\mu$ L de las fracciones más los 50  $\mu$ L de PBS-BSA 1%, pH: 7.4, pero en lugar del conjugados anti-AGE-Peroxidasa, se le adicionaron 50  $\mu$ L de un conjugado anti-HSA-Peroxidasa (previamente preparado en nuestro laboratorio, diluido 1/270 en PBS-BSA 1%, Triton X-100 0.05%). Se incubaron todas las placas durante 30 min, se lavaron 3 veces con amortiguador de lavado y se reveló la cantidad de conjugado unido a la placa con la adición de 100  $\mu$ L de la mezcla de sustrato y cromógeno ( $H_2O_2$  0.004%, OPD 0.45 mg/mL, en amortiguador fosfato 50 mM, pH: 5). Al cabo de 30 min de incubación a TA, se detuvo la reacción con 20  $\mu$ L de



ácido sulfúrico 2 N. Las placas se leyeron a 492 nm y se verificó la presencia o no de inhibición de la señal en cada uno de los pozos que contenían las distintas fracciones obtenidas de la cromatografía de exclusión molecular en Bio-Gel P-200.

#### **8.2.3.1. Análisis electroforético de las proteínas con capacidad de unión al AGE-BSA**

Las proteínas eluidas de la cromatografía de inmunoafinidad se analizaron por una electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% con SDS, para verificar su grado de pureza, así como el peso molecular de las mismas. Esto con la finalidad de identificar la naturaleza probable (anticuerpos anti-AGEs del isotipo IgM ( $\approx 950$  kDa), y/o del isotipo IgG ( $\approx 150$  kDa), y/o receptores solubles de AGEs ( $\approx 35-45$  kDa) que pudieran estar presentes en la mezcla de sueros humanos ensayado y que estuvieran interfiriendo con la medición de AGEs por el ensayo de ELISA que utilizaba placas recubiertas con AGE-BSA. Para ello 20  $\mu\text{g}$  de las proteínas purificadas por inmunoafinidad, disueltas en 20  $\mu\text{L}$  de amortiguador de carga (Tris 0.61 M, SDS 2%, glicerol 2%, azul de bromofenol 0.001%), fueron aplicados en un gel 5.3 X 8.2 X 0.1 cm (largo x ancho x grosor) y corridos a 100 mV durante una hora a TA. Para ello se utilizó un sistema Mini-PROTEAN Tetra System y una fuente de poder Power Pac Universal Power Supply. Al cabo del tiempo de corrida, el gel fue fijado y teñido con azul de Coomassie para hacer visibles las proteínas presentes.

#### **8.2.4. Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzima para la detección anticuerpos del isotipo IgG en las proteínas con capacidad de unión al AGE-BSA**

La normalización del ensayo se realizó como a continuación se describe: Utilizando placas de ELISA (recubierta con AGE-BSA ó AGE-RNAsa ó HSA a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y bloqueada con gelatina al 0.3% en PBS-Triton X-100 0.05% pH: 7.4); se le adicionaron 50  $\mu\text{L}$  por pozo de cada muestra a analizar más 50  $\mu\text{L}$  de PBS-BSA 1%. Se dejó incubar durante 30 minutos a TA para que la reacción antígeno-anticuerpo se llevara a cabo. Se lavó la placa 3 veces con amortiguador de lavado (PBS 0.5X, Triton X-100 0.05%, pH 7.4) y se le adicionaron 100  $\mu\text{L}$  por pozo de la

dilución de trabajo (1/2000) del conjugado anti-IgG humana-Peroxidasa disuelto en PBS-BSA 1%, Triton X-100 0.05%, pH 7.4; se incubó 30 min a TA, se lavó la placa 3 veces y se reveló añadiendo a cada pocillo 100  $\mu$ L de la mezcla de sustrato y cromógeno ( $H_2O_2$  0.004%, OPD 0.45 mg/mL, en amortiguador fosfato 50 mM, pH: 5). Se dejó que la reacción procediera a TA durante 30 minutos y se detuvo con 20  $\mu$ L de ácido sulfúrico 2 N. Se midió la absorbancia en un lector de microplacas a 492 nm, restándole la absorbancia 630 nm. La concentración relativa de anticuerpos anti-AGEs del isotipo IgG, se estableció en función de la magnitud de la absorbancia obtenida bajo las condiciones antes descritas, mismas que fueron reproducidas en cada placa ensayada.

#### **8.2.5. Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzima para la detección de anticuerpos del isotipo IgM en las proteínas con capacidad de unión al AGE-BSA**

La normalización del ensayo se realizó como se describe a continuación: Utilizando placas de ELISA (recubierta con AGE-BSA ó AGE-RNAsa ó HSA a 10  $\mu$ g/mL y bloqueada con gelatina al 0.3% en PBS-Triton X-100 0.05% pH: 7.4); se le adicionaron 50  $\mu$ L por pozo de cada muestra a analizar más 50  $\mu$ L de Tris-BSA 1%. Se dejó incubar durante 30 minutos a TA para que la reacción antígeno-anticuerpo se llevara a cabo. Se lavó la placa 3 veces con amortiguador de lavado (Tris 50 mM pH 7.4, Tritón X-100 0.05%) y se le adicionaron 100  $\mu$ L por pozo de la dilución de trabajo (1/4000) del conjugado anti-IgM humana-fosfatasa alcalina disuelto en Tris-BSA 1%, Triton X-100 0.05%, pH 7.4; se incubó 30 min a TA, se lavó la placa 3 veces con amortiguador de lavado y se reveló añadiendo a cada pocillo 100  $\mu$ L de la mezcla de sustrato y cromógeno ( $H_2O_2$  0.004%, p-nitrofenifosfato 0.09 mg/mL, en amortiguador dietanolamina 10 mM, 0.5 mM  $MgCl_2$ , pH: 9.5). Se dejó que la reacción procediera a TA durante 30 minutos y se detuvo con 20  $\mu$ L de ácido sulfúrico 2 N. Se midió la absorbancia en un lector de microplacas a 405 nm, restándole la absorbancia 630 nm. La concentración relativa de anticuerpos anti-AGEs del isotipo IgM, se estableció en función de la magnitud de la absorbancia obtenida bajo las condiciones antes descritas, mismas que fueron reproducidas en cada placa ensayada.

### **8.3. Relación de las concentraciones séricas de AGEs con la presencia de la enfermedad renal crónica en el paciente diabético**

Se realizó un estudio exploratorio, observacional, transversal con un diseño de casos y controles para evaluar las concentraciones séricas de AGEs en sujetos normoglicémicos controles y pacientes diabéticos sin y con daño renal crónico. Se estudió la asociación entre las concentraciones séricas de AGEs, medidas por los dos métodos desarrollados, con la presencia de daño renal crónico en el paciente diabético. Se establecieron valores de corte para dichas concentraciones séricas de AGEs y se evaluó la capacidad de la medición de las concentraciones séricas de AGEs para el tamizaje de pacientes diabéticos con enfermedad renal crónica.

#### **8.3.1. Sujetos de estudio**

La población fuente del estudio fueron pacientes que acudieron a la consulta de los servicios de diabetes (diabéticos sin enfermedad renal crónica) y nefrología (diabéticos con enfermedad renal crónica) del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán" y trabajadores del mismo instituto (controles normoglicémicos).

#### **8.3.2. Procedimientos para garantizar aspectos éticos**

Para realizar el presente estudio se contó con la aprobación del Comité de Ética para la Investigación en Humanos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán" (BRE 557-12/15-1) y los sujetos de estudio firmaron una carta de consentimiento informado (ver Anexo 3).

#### **8.3.3. Criterios de inclusión**

Los criterios de inclusión considerados para la selección de la muestra fueron: sujetos diabéticos reclutados voluntariamente en los servicios de Diabetes y Nefrología, que contaran con expediente clínico vigente y actualizado y tuvieran concentraciones séricas de creatinina  $<1.3$  mg/dL para los sujetos sin enfermedad renal crónica y  $\geq 1.3$  mg/dL para los que padecían de enfermedad renal crónica.

Los sujetos controles fueron todos normoglicémicos sin padecimientos médicos conocidos.

#### **8.3.4. Criterios de exclusión**

Los criterios de exclusión fueron: pacientes que presenten otro tipo de complicaciones oncológicas o endocrinológicas y que estuvieran sometidos a tratamientos médicos distintos al manejo de la DM.

#### **8.3.5. Mediciones bioquímicas**

Las concentraciones séricas de glucosa, creatinina, ácido úrico, colesterol total, y triglicéridos se midieron por métodos enzimáticos colorimétricos utilizando reactivos de la marca Pointe y un analizador bioquímico automatizado modelo Mindray BS-200. La hemoglobina glicosilada (HbA1c), se determinó por HPLC utilizando un equipo VARIAT II, Hemoglobin Testing System. La hormona paratiroidea (PTH) se midió por un método de quimioluminiscencia utilizando un equipo Immunolite 2000. Las concentraciones de insulina en suero se midieron mediante un RIA desarrollado previamente por nuestro grupo de trabajo y cuidadosamente validada por comparación de los resultados con los obtenidos por el analizador inmunoquímico automatizado Abbott IMX (laboratorios Abbott, Chicago, USA). Este método es un radioinmunoensayo de competición en fase líquida con precipitación por segundo anticuerpo. El RIA tiene un rango linealidad de 6.53-209.06  $\mu\text{UI/mL}$  y un límite de detección de 0.21  $\mu\text{UI/mL}$ . Los coeficientes intra e inter-ensayo de precisión fueron del 6,5% y 6,0%, respectivamente. Sin interferencias con hemoglobina hasta 150 mg/dL, bilirrubina hasta 15 mg/dL, colesterol hasta 668 mg/dL y triglicéridos hasta 4192 mg/dL. Para lo cual se utilizó un contador de radiaciones gamma marca Cobra II (Packard Instrument Company, Inc., Connecticut, USA). El índice de resistencia a la insulina fue estimado a través del Homeostatic Model Assessment (HOMA), utilizando la fórmula propuesta por Matthews y col:  $[\text{insulina } (\mu\text{UI/mL}) \times \text{glucosa (mmol/l)}] / 22.5$  (Matthews et al., 1985).

### **8.3.6. Análisis estadístico**

Los resultados de las mediciones analíticas se presentan como media e intervalos de confianza al 95%. Las diferencias estadísticas de los parámetros estudiados entre los diferentes grupos, se estimaron a través de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. Las asociaciones entre dos parámetros se establecieron a través de modelos de regresión lineal simple. Las asociaciones entre las concentraciones séricas de AGEs con todos los demás parámetros clínicos y metabólicos estudiados, se realizaron a través de modelos de regresión lineal múltiple. La estimación de las probabilidades de que los pacientes con daño renal crónico asociado a la diabetes tengan concentraciones elevadas de AGEs, medidas por cada uno de los inmunoensayos, se realizó a través de modelos de regresión logística. El valor óptimo de corte de las concentraciones séricas de AGEs, medidas por cada inmunoensayo, para el tamizaje de sujetos diabéticos con enfermedad renal crónica, fue estimado a través de las relaciones de sensibilidad y especificidad obtenidas a partir de curvas ROC. Todos los análisis se realizaron con el paquete estadístico STATA 13.



## 9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 9.1. Resultados previos

En los últimos años, hemos estado trabajando en el desarrollo de dos métodos de inmunoanálisis para la cuantificación de AGEs derivados de glucosa. Un radioinmunoanálisis (RIA) que mide los AGEs intactos (no degradados) y un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) que mide los AGEs totales (intactos y productos de degradación). Inicialmente el ensayo de ELISA utilizaba una placa recubierta con AGE-BSA. Las curvas típicas de los inmunoanálisis previamente desarrollados y sus correspondientes rangos dinámicos se presentan en la Figura 8.

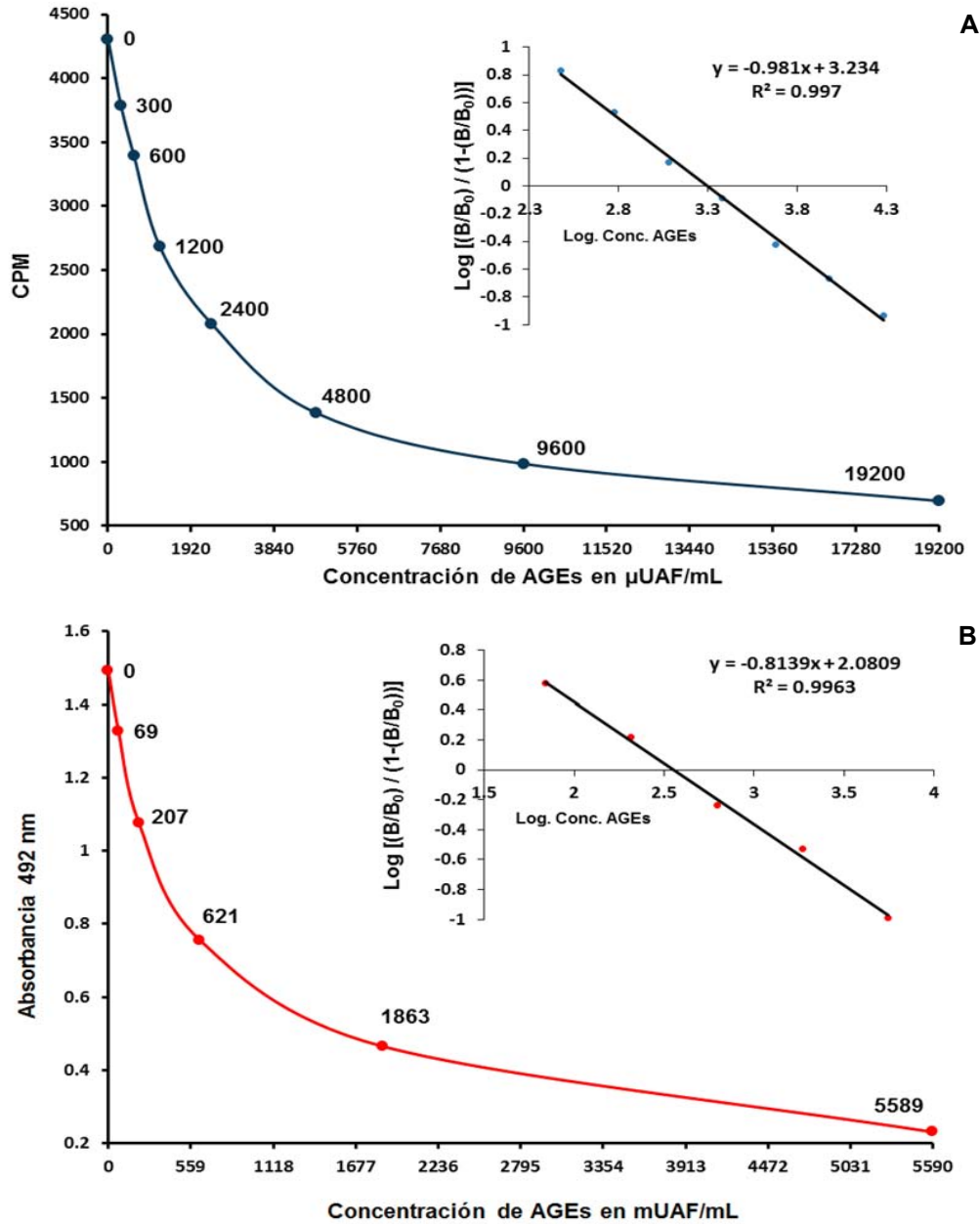


Figura 8. Curvas típicas de los inmunoensayos RIA (A) y ELISA (B) para medir AGEs derivados de glucosa. Se muestra el desplazamiento característico de los ensayos de competición, así como la transformación matemática de la relación dosis-respuesta de la curva estándar para cada uno de los métodos desarrollados.

En un estudio previo, observamos que las concentraciones séricas de AGEs medidas utilizando el RIA desarrollado, eran bajas en los sujetos normoglicémicos, aumentaban en los pacientes con resistencia a la insulina y eran mucho mayores

en los pacientes que padecían de DM, lo que reflejaba una estrecha relación entre las concentraciones circulantes de AGEs y el grado de control glicémico. Por otro lado, las mediciones realizadas utilizando el ELISA desarrollado, revelaron concentraciones séricas de AGEs muy elevadas y sin diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio (Tabla 2).

**Tabla 2. Medición de AGEs séricos medidos por RIA y ELISA.**

Grupo de estudio	RIA (μU/mL)		ELISA (mU/mL)	
	Media	95% CI	Media	95% CI
<b>NG</b> (n = 403)	702 <sup>a</sup>	637-766	2066 <sup>a</sup>	1832-2299
<b>IR</b> (n = 76)	742 <sup>b</sup>	591-894	2174 <sup>a</sup>	1475-2874
<b>DM</b> (n = 78)	997 <sup>c</sup>	697-1295	2183 <sup>a</sup>	1337-3029

**NG: Sujetos normoglicémicos; IR: Sujetos con resistentes a la insulina; DM: Sujetos diabéticos. Los datos se presentan como media y sus intervalos de confianza al 95%. Letras superíndice iguales significan que no hay diferencias significativas entre los grupos.**

Esta observación nos llevó a considerar la posibilidad de que anticuerpos anti-AGEs presentes en la muestra de los sujetos, estuvieran interfiriendo con la medición de los AGEs por el ELISA previamente desarrollado. Por lo que decidimos evaluar la posible presencia de anticuerpos anti-AGEs.

Para ello, se añadieron 100 μL de las muestras de suero de los sujetos de estudio a la placa ELISA recubierta con AGE-BSA, se incubaron por una hora, se lavaron y finalmente, la presencia de anticuerpos supuestamente anti-AGEs fue revelada con un conjugado anti-IgG humana-Peroxidasa. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 3, donde se puede observar que tampoco se encontraron diferencias en las concentraciones relativas (expresadas como absorbancia a 492 nm) entre los grupos de estudio.



**Tabla 3. Detección de anticuerpos anti-AGEs en suero por ELISA utilizando el AGE-BSA como recubrimiento**

Grupo de estudio	Anti-AGEs (Absorbancia 492 nm)	
	Media	95% CI
NG (n = 403)	0.60 <sup>a</sup>	0.57-0.64
IR (n = 76)	0.62 <sup>a</sup>	0.54-0.70
DM (n = 78)	0.54 <sup>a</sup>	0.48-0.60

NG: Sujetos normoglicémicos; IR: Sujetos con resistentes a la insulina; DM: Sujetos diabéticos. Los datos se presentan como media y sus intervalos de confianza al 95% de las absorbancias a 492 nm. Letras superíndice iguales significan que no hay diferencias significativas entre los grupos.

Estos resultados crearon inicialmente cierta confusión, pues este ensayo de ELISA se había utilizado previamente con mucho éxito en el Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación de Madrid España para la medición de AGEs en alimentos y se pudo establecer diferencias significativas en las concentraciones de AGEs dependiendo no solo del tipo de alimento, sino también del proceso mediante el cual habían sido preparados dichos alimentos (Domínguez y del Castillo, 2015). Los resultados se presentan en la Tabla 4.

**Tabla 4. Contenido en AGEs totales en muestras de café y galletas. Los resultados se expresan como el valor medio en KU de AGEs/g de producto  $\pm$  la desviación estándar. Las medidas se realizaron por duplicado.**

Bebida/alimento	KU AGEs/g producto
Café verde	0,01 $\pm$ 0,002
Café claro	0,73 $\pm$ 0,05
Café medio	2,40 $\pm$ 0,10
Café oscuro	3,95 $\pm$ 1,08
Café torrefacto	0,94 $\pm$ 0,38
Galleta estevia, marros de café y FOS	80,20 $\pm$ 9,19
Galleta cascarilla	8,43 $\pm$ 4,76
Galleta maría	1773,83 $\pm$ 184,36

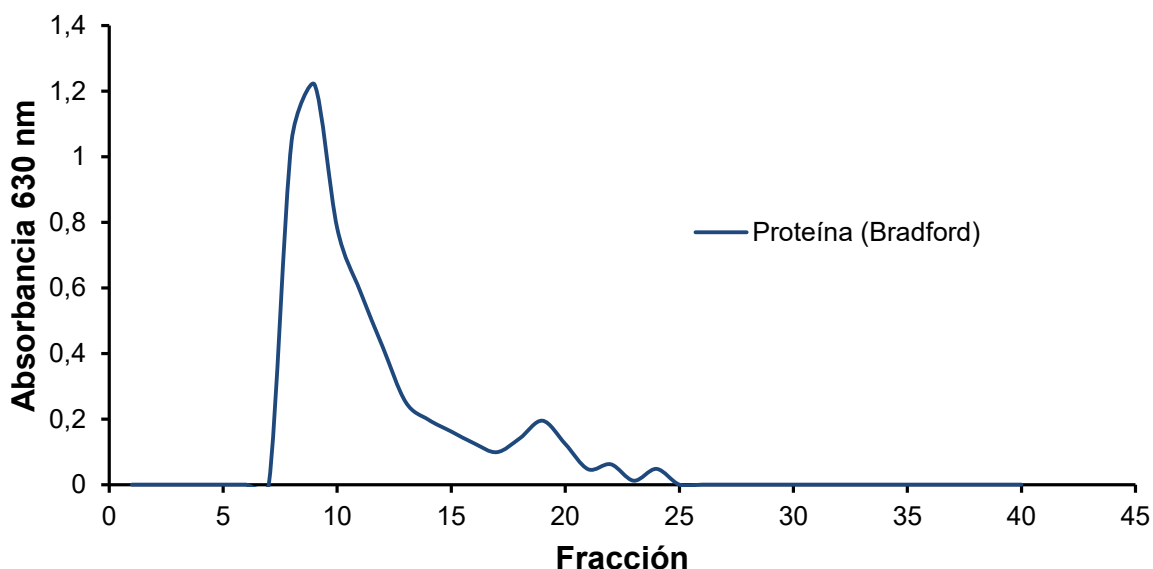
FOS: Fructo-oligosacáridos, Prebióticos.

(Resultados presentados con permiso de los autores)

Esto nos llevó a considerar que además de los anticuerpos anti-AGEs, otras moléculas tales como el receptor soluble de AGEs u otros anticuerpos inespecíficos presentes en las muestras de los pacientes pudieran estar interfiriendo en el ensayo. Por lo que nos propusimos identificar las causas de dichas interferencias.

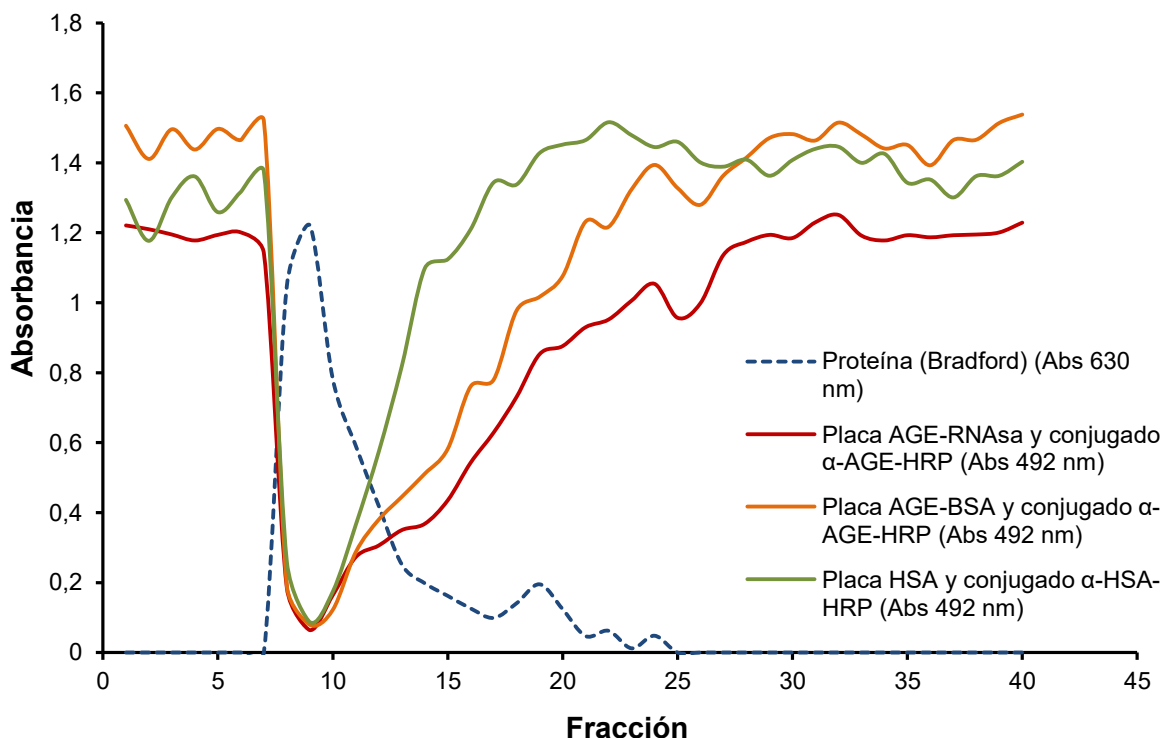
## **9.2. Identificación de interferencias analíticas en la cuantificación de AGEs por ELISA**

Para identificar el origen de la interferencia analítica observada en el ELISA que utilizaba AGE-BSA como recubrimiento, preparamos una mezcla de 340 sueros humanos y los purificamos por cromatografía de afinidad en Affigel 102-AGE-BSA. Las moléculas unidas a la matriz de afinidad se eluyeron, dializaron contra PBS pH 7.4 y concentraron hasta 3.6 mg/mL, para posteriormente ser separadas por cromatografía de exclusión molecular en Bio-Gel P-200, para identificar el peso molecular de las moléculas interferentes y discriminar si eran anticuerpos o receptor soluble de AGEs. Los resultados se presentan en la Figura 9 donde se puede apreciar el cromatograma obtenido.



**Figura 9. Cromatograma de exclusión molecular en Bio-Gel P-200 de las moléculas con afinidad por el AGE-BSA.**

Una vez separadas las proteínas, las distintas fracciones obtenidas fueron empleadas para los siguientes ensayos: Primeramente se adicionaron los 50  $\mu$ L de cada fracción más otros 50  $\mu$ L de PBS-BSA 1% a dos placas de ELISA, una recubierta con AGE-BSA y otra recubierta con AGE-RNAsa y se le adicionaron 50  $\mu$ L de la dilución de trabajo del conjugado anti-AGE-Peroxidasa. A una tercera placa recubierta con HSA, se le adicionaron de igual forma los 50  $\mu$ L de las fracciones más 50  $\mu$ L de PBS-BSA 1%, pero en lugar del conjugados anti-AGE-Peroxidasa, se le adicionó 50  $\mu$ L de un conjugado anti-HSA-Peroxidasa. Se incubaron todas las placas durante 30 min, se lavaron y se reveló la cantidad de conjugado unido a la placa con la adición de OPD más  $H_2O_2$  como sustrato. Al cabo de 30 min se detuvo la reacción y se verificó la presencia o no de inhibición de la señal en cada uno de los pozos que contenían las fracciones de la cromatografía de exclusión molecular. Los resultados se presentan en la Figura 10.



**Figura 10.** Inhibición inducida por las proteínas con afinidad por el AGE-BSA presentes en las diferentes fracciones de la purificación por exclusión molecular en Bio-Gel P-200 de la mezcla de sueros humanos.

Se puede observar que existe inhibición tanto en las placas recubiertas con AGE-BSA como con AGE-RNAsa, fundamentalmente en los pozos que contenían las fracciones de mayor peso molecular y mayor concentración de proteínas, lo que sugiere la presencia de moléculas con afinidad por los AGEs inmobilizados en la fase sólida. De igual forma, fue evidente la presencia de moléculas con afinidad por la HSA, tal y como lo sugiere la inhibición observada en la placa recubierta con HSA y el conjugado anti-HSA-Peroxidasa. Esto sugirió la presencia de anticuerpos anti-HSA en la mezcla de sueros humanos, mismo que fueron recuperados de la cromatografía de afinidad en Affigel 102-AGE-BSA por tener afinidad por la BSA unida a la matriz, esto debido a que ambas albúminas tienen un alto grado de homología estructural.

La inhibición de la unión del conjugado anti-AGE-Peroxidasa en las placas recubiertas con AGE-BSA y AGE-RNAsa, quedó claro al detectarse anticuerpos tanto del isotipo IgG como IgM unidos a dichas placas. También se demostró la

presencia de anticuerpos anti-HSA unidos a la placa de HSA de ambos isotipos. La presencia de anticuerpos del isotipo IgG e IgM se hizo manifiesta en las primeras fracciones del cromatograma de exclusión molecular, lo que coincide con el peso esperado para estas moléculas de alto peso molecular (Figura 11).

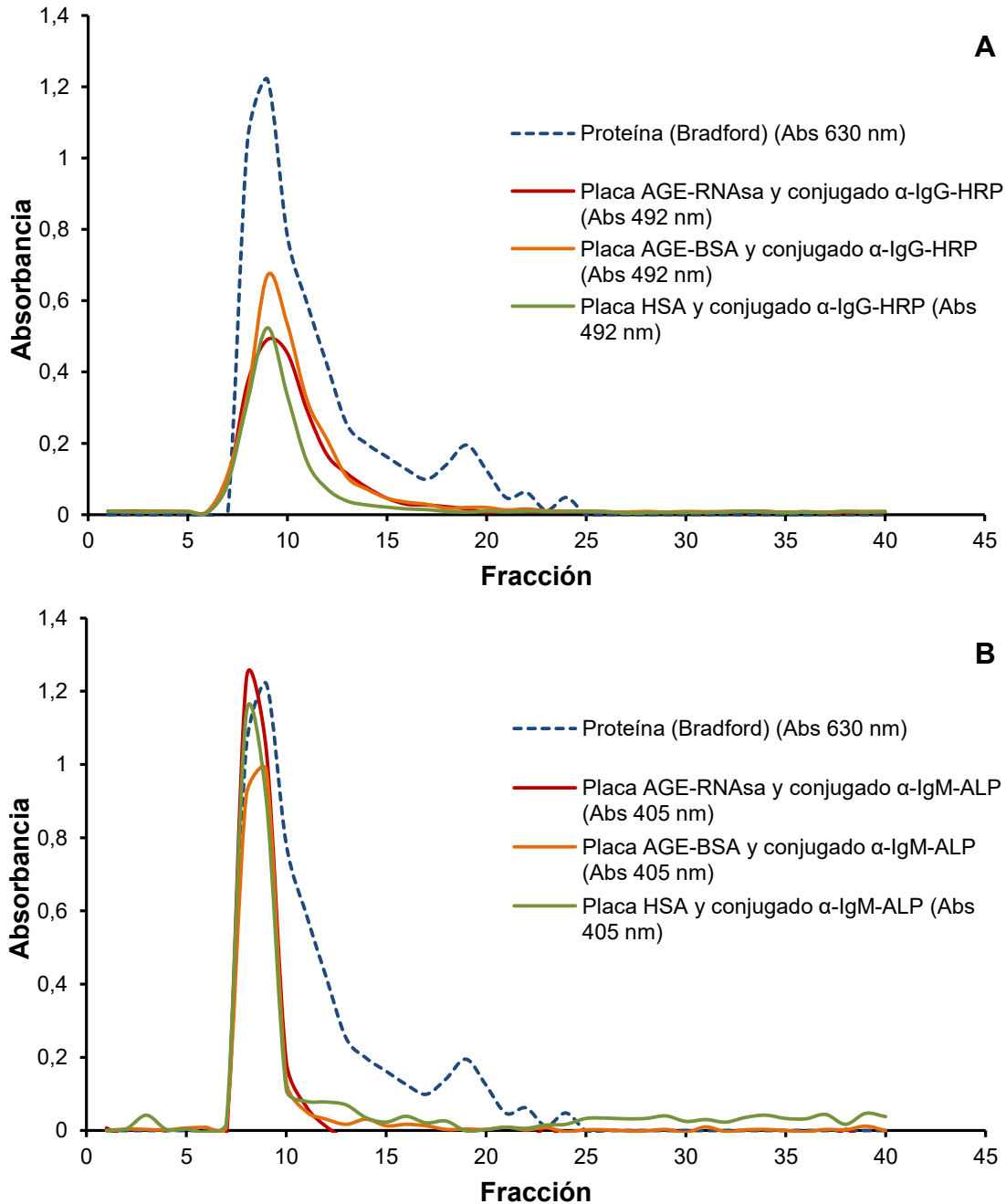
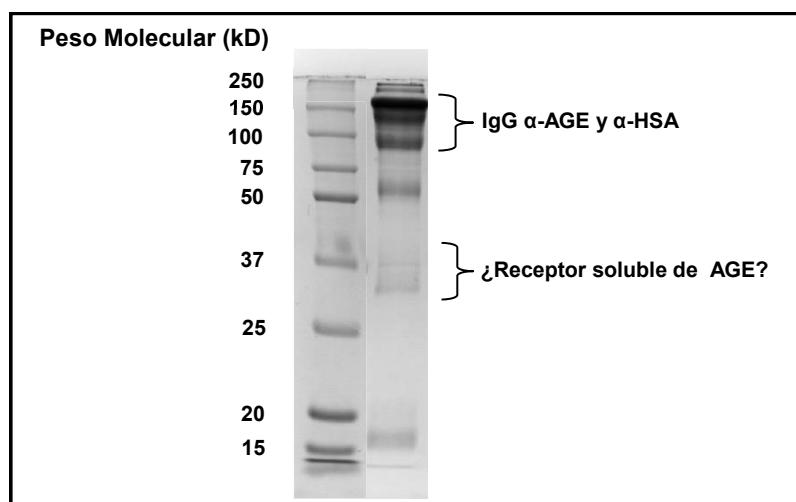


Figura 11. Presencia de anticuerpos anti-AGEs y anti-HSA de los isotipos IgG (A) y del isotipo IgM (B), unidos a las placas recubiertas de AGE-BSA, AGE-RNAsa y HSA respectivamente.

Así mismo la electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% con SDS realizada a la solución de proteínas eluidas de la cromatografía de afinidad en Affigel-102-AGE-BSA, mostró la presencia de abundantes proteínas de alto peso molecular de alrededor de 150 kDa. La presencia de varias bandas refleja la presencia de anticuerpos policlonales con patrones de glicación diferentes que le confieren diferentes pesos moleculares alrededor de los 150 kDa e incluyen a los anticuerpos anti-AGEs, así como los anticuerpos anti-HSA (Figura 12).



**Figura 12. Análisis electroforético en gel de poliacrilamida al 10% con SDS de las proteínas con afinidad por el AGE-BSA.**

A pesar que se observaron proteínas de menor peso molecular, tanto en el perfil cromatográfico de exclusión molecular en Bio-Gel P-200 como en el perfil electroforético, estas no presentaron gran capacidad de inhibición de la unión del conjugado anti-AGE-Peroxidasa, por lo que la contribución de los receptores solubles de AGEs (35-45 kDa) a la interferencia en la medición de AGEs por el método de ELISA, parece no tener gran relevancia; siendo más importante la interferencia de los anticuerpos.

### 9.3. Normalización del ELISA para medir AGEs utilizando placas recubiertas con AGE-RNAsa

Una vez entendida la razón por la que el ensayo de ELISA funcionaba bien para las muestras de alimento pero fallaba para las muestras de suero, debido a la presencia de anticuerpos anti-HSA que tenían reactividad cruzada con la parte proteica del AGE-BSA del recubrimiento, decidimos rediseñar el ensayo utilizando como recubrimiento una solución de AGE-RNAsa de páncreas bovino, la cual es una proteína intracelular de otra especie, por lo que los humanos no tienen ningún tipo de reactividad inmunológica.

La curva y el rango dinámico del nuevo ensayo de ELISA, que conserva las mismas características en cuanto al rango de detección y sensibilidad del ensayo, se presentan en la Figura 13.

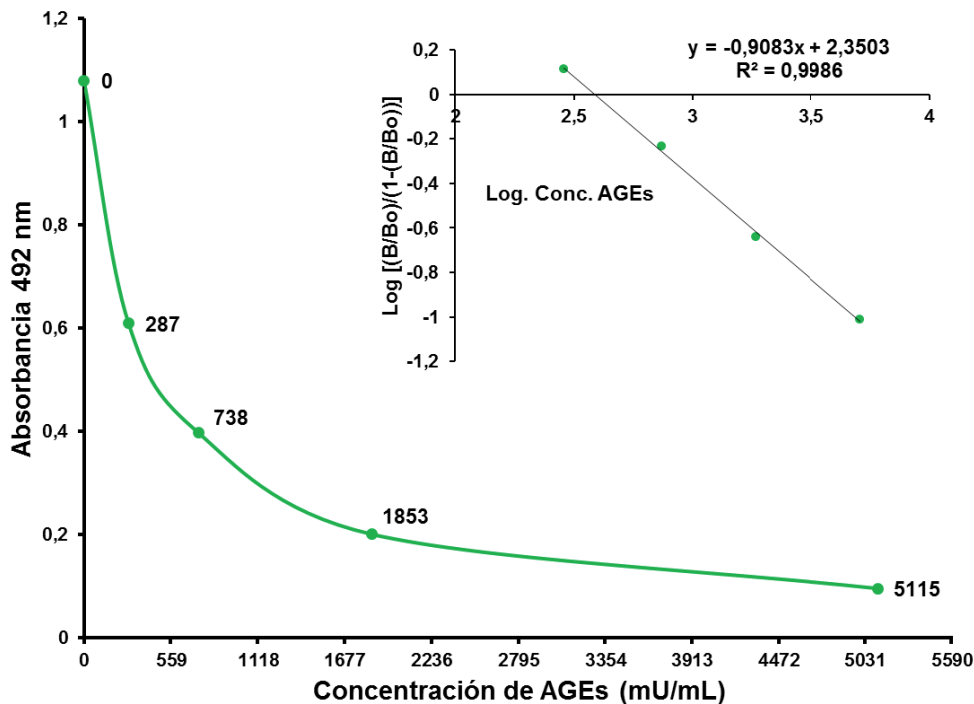


Figura 13. Curva típica del ensayo de ELISA para medir AGEs derivados de glucosa, rediseñado utilizando AGE-RNAsa como recubrimiento. Se muestra el desplazamiento característico de los ensayos de competición, así como la transformación matemática de la relación dosis-respuesta de la curva estándar.

Una vez rediseñado el ensayo de ELISA se procedió a su validación. En la Tabla 5 se muestran las características analíticas de los dos inmunoensayos, tanto del RIA como del ELISA rediseñado, se observa que ambos métodos son aptos para poder ser utilizados como métodos analíticos.

**Tabla 5. Características analíticas de los inmunoensayos RIA y ELISA para la cuantificación de AGEs.**

Características	RIA de AGEs	ELISA de AGEs
<b>Rango dinámico</b>	0-19200 µU/mL	0-5115 mU/mL
<b>Límite de detección</b>	20 µU/mL	41 mU/mL
<b>Repetibilidad</b>	<b>Control I.</b> 5.3% CV (1064-1314 µU/mL) <b>Control II.</b> 6.1% CV (4619-5900 µU/mL)	<b>Control I.</b> 10.4% CV (205-312 mU/mL) <b>Control II.</b> 8.0% CV (918-1268 mU/mL)
<b>Reproducibilidad</b>	<b>Control I.</b> 7.5% CV (1090-1477 µU/mL) <b>Control II.</b> 8.5% CV (4584-6450 µU/mL)	<b>Control I.</b> 9.3% CV (213-310 mU/mL) <b>Control II.</b> 4.9% CV (1023-1243 mU/mL)
<b>Interferencias</b>	Hb hasta 1.85 g/dL; no se encontró. Bilirrubina hasta 255 mg/dL; no se encontró. Colesterol hasta 860 mg/dL; no se encontró. Triglicéridos hasta 2664 mg/dL; no se encontró.	Hb hasta 1.85 g/dL; no se encontró. Bilirrubina hasta 255 mg/dL; no se encontró. Colesterol hasta 860 mg/dL; no se encontró. Triglicéridos hasta 2664 mg/dL; no se encontró.

#### 9.4. Relación de las concentraciones séricas de AGEs con la presencia de la enfermedad renal crónica en el paciente diabético

Con los dos inmunoensayos validados se midieron las concentraciones séricas de AGEs en muestras de sujetos normoglucémicos, diabéticos sin y con daño renal crónico. Los resultados se presentan en la Tabla 6, donde además, se puede ver cómo se comportan las variables clínicas y metabólicas estudiadas. Lo más interesante es que la glicemia aumentó en los grupos diabéticos como era de esperarse, pero el grupo de diabéticos con daño renal mostró en promedio concentraciones séricas de glucosa en ayuno en el rango de valores normales,



esto pudiera deberse a que estos pacientes dada su condición médica están sometidos a tratamientos más estrictos. Este grupo, mostró las mayores concentraciones séricas de insulina; incluso en varios sujetos llegaron a ser mayores a 200  $\mu\text{UI/mL}$  que corresponden a concentraciones supra-fisiológicas, lo que demuestra el uso exógeno de insulina. Las concentraciones séricas de hemoglobina glicosilada, no mostraron cambios significativos entre los grupos de pacientes diabéticos. Es decir la hemoglobina glicosilada no fue mayor en el grupo de diabéticos con daño renal, aunque estos sujetos sin duda alguna han estado expuestos por más tiempo al efecto tóxico de la glucosa. Esto se explica por el hecho que la hemoglobina glicosilada refleja el estado del control glicémico solo de los últimos 3 meses, período en el que el eritrocito se recambia. El uso en estos pacientes de insulina exógena contribuye de forma significativa a evitar el incremento en las concentraciones séricas de hemoglobina glicosilada. Se puede verificar la magnitud del daño renal crónico en los pacientes diabéticos estudiados, no solo por las elevadas concentraciones séricas de creatinina, sino también por las elevadas concentraciones séricas de urea y de PTH. Las concentraciones séricas de creatinina y urea son consecuencia de la reducción de la tasa de filtración glomerular, lo que provoca la disminución en la tasa de excreción renal de estos metabolitos. Por su parte, el incremento en las concentraciones séricas de PTH, un marcador específico de daño renal crónico, se explica debido a que durante el daño renal crónico, se produce una fuga masiva de calcio por el riñón y una disminución de la capacidad del riñón de sintetizar vitamina D para estimular la absorción intestinal de calcio. La hipocalcemia resultante es censada por la glándula paratiroidea, que responde incrementando la síntesis de PTH, para estimular la salida de calcio del hueso y tratar de compensar la deficiencia sérica de calcio (Guyton y Hall, 2001).

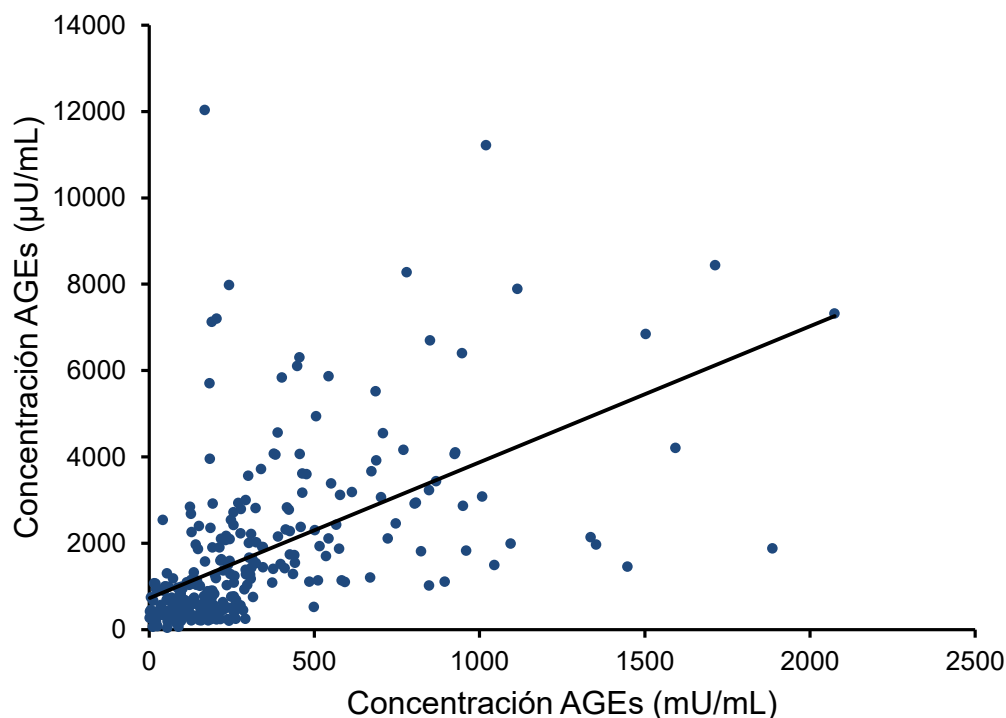
**Tabla 6. Características metabólicas de los sujetos controles, diabéticos sin y con daño renal crónico.**

Parámetros	Grupo control n=110		DM sin nefropatía n=46		DM con nefropatía n=121	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)
Sexo						
Mujeres	74	(67.3)	33	(71.7)	63	(52.1)
Hombres	36	(32.7)	13	(28.3)	58	(47.9)
	Media	IC 95%	Media	IC 95%	Media	IC 95%
Edad (años)	42.6 <sup>a</sup>	40.8-44.3	60.3 <sup>c</sup>	55.6-65	48.7 <sup>b</sup>	45.7-51.7
AGEs RIA (μU/mL)	<b>542<sup>a</sup></b>	<b>485-599</b>	<b>1157<sup>b</sup></b>	<b>620-1694</b>	<b>2993<sup>c</sup></b>	<b>2638-3348</b>
AGEs ELISA (mU/mL)	<b>116<sup>a</sup></b>	<b>101-131</b>	<b>185<sup>b</sup></b>	<b>145-225</b>	<b>544<sup>c</sup></b>	<b>475-612</b>
Glucosa (mg/dL)	<b>83<sup>a</sup></b>	<b>81-85</b>	<b>138<sup>c</sup></b>	<b>121-156</b>	<b>96<sup>b</sup></b>	<b>90-102</b>
Insulina (μUI/mL)	<b>4.8<sup>a</sup></b>	<b>3.6-6.0</b>	<b>5.4<sup>a</sup></b>	<b>3.2-7.6</b>	<b>61<sup>b</sup></b>	<b>39-83</b>
HOMA-IR	1.0 <sup>a</sup>	0.8-1.3	1.9 <sup>a</sup>	0.9-2.9	12.8 <sup>b</sup>	8.5-17.0
Triglicéridos (mg/dL)	<b>105<sup>a</sup></b>	<b>95-118</b>	<b>152<sup>b</sup></b>	<b>133-172</b>	<b>182<sup>b</sup></b>	<b>162-202</b>
Colesterol (mg/dL)	200 <sup>a</sup>	191-209	184 <sup>a</sup>	172-196	182 <sup>a</sup>	171-193
Creatinina (mg/dL)	<b>0.95<sup>a</sup></b>	<b>0.90-0.99</b>	<b>0.83<sup>a</sup></b>	<b>0.75-0.90</b>	<b>9.9<sup>b</sup></b>	<b>9.1-10.7</b>
Ácido Úrico (mg/dL)	6.2 <sup>b</sup>	5.9-6.4	5.4 <sup>a</sup>	5.0-5.7	6.6 <sup>b</sup>	6.2-6.9
Urea (mg/dL)	<b>30<sup>a</sup></b>	<b>29-32</b>	<b>29<sup>a</sup></b>	<b>26-32</b>	<b>136<sup>b</sup></b>	<b>127-145</b>
Hemoglobina glicosilada (%)	-	-	8 <sup>a</sup>	7.4-8.6	7.4 <sup>a</sup>	6.5-8.4
PTH (pg/mL)	-	-	-	-	<b>568</b>	<b>506-631</b>

Los datos se presentan como media y sus intervalos de confianza al 95%. Letras superíndice iguales significan que no hay diferencias significativas de dicha variable entre los grupos, letras distintas significan que hay diferencia en la variable en cuestión entre grupos.

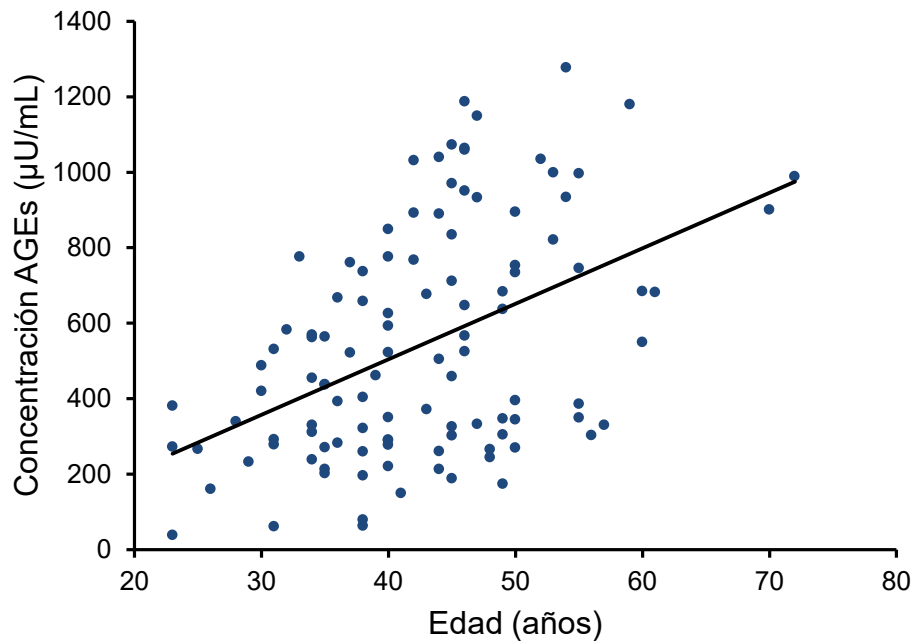
A diferencia de la hemoglobina glicosilada, las concentraciones séricas de AGEs medidas por ambos métodos, sí se asocian con el grado de deterioro del control metabólico. Se puede observar en la Figura 6 que los sujetos normoglicémicos tienen las concentraciones menores de AGEs, que aumentan en el grupo de pacientes con diabetes sin daño renal y son aún mayores en el grupo de pacientes diabéticos con daño renal crónico. Esto demuestra que los AGEs son un mejor marcador del estado de control metabólico a largo plazo. El incremento en las concentraciones séricas de AGEs es el reflejo de que el sujeto ha estado sometido por largos períodos de tiempo bajo los efectos tóxicos de la hiperglicemia, que conlleva al desarrollo de complicaciones crónicas, tales como la nefropatía diabética. A su vez, la presencia del daño renal crónico conduce a una menor

excreción renal de AGEs favoreciendo su acumulación, por ello los pacientes diabéticos con nefropatía tienen las mayores concentraciones séricas de AGEs. Se puede observar en la Figura 14 que existe una asociación significativa entre las concentraciones séricas de AGEs medidas por ambos métodos, lo que reafirma que el rediseño del método de ELISA fue adecuado.



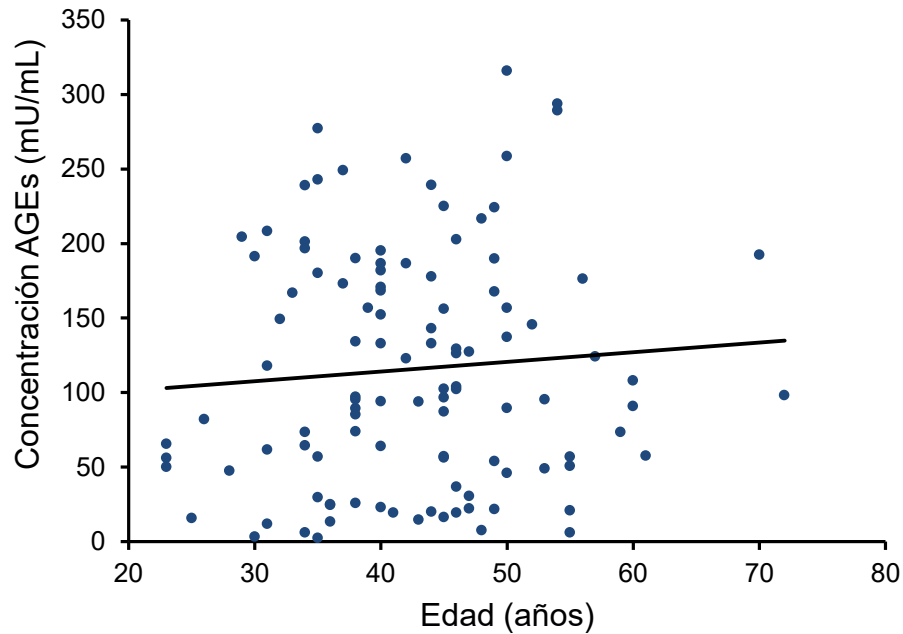
**Figura 14. Asociación entre las concentraciones séricas de AGEs medidas por el RIA y el ELISA rediseñado. Se obtuvo la siguiente ecuación de regresión lineal:  $[AGEs\ RIA] = 3.2 * [AGEs\ ELISA] + 725$ . IC 95% del Coeficiente  $\beta = 2.6 - 3.7$ ,  $p < 0.0001$ .**

Dado que la formación de AGEs es un proceso típico del envejecimiento, se evaluó la asociación entre las concentraciones séricas de AGEs, medidas por cada uno de los dos métodos, con la edad biológica de los pacientes. En la figura 15 se puede ver que el análisis de regresión lineal simple mostró una asociación estadísticamente significativa entre el incremento de la edad y el incremento en las concentraciones circulantes de AGEs medidos por el RIA. Es importante recordar que debido al diseño analítico el RIA solo detecta las proteínas glicadas intactas, sin degradar, que son las que son capaces de ser reconocidas por los anticuerpos en solución y permitir la formación de inmunocomplejos precipitables.



**Figura 15. Asociación de la concentración de AGEs medidos por RIA con la edad biológica. Se obtuvo la siguiente ecuación de regresión lineal:  $[AGEs\ RIA] = 14.7 * [Edad] - 84$ . IC 95% del Coeficiente  $\beta = 9.2 - 20.2$ ,  $p < 0.0001$ .**

A diferencia de la medición de AGEs por el RIA, las concentraciones séricas de AGEs medidas por el ELISA, no presentaron una asociación significativa con la edad de los sujetos (Figura 16). Es decir las concentraciones séricas de AGEs reportadas por el ELISA son independientes de la edad de los sujetos. Esto se debe al hecho que el ELISA mide una combinación de AGEs intactos, AGEs degradados y anticuerpos anti-AGEs. Estos últimos son los encargados de mediar el proceso de degradación de los AGEs al unirlos y movilizar el proceso de su fagocitosis.



**Figura 16. Asociación de la concentración de AGEs medidos por ELISA con la edad biológica. Se obtuvo la siguiente ecuación de regresión lineal:  $[AGEs\ ELISA] = 0,65 * [Edad] + 88$ . IC 95% del Coeficiente  $\beta = -0,95 - 2,2$ ,  $p = 0,422$ .**

Dado que la edad biológica puede ser una variable confusoria para el establecimiento del valor de referencia para la determinación de AGEs medido por el método de RIA, el grupo control normoglicémico se dividió por décadas de edades biológicas pudiéndose establecer los valores esperados por grupo de edades en la población control estudiada. En la Tabla 7, podemos observar que las concentraciones séricas de AGEs medidas por grupos de edades aumentan significativamente, a medida que aumenta la edad de los grupos, solo cuando los AGEs son medidos por el RIA, no así cuando son medidos por el ELISA.

**Tabla 7. Concentraciones séricas de AGEs medidos por RIA y ELISA en sujetos normoglicémicos controles agrupados por grupos de edades.**

Rangos de edad biológica (años)	AGEs por RIA (μU/mL) Media (IC 95%); n	AGEs por ELISA (mU/mL) Media (IC 95%); n
23-30	289 <sup>a</sup> (39-488); 9	80 <sup>a</sup> (3-205); 9
31-40	422 <sup>b</sup> (65-776); 42	121 <sup>a</sup> (7-248); 42
41-50	622 <sup>c</sup> (176-1138); 42	119 <sup>a</sup> (15-258); 42
51-60	757 <sup>d</sup> (303-1277); 14	113 <sup>a</sup> (6-294); 14
61-72	857 <sup>e</sup> (682-989); 3	116 <sup>a</sup> (58-193); 3

Los datos se presentan como media y sus intervalos de confianza al 95%. Letras superíndice iguales significan que no hay diferencias significativas de dicha variable entre los grupos, letras distintas significan que hay diferencia en la variable en cuestión entre grupos.

#### 9.4.1. Asociación de las concentraciones de AGEs medidos por el RIA con los parámetros clínicos y metabólicos estudiados.

Al evaluar la asociación entre las concentraciones séricas de AGEs medidas por el RIA, con el resto de los parámetros clínicos y metabólicos en el total de la población de estudio (277 sujetos totales: 110 normoglicémicos controles, 46 diabéticos sin daño renal y 121 diabéticos con daño renal crónico), solo se encontró asociación significativa con las concentraciones séricas de AGEs medidas por el ELISA y con las concentraciones séricas de creatinina (Tabla 8).

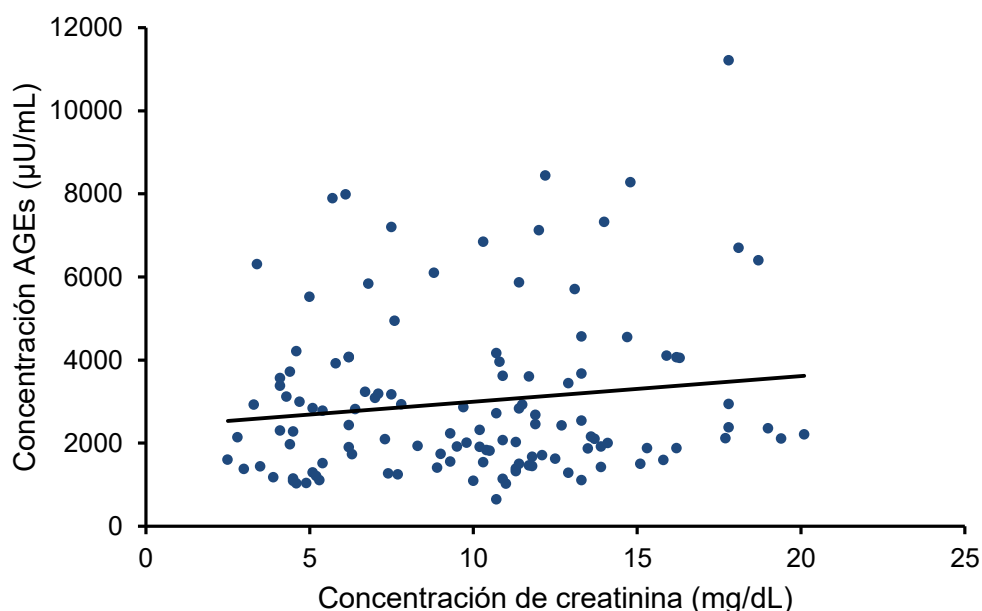
**Tabla 8. Asociación entre las concentraciones séricas de AGEs medidas por el RIA con el resto de los parámetros clínicos y metabólicos estudiados.**

AGEs por RIA vs	Coficiente	Error estándar	t	p	IC 95%	
Edad	-1.82	6.94	-0.26	0.793	-15.52	11.86
Sexo	157.87	203.42	0.78	0.438	-242.94	558.69
Insulina	2.55	4.48	0.57	0.569	-6.27	11.37
<b>AGEs por ELISA (mU/mL)</b>	<b>1.57</b>	<b>0.40</b>	<b>3.97</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>0.79</b>	<b>2.35</b>
Glucosa (mg/dL)	1.29	2.61	0.49	0.621	-3.84	6.42
HOMA-IR	-19.33	22.43	-0.86	0.390	-63.53	24.87
Colesterol (mg/dL)	0.04	1.98	0.02	0.982	-3.85	3.94
Triglicéridos (mg/dL)	0.42	1.38	0.30	0.763	-2.31	3.15
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	<b>114.12</b>	<b>35.06</b>	<b>3.26</b>	<b>0.001</b>	<b>45.04</b>	<b>183.20</b>
Urea (mg/dL)	11.78	157.71	0.07	0.941	-298.97	322.53
Ácido Úrico (mg/dL)	10.62	65.13	0.16	0.871	-1489.50	138.95

**Modelo de regresión lineal múltiple para la asociación entre las concentraciones séricas de AGEs medidas por RIA y el resto de los parámetros estudiados.**

Esto demuestra la concordancia entre la medición de las concentraciones séricas de AGEs por ambos métodos y su estrecha relación con el grado de la función renal. El modelo de regresión lineal múltiple obtenido sugiere que independientemente del resto de los parámetros clínicos y metabólicos, en promedio por cada aumento de 1 mg/dL de creatinina, las concentraciones séricas de AGEs medidas por el RIA aumentan 114  $\mu\text{U}/\text{mL}$ . Lo que demuestra la alta interrelación entre el incremento sérico de AGEs y el deterioro de la función renal en el paciente diabético.

Dado que el resto de las variables estudiadas no se asociaron significativamente con las concentraciones séricas de AGEs medidas por RIA, realizamos un análisis de regresión lineal simple para esclarecer la interrelación entre las concentraciones séricas de AGEs medidas por RIA con las concentraciones séricas de creatinina, los resultados se presentan en la Figura 17.



**Figura 17. Asociación de las concentraciones séricas de AGEs medidas por RIA con las concentraciones séricas de creatinina. Se obtuvo la siguiente ecuación de regresión lineal:  $[\text{AGEs RIA}] = 196 * [\text{Creatinina}] + 764$ ,  $p < 0.0001$ .**

Los resultados sugieren que por cada incremento de 1 mg/dL de creatinina sérica, las concentraciones séricas de AGEs medidas por RIA aumentan en promedio 196  $\mu$ U/mL.

#### 9.4.2. Asociación de las concentraciones de AGEs medidos por el ELISA con los parámetros clínicos y metabólicos estudiados.

Al evaluar la asociación entre las concentraciones séricas de AGEs medidas por el ELISA, con el resto de los parámetros clínicos y metabólicos en el total de la población de estudio (277 sujetos totales: 110 normoglicémicos controles, 46 diabéticos sin daño renal y 121 diabéticos con daño renal crónico), solo se encontró asociación significativa con las concentraciones séricas de AGEs medidas por el RIA, con las concentraciones séricas de creatinina y con las concentraciones séricas de triglicéridos (Tabla 9).

**Tabla 9. Asociación entre las concentraciones séricas de AGEs medidas por el ELISA con el resto de los parámetros clínicos y metabólicos estudiados.**

AGEs por ELISA vs	Coficiente	Error estándar	t	p	IC 95%	
Edad	1.46	1.21	1.30	0.194	-0.75	3.67
Sexo	18.23	32.98	0.55	0.581	-46.74	83.21
Insulina	-0.24	0.73	-0.32	0.746	-1.67	1.19
<b>AGEs por RIA (<math>\mu</math>U/mL)</b>	<b>0.04</b>	<b>0.01</b>	<b>3.97</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>0.02</b>	<b>0.06</b>
Glucosa (mg/dL)	-0.21	0.42	-0.50	0.615	-1.04	0.62
HOMA-IR	3.80	6.63	1.05	0.296	-3.35	10.96
Colesterol (mg/dL)	0.12	0.32	0.36	0.716	-0.51	0.75
<b>Triglicéridos (mg/dL)</b>	<b>0.46</b>	<b>0.22</b>	<b>2.06</b>	<b>0.040</b>	<b>0.02</b>	<b>0.90</b>
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	<b>20.22</b>	<b>5.65</b>	<b>3.58</b>	<b>&lt;0.0001</b>	<b>9.08</b>	<b>31.36</b>
Urea (mg/dL)	6.25	25.55	0.24	0.807	-44.09	56.58
Ácido Úrico (mg/dL)	-14.05	10.51	-1.34	0.183	-34.7637	6.66

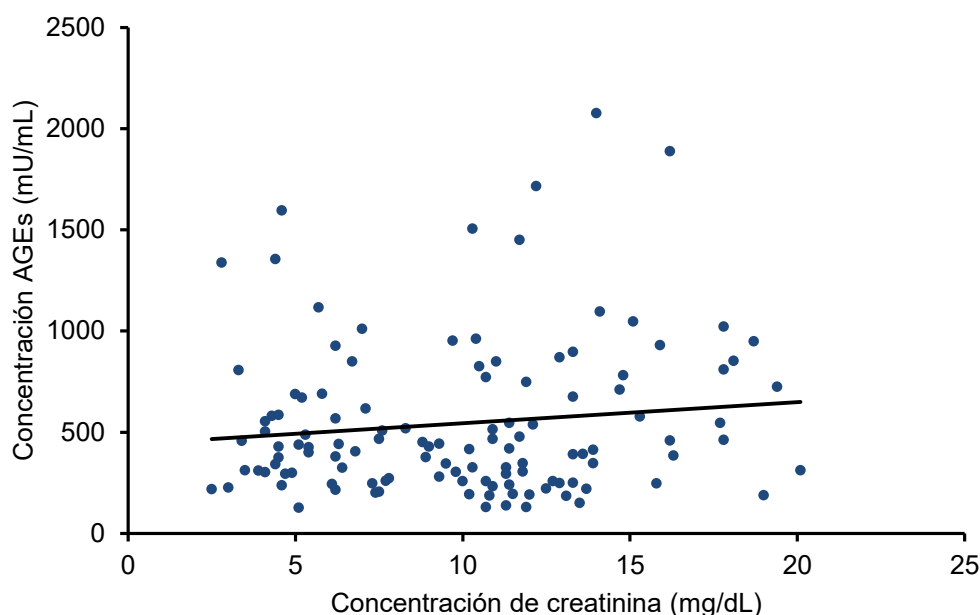
#### Modelo de regresión múltiple para la asociación entre las concentraciones séricas de AGEs medidas por RIA y el resto de los parámetros estudiados.

Esto demuestra la concordancia entre la medición de las concentraciones séricas de AGEs por ambos métodos y su estrecha relación con el grado de la función renal. El modelo de regresión lineal múltiple obtenido sugiere que independientemente del resto de los parámetros clínicos y metabólicos, en promedio por cada aumento de 1 mg/dL de creatinina, las concentraciones séricas



de AGEs medidas por el ELISA aumentan 20 mU/mL. Lo que demuestra la alta interrelación entre el incremento sérico de AGEs y el deterioro de la función renal en el paciente diabético. La asociación de las concentraciones séricas de AGEs medidas por ELISA con las concentraciones séricas de triglicéridos sugiere que por cada 1 mg/dL de incremento en las concentraciones séricas de triglicéridos se produce un incremento de 0.46 mU/mL en las concentraciones séricas de AGEs medidas por ELISA. Esta asociación sugiere una interrelación entre los incrementos en las concentraciones séricas de AGEs y el incremento en las concentraciones circulantes de triglicéridos, mismo que refleja un cierto deterioro del estado de control metabólico.

Dado que el resto de las variables estudiadas no se asociaron significativamente con las concentraciones séricas de AGEs medidas por ELISA, y que la asociación observada con las concentraciones séricas de triglicéridos aunque significativa es baja, realizamos un análisis de regresión lineal simple para esclarecer la interrelación entre las concentraciones séricas de AGEs medidas por ELISA con las concentraciones séricas de creatinina, los resultados se presentan en la Figura 18.

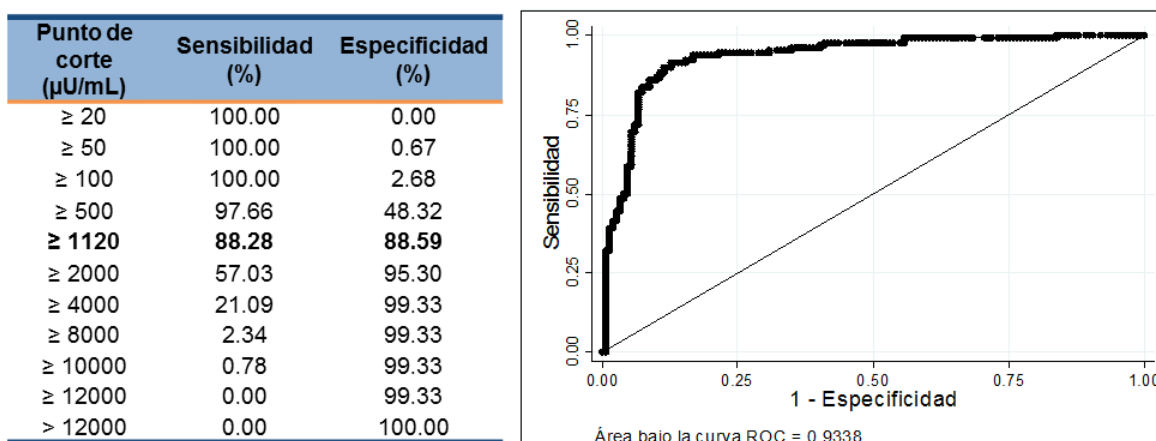


**Figura 18. Asociación de las concentraciones séricas de AGEs medidas por ELISA con las concentraciones séricas de creatinina. Se obtuvo la siguiente ecuación de regresión lineal:  $[AGEs\ ELISA] = 35 * [Creatinina] + 144$ .  $p < 0.0001$ .**

Los resultados sugieren que por cada incremento de 1 mg/dL de creatinina sérica, las concentraciones séricas de AGEs medidas por ELISA aumentan en promedio 35 mU/mL.

### 9.4.3. Estimación del valor de corte óptimo para las concentraciones séricas de AGEs medidas por RIA y su valor diagnóstico para el tamizaje de pacientes con nefropatía diabética.

Se evaluó la relación de sensibilidad y especificidad de las concentraciones séricas de AGEs medidas por RIA para el tamizaje de pacientes diabéticos con daño renal crónico (creatinina  $\geq 1.3$  mg/dL) y se construyó la curva ROC correspondiente. Los resultados se presentan en la Figura 19.



**Figura 19. Determinación del valor de corte óptimo de la medición de AGEs por RIA para el tamizaje de pacientes diabéticos con daño renal crónico (creatinina sérica  $\geq 1.3$  mg/dL). Se muestran diferentes valores de corte y sus correspondientes valores de sensibilidad y especificidad, así como el área bajo la curva ROC.**

Como se puede observar en la figura 19, la mejor relación de sensibilidad especificidad se obtuvo con un valor de corte óptimo de  $\geq 1120$   $\mu\text{U/mL}$ , con una sensibilidad de 88.3% y una especificidad de 88.6%.

La capacidad analítica de la medición de AGEs por RIA utilizando el valor de corte  $\geq 1120$   $\mu\text{U/mL}$  para el tamizaje de pacientes diabéticos con daño renal crónico (creatinina sérica  $\geq 1.3$  mg/dL) se presenta en la Tabla 10.

**Tabla 10. Capacidad analítica de la cuantificación de AGEs séricos por RIA para el tamizaje de pacientes con nefropatía diabética.**

Clasificación	Creatinina $\geq$ 1.3 (mg/dL) (A)	Creatinina < 1.3 (mg/dL) (N)	Total
AGES $\geq$ 1120 ( $\mu$ U/mL) (+)	113	17	130
AGES < 1120 ( $\mu$ U/mL) (-)	15	132	147
<b>Total</b>	<b>128</b>	<b>149</b>	<b>277</b>

Parámetro	Definición	RIA ( $\mu$ U/mL)
Total de sujetos evaluados		277
Punto de corte óptimo		$\geq$ 1120
Prevalencia de nefropatía	Pr (A)	46%
Sensibilidad	Pr (+/A)	88.3%
Especificidad	Pr (-/N)	88.6%
Valor predictivo positivo	Pr (A/+)	86.9%
Valor predictivo negativo	Pr (N/-)	89.8%
Falso positivo para N	Pr (+/N)	11.4%
Falso negativo para A	Pr (-/A)	11.7%
Falso positivo para +	Pr (N/+)	13.1%
Falso negativo para -	Pr (A/-)	10.2%
<b>Correctamente diagnosticado</b>		<b>88.5 %</b>

Los resultados obtenidos sugieren que utilizando un valor de corte de  $\geq$  1120  $\mu$ U/mL el RIA pudo clasificar correctamente al 88.5% de los sujetos evaluados. El 89.8% de los sujetos con concentraciones séricas de AGEs < 1120  $\mu$ U/mL fueron correctamente diagnosticados como sanos, pues tenían concentraciones séricas de creatinina < 1.3 mg/dL. Solo un 10.2% fueron mal clasificados como sanos ya que tenían concentraciones séricas de AGEs < 1120  $\mu$ U/mL pero concentraciones séricas de creatinina  $\geq$  1.3 mg/dL. A su vez el método pudo clasificar correctamente al 86.9% de los pacientes enfermos que tenían concentraciones séricas de AGEs  $\geq$  1120  $\mu$ U/mL y sufrían daño renal crónico (creatinina sérica  $\geq$  1.3 mg/dL). Solo un 13.1% de los sujetos con concentraciones séricas de AGEs  $\geq$  1120  $\mu$ U/mL fueron mal clasificados como enfermo, siendo que aún tenían concentraciones séricas de creatinina < 1.3 mg/dL.

El análisis de regresión logística sugiere que los pacientes diabéticos con concentraciones séricas de AGEs mediadas por RIA  $\geq$  1120  $\mu$ U/mL, independientemente de su edad biológica, tienen 61 veces más probabilidad de padecer de daño renal crónico (Tabla 11).

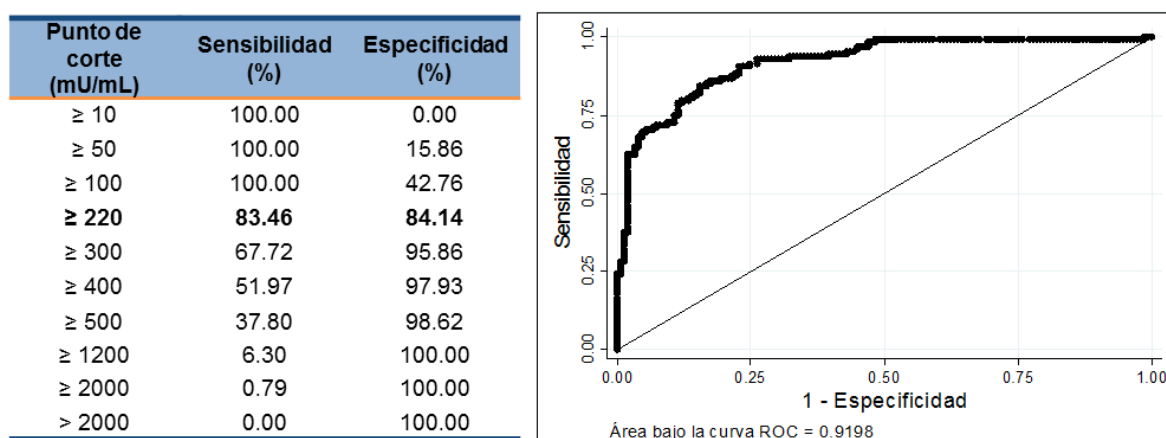
**Tabla 11. Probabilidad de tener concentraciones séricas de AGEs medias por RIA  $\geq 1120 \mu\text{U/mL}$  y padecer de daño renal crónico.**

Creatinina $\geq 1.3$ (mg/dL)	OR	Error estándar	z	p	IC 95%	
AGEs $\geq 1120$ ( $\mu\text{U/mL}$ )	61.28	23.61	10.68	<0.0001	28.79	130.44
Edad	0.99	0.01	-0.82	0.414	0.97	1.01

Esto quiere decir que independientemente de la edad biológica, por cada 1 paciente diabético que tenga concentraciones séricas de AGEs medidas por RIA  $\geq 1120 \mu\text{U/mL}$  y que no padezca aún de daño renal (clínicamente evidente: concentración sérica de creatinina  $\geq 1.3$  mg/dL), existen 61 pacientes con concentraciones séricas de AGEs  $\geq 1120 \mu\text{U/mL}$  que ya tienen manifestaciones clínicas de daño renal crónico.

#### 9.4.4. Estimación del valor de corte óptimo para las concentraciones séricas de AGEs medidas por ELISA y su valor diagnóstico para el tamizaje de pacientes con nefropatía diabética.

Se evaluó la relación de sensibilidad y especificidad de las concentraciones séricas de AGEs medidas por ELISA para el tamizaje de pacientes diabéticos con daño renal crónico (creatinina  $\geq 1.3$  mg/dL) y se construyó la curva ROC correspondiente. Los resultados se presentan en la Figura 20.



**Figura 20. Determinación del valor de corte óptimo de la medición de AGEs por ELISA para el tamizaje de pacientes diabéticos con daño renal crónico (creatinina sérica  $\geq 1.3$  mg/dL). Se muestran diferentes valores de corte y sus correspondientes valores de sensibilidad y especificidad, así como el área bajo la curva ROC.**

Como se puede observar en la Figura 20, la mejor relación de sensibilidad especificidad se obtuvo con un valor de corte óptimo de  $\geq 220$  mU/mL, con una sensibilidad de 83.5% y una especificidad de 84.1%.

La capacidad analítica de la medición de AGEs por ELISA utilizando el valor de corte  $\geq 220$  mU/mL para el tamizaje de pacientes diabéticos con daño renal crónico (creatinina sérica  $\geq 1.3$  mg/dL) se presenta en la Tabla 12.

**Tabla 12. Capacidad analítica de la cuantificación de AGEs séricos por ELISA para el tamizaje de pacientes con nefropatía diabética.**

Clasificación	Creatinina $\geq 1.3$ (mg/dL) (A)	Creatinina $< 1.3$ (mg/dL) (N)	Total
AGES $\geq 220$ (mU/mL) (+)	106	23	139
AGES $< 220$ (mU/mL) (-)	22	126	148
<b>Total</b>	<b>128</b>	<b>149</b>	<b>277</b>

Parámetro	Definición	ELISA (mU/mL)
Total de sujetos evaluados		277
Punto de corte óptimo		$\geq 220$
Prevalencia de nefropatía	Pr (A)	46%
Sensibilidad	Pr (+/A)	82.8%
Especificidad	Pr (-/N)	84.6%
Valor predictivo positivo	Pr (A/+)	82.2%
Valor predictivo negativo	Pr (N/-)	85.1%
Falso positivo para N	Pr (+/N)	15.4%
Falso negativo para A	Pr (-/A)	17.2%
Falso positivo para +	Pr (N/+)	17.8%
Falso negativo para -	Pr (A/-)	14.9%
<b>Correctamente diagnosticado</b>		<b>83.8 %</b>

Los resultados obtenidos sugieren que utilizando un valor de corte de  $\geq 220$  mU/mL el ELISA pudo clasificar correctamente al 83.8% de los sujetos evaluados. El 85.1% de los sujetos con concentraciones séricas de AGEs  $< 220$  mU/mL fueron correctamente diagnosticados como sanos, pues tenían concentraciones séricas de creatinina  $< 1.3$  mg/dL. Solo un 14.9% fueron mal clasificados como sanos por tener AGEs  $< 220$  mU/mL y concentraciones séricas de creatinina  $\geq 1.3$  mg/dL. A su vez el método pudo clasificar correctamente al 82.2% de los pacientes enfermos que tenían concentraciones séricas de AGEs  $\geq 220$  mU/mL y

que sufrían daño renal crónico (creatinina sérica  $\geq 1.3$  mg/dL). Solo un 17.8% de los sujetos con concentraciones séricas de AGEs  $\geq 220$  mU/mL fueron mal clasificados como enfermo, siendo que aún tenían concentraciones séricas de creatinina  $< 1.3$  mg/dL.

El análisis de regresión logística sugiere que los pacientes diabéticos con concentraciones séricas de AGEs mediadas por ELISA  $\geq 220$  mU/mL, independientemente de su edad biológica, tienen 26 veces más probabilidad de padecer de daño renal crónico (Tabla 13).

**Tabla 13. Probabilidad de tener concentraciones séricas de AGEs medias por ELISA  $\geq 220$  mU/mL y padecer de daño renal crónico.**

Creatinina $\geq 1.3$ (mg/dL)	OR	Error estándar	z	p	IC 95%	
AGEs $\geq 220$ (mU/mL)	26.34	8.59	10.03	$<0.0001$	13.90	49.93
Edad	1.00	0.01	0.15	0.878	0.98	1.02

Esto quiere decir que independientemente de la edad biológica, por cada 1 paciente diabético que tenga concentraciones séricas de AGEs medidas por ELISA  $\geq 220$  mU/mL y que no padezca aún de daño renal (clínicamente evidente: concentración sérica de creatinina  $\geq 1.3$  mg/dL), existen 26 pacientes con concentraciones séricas de AGEs  $\geq 220$  mU/mL que ya tienen manifestaciones clínicas de daño renal crónico.

La asociación significativa, observada en ambos métodos, entre las concentraciones séricas de AGEs y las concentraciones séricas de creatinina, demuestran sin lugar a dudas que el deterioro de la función renal, caracterizado por el incremento sérico de creatinina, se asocia con una menor tasa de excreción renal de los AGEs. Dicha reducción en la eliminación de AGEs a través del riñón dependiente de la función renal, podría ser incluso más sensible que la reducción de la excreción de creatinina para identificar sujetos diabéticos con deterioro de la función renal; ya que se sabe que la creatinina sérica comienza a elevarse solamente cuando la tasa de filtración glomerular se reduce por debajo del 50% (Guyton y Hall, 2001). En el presente estudio, esto queda evidenciado por la

existencia de un grupo de sujetos que teniendo aún concentraciones séricas de creatininas menores a 1.3 mg/dL, ya tienen concentraciones séricas de AGEs mayores a los valores de corte establecidos por cada uno de los inmunoensayos desarrollados. Por lo cual consideramos que la medición de AGEs pudiera tener un valor diagnóstico mayor para identificar preventivamente aquellos pacientes diabéticos que tengan más probabilidades de desarrollar daño renal crónico.

A pesar de que el rediseño del ELISA mejoró su capacidad diagnóstica, el RIA muestra un mejor desempeño para diagnosticar la presencia del daño renal en el paciente diabético. No obstante, debido a que el ELISA puede ser empleado por una mayor cantidad de laboratorios, debido a las menores restricciones de regulación y economía de la tecnología necesaria, pudiera ser más accesible en la práctica médica. Ambos métodos pueden convertirse en una herramienta analítica práctica, ya que a diferencias de otros métodos como el HPLC y la espectrometría de masa, son más económicos y tienen mayor capacidad de procesamiento de muestras, por lo que pueden ser empleados masivamente.

Los resultados obtenidos de este estudio de casos y controles sugieren la validez de ambos inmunoensayos desarrollados para identificar aquellos pacientes diabéticos con concentraciones elevadas de AGEs, mismos que tienen mayores probabilidades de desarrollar daño renal crónico. A pesar de la complejidad del mismo, diseñar y llevar a cabo un estudio prospectivo longitudinal sería de mucha utilidad para dar mayor información sobre la capacidad diagnóstica de la medición de AGEs, al permitir estimar el riesgo relativo de desarrollar daño renal crónico en pacientes diabéticos. No obstante los resultados obtenidos del presente trabajo sugieren que la medición de las concentraciones séricas de AGEs por las metodologías desarrolladas pueden ser una herramienta útil tanto para el monitoreo del control glicémico a largo plazo del paciente diabético, así como para identificar cuales pacientes diabéticos tienen mayores probabilidades de desarrollar complicaciones crónicas asociadas a la DM; esto permitiría brindarles oportunamente una atención más especializada, lo que pudiera contribuir a la reducción de la incidencia de las mismas.

## 10. CONCLUSIONES

Una vez rediseñado el ELISA de AGEs, se pudieron establecer valores de las concentraciones séricas de AGEs medidas por ambos métodos para sujetos normoglicémicos controles y diabéticos sin y con daño renal crónico. Se estableció la magnitud de la asociación positiva y significativa que existe entre el incremento en las concentraciones séricas de AGEs, medidos por ambos inmunoensayos desarrollados, con la disminución de la función renal en el paciente diabético. Se pudieron establecer los valores de corte óptimos para las concentraciones séricas de AGEs medidas por cada uno de los inmunoensayos y sus valores diagnóstico para el tamizaje de pacientes diabéticos con daño renal crónico. El uso de ambos métodos pudiera contribuir de manera significativa en el monitoreo de los pacientes diabéticos a fin de identificar cuales pacientes han estado sometidos por mayores períodos de tiempo al efecto tóxico de la hiperglicemia, que se traduce en incrementos en las concentraciones séricas de AGEs y en el deterioro de la función renal.





## 11. RECOMENDACIONES

Recomendamos el uso de estos métodos analíticos como herramienta de diagnóstico preventivo, ya que con ello se pudiera lograr la identificación oportuna de los pacientes diabéticos con concentraciones séricas elevadas de AGEs y mayores probabilidades de desarrollar complicaciones crónicas asociadas a la DM. Con lo cual se lograría una reducción significativa de los elevados costos de los tratamientos necesarios para el manejo de las complicaciones crónicas.

## REFERENCIAS

- Actis S, Rebolledo O. 2000. La glicación y glicoxidación de las lipoproteínas su importancia en la diabetes mellitus. *MEDICINA (Buenos Aires)*; 60: 645-656.
- American Diabetes Association, 2013. Standards of Medical Care in Diabetes--2013. *Diabetes Care* 36, S11–S66.
- Aronson, D., 2008. Hyperglycemia and the pathobiology of diabetic complications. *Cardiovasc. Diabetol. Clin. Metab. Inflamm. Facets* 45, 1–16.
- Barraza-Lloréns, et al., 2015. Carga Económica de la Diabetes Mellitus en México, 2013. *Funsalud. México*.
- Bishop M, Fody E, Schoeff L. 2010. *Clinical chemistry: techniques, principles, correlations*. 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 309-327.
- Butte NF. 2000. Carbohydrate and lipid metabolism in pregnancy: normal compared with gestational diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr.*; 71 (Supl.1): 1256–61.
- Cárdenas M, Díaz E, Sánchez P, et al. 2009. Glicación y entrecruzamiento de proteínas en la patogénesis de la diabetes y el envejecimiento. *Rev de Invest Clin*; 61 (6): 505-520.
- Chew-Harris, J.S.C., Chin, P.K., Florkowski, C.M., George, P., Endre, Z., 2015. Removal of body surface area normalisation improves raw-measured GFR estimation by the CKD-EPI equation and drug dosing in the obese. *Intern. Med. J.*
- Domínguez P y del Castillo B. 2015. Estrategias para la reducción de la formación de productos avanzados de la glicación en alimentos y bebidas. Control de procesos y reformulación. Libro de Resúmenes Jornadas de Estudiantes de Máster en Química Agrícola y Nuevos Alimentos Facultad de Ciencias Universidad Autónoma de Madrid. 9:30–11:30. Exposición de Trabajos. Sesión 3.
- Ford, E.S., Giles, W.H., Mokdad, A.H., 2004. Increasing Prevalence of the Metabolic Syndrome Among U.S. Adults. *Diabetes Care* 27, 2444–2449.

- Goldin A, Beckman J, Schmidt A, Creager M. 2006. Advanced Glycation End Products sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation*; 114: 597-605.
- González Suarez et al., 2013. Diabetic nephropathy: Is it time yet for routine kidney biopsy?. *World J Diabetes*. Dec 15; 4(6): 245-55.
- Gugliucci A. 2000. Glycation as the glucose link to diabetic complications. *JAOA*; 100 (10): 621-631.
- Guyton AC y Hall JE. 2001. Micción, diuréticos y enfermedades renales. En: Guyton AC (Ed.), *Tratado de fisiología médica* (443-461). D.F., México: McGraw-Hill Interamericana.
- Hongwei, S., Chunlei, H., Zhili, L., Zhifang, W., Sijin, L., Mingming, W., 2015. Evaluation of the estimated variables for scaling glomerular filtration rate of renal patients: A repeated measures-based method. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1–6.
- Jax, T.W., 2010. Metabolic memory: a vascular perspective. *Cardiovasc. Diabetol.* 9, 51.
- Jiménez-Corona, A., Aguilar-Salinas, C.A., Rojas-Martínez, R., Hernández-Ávila, M., 2013. Diabetes mellitus tipo 2 y frecuencia de acciones para su prevención y control. *Salud Pública México* 55, S137–S143.
- John, W.G., Lamb, E.J., 1993. The maillard or browning reaction in diabetes. *Eye* 7, 230–237.
- Kolb, H., Mandrup-Poulsen, T., 2009. The global diabetes epidemic as a consequence of lifestyle-induced low-grade inflammation. *Diabetologia* 53, 10–20.
- Levey, A.S., Stevens, L.A., Schmid, C.H., Zhang, Y. (Lucy), Castro, A.F., Feldman, H.I., Kusek, J.W., Eggers, P., Van Lente, F., Greene, T., Coresh, J., 2009. A New Equation to Estimate Glomerular Filtration Rate. *Ann. Intern. Med.* 150, 604–612.
- Matough, F.A., Budin, S.B., Hamid, Z.A., Alwahaibi, N., Mohamed, J., 2012. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Diabetic Complications. *Sultan Qaboos Univ. Med. J.* 12, 5–18.
- Matthews, D.R., Hosker, J.P., Rudenski, A.S., Naylor, B.A., Treacher, D.F., Turner, R.C., 1985. Homeostasis model assessment: insulin resistance and  $\beta$ -cell

function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28, 412–419.

Méndez J. 2003. Productos finales de glicación avanzada y complicaciones crónicas de la diabetes Mellitus. *Gac Méd Mex*; Vol. 139 No. 1: 49-55.

Molitch ME, DeFronzo RA, Franz MJ, Keane WF, Mogensen CE, Parving HH, Steffes MW; American Diabetes Association., 2004. Nephropathy in Diabetes. *Diabetes Care* 27, s79–s83.

Negre-Salvayre Anne, Salvayre Robert, Augé Nathalie, Pamplona Reinald, Portero-Otín Manuel, 2009. Hyperglycemia and glycation in diabetic complications. *Antioxid. Redox Signal.* 11(12):3071-109.

Organización Mundial de la Salud (OMS). 2012. Diabetes: el costo de la diabetes. Hoja de hechos no. 236.

Organización Mundial de la Salud (OMS). 2008. The Global Burden of Disease: 2004 Update. World Health Organization.

Petrica, L., Vlad, A., Gluhovschi, G., Zamfir, A., Popescu, C., Gadalean, F., Dumitrascu, V., Vlad, D., Popescu, R., Velcirov, S., Gluhovschi, C., Bob, F., Milas, O., Ursoniu, S., 2015. Glycated peptides are associated with proximal tubule dysfunction in type 2 diabetes mellitus. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 8, 2516–2525.

Piniés José Antonio. 2002. Complicaciones agudas y crónicas, un riesgo que debe ser evitado. *Economía de la salud. Monográfico*, 7 (2). España,: 64-7.

Raciti, G.A., Longo, M., Parrillo, L., Ciccarelli, M., Mirra, P., Ungaro, P., Formisano, P., Miele, C., Béguinot, F., 2015. Understanding type 2 diabetes: from genetics to epigenetics. *Acta Diabetol.* 1–7.

Rodríguez J. 2009. Estudio de diferentes marcadores de glicación en las complicaciones crónicas de la Diabetes Mellitus (Tesis Doctoral). Santiago de Compostela: Universidad de Santiago de Compostela.

Rosner, M.H., Bolton, W.K., 2006. Renal Function Testing. *Am. J. Kidney Dis.* 47, 174–183.

Ruggenti, P., Remuzzi, G., 1998. Nephropathy of type-2 diabetes mellitus. *J. Am. Soc. Nephrol.* 9, 2157–2169.

Russell, N.D.F., Cooper, M.E., 2015. 50 years forward: mechanisms of hyperglycaemia-driven diabetic complications. *Diabetologia.*

- Secretaria de Salud. 2016. Instituto Nacional de Salud Pública. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición: Resultados Nacionales 2016 (ENSANUT). 1ª ed. México.
- Secretaria de Salud. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2010, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus. Diario Oficial, segunda sección. México D. F.
- Seely EW, Solomon CG. 2003. Insulin resistance and its potential role in pregnancy-induced hypertension. *J Clin Endocrinol Metab.*; 88: 2393–8.
- Shaw, J.E., Sicree, R.A., Zimmet, P.Z., 2010. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 87, 4–14.
- Sinhg R, Barden A, Mori T, Beilin L. 2001. Advanced glycation end products: a review. *Diabetologia*; 44: 129-146.
- Soldatos, G., Cooper, M.E., 2006. Advanced glycation end products and vascular structure and function. *Curr. Hypertens. Rep.* 8, 472–478.
- Takahashi, M., 2015. Glycation of Proteins, in: Taniguchi, N., Endo, T., Hart, G.W., Seeberger, P.H., Wong, C.-H. (Eds.), *Glycoscience: Biology and Medicine*. Springer Japan, pp. 1339–1345.
- Tanji, N., Markowitz, G.S., Fu, C., Kislinger, T., Taguchi, A., Pischetsrieder, M., Stern, D., Schmidt, A.M., D'agati, V.D., 2000. Expression of Advanced Glycation End Products and Their Cellular Receptor RAGE in Diabetic Nephropathy and Nondiabetic Renal Disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 11, 1656–1666.
- Thomas, S., Karalliedde, J., 2015. Diabetic nephropathy. *Medicine (Baltimore)*, Diabetes Part 2 of 2 43, 20–25.
- Vlassara, H., Uribarri, J., 2014. Advanced Glycation End Products (AGE) and Diabetes: Cause, Effect, or Both? *Curr. Diab. Rep.* 14, 453.
- Yamagishi, S., Matsui, T., 2010. Advanced glycation end products, oxidative stress and diabetic nephropathy. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 3, 101–108.
- Zhang, E., Wu, Y., 2014. Metabolic memory: mechanisms and implications for diabetic vasculopathies. *Sci. China Life Sci.* 57, 845–851.

## ANEXOS

### **ANEXO 1. Procedimiento normalizado de operación para la cuantificación de AGEs por radioinmunoanálisis**

#### **Principio del método**

Es un radioinmunoanálisis en fase líquida con precipitación por segundo anticuerpo en presencia de polietilenglicol. Su principio se basa en la competencia que se establece entre el AGE sin marcar (analito) y el AGE-BSA marcado con  $I^{125}$  (marcador radioactivo) por unirse a un anticuerpo específico que se encuentra en una concentración limitante con respecto a la concentración total de AGE en el tubo. En consecuencia, mientras mayor sea la concentración del analito, mayor será la posibilidad de unirse al anticuerpo con respecto al trazador radiactivo y viceversa. Los microcomplejos inmunes formados, son entonces precipitados al adicionar un reactivo de precipitación que contiene un anticuerpo secundario específico contra el anticuerpo primario. Una vez formados estos macrocomplejos inmunes, son precipitados por medio de un proceso de centrifugación.

Los complejos inmunes precipitados son leídos en un contador de radiaciones gamma y la radiactividad medida, es graficada contra la concentración del analito en cada tubo de la curva estándar; estableciéndose una curva dosis-respuesta que permite estimar la concentración del analito en una muestra biológica.

#### **Reactivos**

- a. **Amortiguador de ensayo (estándar A).** PBS pH 7.4 conteniendo 25 mM de EDTA, 0.05 % de timerosal, 1% de BSA.
- b. **Anticuerpo primario.** Anticuerpo anti-AGE (producidos en conejo y purificado por cromatografía de afinidad) diluido 1/7000 en amortiguador de ensayo. Con colorante artificial azul 0.1 %.
- c. **AGE-BSA marcada con  $I^{125}$ .** El AGE-BSA- $I^{125}$  esta disuelto en amortiguador de ensayo ajustándose la marca a 20000 CPM, con 1 % de suero normal de conejo y colorante artificial rojo al 0.1%.
- d. **Estándares de AGEs.** AGE-BSA sintetizado y altamente purificado, disuelto en amortiguador de ensayo en las siguientes concentraciones: 300, 600, 1200, 2400, 4800, 9600 y 19200  $\mu$ U/mL (equivalente a: 0.97, 1.94, 3.88, 7.76, 15.5, 31.0 y 62.0 ng/mL de proteína), con colorante artificial amarillo 0.1 %.
- e. **Controles internos de calidad.** AGE-BSA altamente purificado disuelto en amortiguador de ensayo en las siguientes concentraciones:  
Control I: 1000  $\mu$ U/mL  
Control II: 5000  $\mu$ U/mL

- f. **Reactivo precipitante.** Antisuero anti-IgG de conejo producido en borrego, diluido 1/10 en PBS pH 7.4, conteniendo 0.25% de BSA, 25 mM de EDTA, 0.05 % de timerosal, 4 % de polietilenglicol, 0.025 % de Triton X-100 y colorante artificial verde al 0.1%.

### Material requerido

- Tubos de borosilicato de 12 x 75 mm.
- Micropipetas de 100 y 200  $\mu$ l.
- Puntas para micropipetas.
- Agitador tipo vortex.
- Centrifuga refrigerada de ángulo libre con velocidad de 3000 rpm.
- Papel absorbente
- Refrigerador
- Contador de radiaciones gamma

### Recolecta y Almacenamiento de las Muestras.

El ensayo es capaz de medir AGEs en suero. Las muestras pueden ser almacenadas entre 2-8°C hasta por una semana antes de ser procesadas. Si el inicio del procesamiento demorara más de una semana, se recomienda que las muestras se congelen a -20°C. La hemólisis, la lipemia, y la ictericia, no son factores limitantes en este método para la cuantificación confiable de AGEs.

### Protocolo

#### 1er Día

1. Pipetear 200  $\mu$ L de amortiguador de ensayo a los tubos de las uniones no específicas (UNE) (3-4). Pipetear 100  $\mu$ L de amortiguador de ensayo a los tubos de las uniones específicas máximas (Bo) (5-6).
2. Pipetear 100  $\mu$ L de los estándares por duplicado (tubos 7-20) y de los controles internos de calidad (21-24).
3. Pipetear 100  $\mu$ L de cada muestra por duplicado (25-n...).
4. Pipetear 100  $\mu$ L de anticuerpo anti-AGE a todos los tubos excepto a los tubos totales (T) (1-2) y a los UNE (3-4).
5. Pipetear 100  $\mu$ L del marcador radiactivo a todos los tubos (1-n...).
6. Agitar bien todos los tubos excepto los totales (1-2) en un vortex.
7. Incubar de 18-24 horas (toda la noche) a 4 °C.

#### 2do Día

8. Agitar manualmente el reactivo de precipitación.
9. Pipetear 200  $\mu$ L del reactivo de precipitación a todos los tubos excepto los totales (1-2).

10. Agitar bien todos los tubos en vortex, excepto los totales (1-2).
11. Incubar 30 min a temperatura ambiente.
12. Centrifugar todos los tubos excepto los totales (1-2) durante 30 minutos a 3000 rpm, a 4°C en centrifuga refrigerada.
13. Decantar el sobrenadante, dejar volteados los tubos sobre papel absorbente durante 5 minutos.
14. Secar los tubos hasta la mitad con hisopos de papel absorbente.
15. Contar todos los tubos durante 1 minutos en un contador de radiaciones gamma.

### **Cálculo de resultados**

1. Calcular el promedio de los CPM de los tubos totales (1-2), de las UNE (3-4), de los Bo (5-6) y todos los duplicados de las muestras ensayadas.
2. Restar el promedio de los CPM de los tubos UNE a los promedios de todos los tubos excepto los totales. La diferencia es lo que se emplea en el resto de los cálculos.
3. Calcular el porcentaje de unión específica máxima (%Bo, unión de los tubos con dosis cero de AGes) del marcador radiactivo (CPM Bo / CPM totales) x 100. Este porcentaje debe estar entre 20-40%.
4. Calcular el porcentaje de unión específica (%UE) de los demás tubos mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{CPM promedio de cada muestra} - \text{CPM promedio de las UNE}}{\text{CPM promedio de las cuentas totales}} \times 100 = \%UE$$

5. Estimar la concentración de las muestras con la utilización de los programas de cálculos del contador de radiaciones.



## **ANEXO 2. Procedimiento normalizado de operación del ensayo por inmunoadsorción ligado a enzima para la cuantificación de AGEs**

### **Principio del Método**

Es un inmunoensayo enzimático colorimétrico en placas de 96 pozos de poliestireno. Es un sistema de inhibición competitiva, de captura de anticuerpo. Para ello, la placa ha sido recubierta con AGE-RNAsa. Los AGEs presentes en la muestra de los pacientes compiten con el AGE unido en la fase sólida, por unirse a un conjugado anti-AGE-Peroxidasa. Por lo que, mientras más concentración de AGEs tenga la muestra a analizar, más neutralizará al conjugado añadido y por tanto, este último se podrá unir menos al AGE acoplado a la placa y será menor el color generado de la transformación enzimática del sustrato y la reacción del producto con el cromógeno; y viceversa.

### **Reactivos**

- a) **Placa de ELISA de 96 pozos.** Una placa de poliestireno de 96 pozos, recubierta con 10 µg/mL de AGE-RNAsa en PBS y bloqueada con 0.3% de gelatina en PBS pH: 7.4, conteniendo 25 mM de EDTA, 0.02% de timerosal y 0.05% de Triton X-100.
- b) **Amortiguador de Ensayo (Estándar 1: dosis cero).** PBS pH: 7.4 conteniendo 25 mM de EDTA, 0.02% timerosal, 1% BSA fracción V, con colorante artificial amarillo al 0.1%. Se emplea además, para diluir muestras con concentraciones mayores al último punto de la curva estándar.
- c) **Reactivo Blanco.** Solución de AGE-BSA con alta concentración (10 veces mayor al último punto de la curva estándar (51.2 U/mL), disuelto en amortiguador de ensayo pero con colorante artificial verde al 0.1%.
- d) **Estándares.** AGE-BSA purificado por Affigel-Blue disuelto en amortiguador de ensayo en las siguientes concentraciones: 287, 738, 1853, 5115 mU/mL.
- e) **Controles Internos de Calidad.** AGE-BSA purificado por Affigel-Bue disuelto en amortiguador de ensayo, con colorante artificial café, en las siguientes concentraciones: CIC I: 313 mU/mL y CIC II: 1092 mU/mL.
- f) **Amortiguador del Conjugado.** PBS pH: 7.4 conteniendo 25 mM de EDTA, 0.3% de SDS, 0.05% timerosal, 0.05% Triton X-100, y 1% BSA fracción V, con colorante artificial rojo al 0.1%.
- g) **Conjugado Anti-AGE-Peroxidasa.** Conjugado de anticuerpo anti-AGE purificado por cromatografía de inmunoafinidad, acoplado a Peroxidasa de Rábano Picante. Concentrado 70X. Debe ser diluido en amortiguador de conjugado a 1/70 al momento de ser utilizado.
- h) **Amortiguador del Sustrato.** Amortiguador fosfato de sodio 50 mM pH: 5.0.
- i) **Sustrato.** Peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), solución madre al 35%.

- j) **Cromógeno.** 1 Tableta de 5 mg de OPD (Orthophenilendiamina).
- k) **Preparación de la Mezcla de Sustrato y Cromógeno.** Disolver la tableta de OPD en los 11 mL del amortiguador de sustrato y adicionarle 75  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .
- l) **Solución de Parada (Stop).** Solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 2N.
- m) **Amortiguador de Lavado.** PBS 0.5X pH: 7.4, 0.05% de Triton X-100.

#### **Materiales Requeridos.**

- Pipeta de 100  $\mu\text{L}$ .
- Pipeta multicanal.
- Puntas amarillas.
- Agitador tipo Vortex.
- Agua destilada.
- Papel absorbente.
- Refrigerador.
- Lector de microplacas de 96 pozos con filtros de 492 y 630nm.

**Recolecta y Almacenamiento de las Muestras.** El ensayo es capaz de medir AGEs en suero. Las muestras pueden ser almacenadas entre 2-8°C hasta por una semana antes de ser procesadas. Si el inicio del procesamiento demorara más de una semana, se recomienda que las muestras se congelen a -20°C. La hemólisis, la lipemia, y la ictericia, no son factores limitantes en este método para la cuantificación confiable de AGEs.

**Procedimiento de Ensayo.** El estuche está diseñado para procesar la curva estándar por duplicado, dos controles internos por duplicado y 40 muestras de pacientes por duplicado u 81 muestras por simplificado. Para garantizar los mejores resultados, se debe pipetear con precisión y seguir cuidadosamente el protocolo de trabajo.

\*Un factor de gran importancia es la agitación correcta de las muestras justo antes de ser adicionadas a la placa.

El sistema analítico ha sido normalizado para utilizar 100  $\mu\text{L}$  de suero. Las muestras con concentraciones mayores de 5115 mU/mL, deben diluirse con amortiguador de ensayo (estándar 1) y ser nuevamente evaluadas (no se debe extrapolar el resultado).

#### **Protocolo**

1. Pipetear 100  $\mu\text{L}$  de la solución blanco (AGE: 51.2 U/mL) en el pozo A1. Esta será la unión no específica (UNE) o blanco, cuya señal debe ser restada a todos los demás pozos.
2. Pipetear 100  $\mu\text{L}$  del estándar 1 (dosis cero de AGE) por duplicado, en los pozos B1 y C1, serán la unión específica máxima ( $U_0$ ).
3. Pipetear 100  $\mu\text{L}$  de los estándares por duplicado desde el pozo D1 hasta el pozo C2 y de los controles internos de calidad por duplicado en los pozos desde D2 hasta G2.

4. Pipetear 100  $\mu$ L de cada muestra por duplicado desde el pozo H2 hasta el pozo G12. (el pozo H12 queda libre si se montan por duplicado las muestras).
5. Pipetear 50  $\mu$ L de la dilución de trabajo del conjugado Anti-AGE-Peroxidasa a todos los pozos con ayuda de una pipeta multicanal.
6. Mezclar ligeramente la placa con unos golpecitos suaves.
7. Incubar de 30 min a temperatura ambiente (no se requiere agitación orbital).
8. Lavar la placa 3 veces con 300  $\mu$ L del amortiguador de lavado por pozo.
9. Adicionar 100  $\mu$ L de la solución de sustrato más cromógeno.
10. Incubar 30 min a temperatura ambiente.
11. Detener la reacción adicionando 20  $\mu$ L de solución stop.
12. Leer la placa en el lector de microplacas utilizando un filtro de 492 nm. Los mejores resultados se obtienen si se realiza una doble lectura 492/630 nm, pues se corrigen las imperfecciones del plástico y se logra mejor reproducibilidad.
13. Estimar la concentración de las muestras con la utilización de los programas de cálculos del lector de ELISA.

## **ANEXO 3.**

### **CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN EL PROYECTO:**

#### ***“DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN INMUNOENSAYO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PRODUCTOS***

#### ***FINALES DE GLICOSILACIÓN AVANZADA: EVALUACIÓN DE SU VALOR DIAGNÓSTICO PARA PREDECIR***

#### ***LAS COMPLICACIONES CRÓNICAS DE LA DIABETES MELLITUS”.***

(25 DE MAYO DE 2011, VERSIÓN 1)

**Investigador principal:** Dr. Eulises Díaz Díaz.

**Dirección del investigador:** Departamento de Biología de la Reproducción. INCMNSZ. Vasco de Quiroga No. 15, Sección XVI, Tlalpan, México, D.F.

**Teléfono de contacto del investigador (incluyendo uno para emergencias):** 54870900, Ext.2408. (04455-320769969).

**Investigadores participantes:** M. en C. Mario Cárdenas León; Dr. Carlos Alberto Aguilar Salinas; Dr. José Ricardo Correa Rotter; Dr. Fernando Larrea Gallo.

**Nombre del patrocinador del estudio:** Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social. SSA/IMSS/ISSSTE-CONACYT. Convocatoria: S0008-2011-1.

**Dirección del patrocinador:** Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Av. Insurgentes Sur 1582, Col. Crédito Constructor Del. Benito Juárez C.P.: 03940, México, D.F.

**Versión del consentimiento informado y fecha de su preparación:** Segunda versión, 21 de Febrero del 2012.

## **INTRODUCCIÓN:**

Por favor, tome todo el tiempo que sea necesario para leer este documento, pregunte al investigador sobre cualquier duda que tenga.

Este consentimiento informado cumple con los lineamientos establecidos en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, la Declaración de Helsinki y las Buenas Prácticas Clínicas emitidas por la Comisión Nacional de Bioética.

Para decidir si participa o no en este estudio, usted debe tener el conocimiento suficiente acerca de los riesgos y beneficios que esto implica, con el fin de tomar una decisión informada. Este documento le dará información detallada acerca del estudio de investigación, la cual podrá comentar con su médico tratante o con algún miembro del equipo de investigadores. Al terminar de leer este documento se le pedirá que forme parte del proyecto y de ser así, bajo ninguna presión o intimidación, se le invitará a firmar este consentimiento informado.

## **INVITACION A PARTICIPAR Y DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO**

Estimado Sr.(a)\_\_\_\_\_

El Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición le invita a participar en este estudio de investigación que tiene como objetivo: Desarrollar y validar un método analítico para la cuantificación de productos finales de glicosilación avanzada y evaluar su valor diagnóstico para predecir las complicaciones crónicas de la Diabetes Mellitus.

La duración del estudio es de 3 años. El número aproximado de participantes será de 2000 voluntarios.

Usted fue invitado al estudio debido a que es un individuo sano (grupo control) o es un paciente diabético con o sin complicaciones crónicas (grupos diabéticos).

## **PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO**

El estudio consiste en el desarrollo de un método analítico para medir los productos finales de glicosilación avanzada, conocidos como AGEs. Los AGEs son moléculas que se forman en la sangre de los pacientes diabéticos cuando tienen altas concentraciones de glucosa durante largos períodos de tiempo. Estas moléculas participan en el daño de los tejidos y promueven el desarrollo de las complicaciones crónicas de la diabetes tales como la nefropatía, la retinopatía y la neuropatía diabética entre otras.

Las concentraciones de AGEs encontradas en los pacientes diabéticos serán comparadas con las de los individuos controles y se evaluará su relación con el estado metabólico

general de los pacientes y con la existencia o no de complicaciones crónicas de la diabetes mellitus.

Su probabilidad para ser asignado a uno de los grupos antes mencionados está en función de: si es un individuo sano (que no sufre de diabetes) formará parte del grupo control; si es diabético sin complicaciones (formará parte del grupo de diabéticos sin complicaciones); si es diabético que sufre de complicaciones crónicas (formará parte del grupo de diabéticos con complicaciones crónicas).

Su participación en el estudio consiste en una sola toma de muestra de sangre periférica y una toma de orina de 24 horas (esta última solo si usted padeciera de nefropatía diabética). Para ello deberá venir en ayuno de al menos 8 horas y recoger la orina de 24 horas para lo que se le entregará un frasco apropiado. Solo se le solicitarán algunos datos personales como la edad y el sexo para ser utilizado en el análisis e interpretación de los resultados.

Los procedimientos del estudio incluyen la realización de medición de AGEs y de otros parámetros bioquímicos para verificar el estado metabólico en general, tales como la medición de la glicemia, el perfil de lípidos, las concentraciones de insulina etc; para lo cual contamos en nuestras instalaciones con el equipamiento requerido. Este estudio no contempla realizar ningún tipo de intervención sobre el paciente, por lo que usted no deberá someterse al consumo de ningún fármaco o tipo de dieta alguna.

## **RESPONSABILIDADES**

Las responsabilidades de los participantes incluyen solamente asistir a la toma de muestra en la fecha programada y venir en ayuno de al menos 8 horas, para que los resultados no se vean alterados y se puedan establecer apropiadamente los grupos experimentales, así como la correcta interpretación de los resultados.

## **RIESGOS E INCONVENIENTES**

El Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud señala que la obtención de muestras biológicas representa un riesgo mínimo dentro de la investigación. Los riesgos de la toma de muestra sanguínea son: posibilidad de sangrado ligero o moretón en el sitio de la punción, mareo o sensación de desmayo. El personal que extraerá la muestra sanguínea está entrenado para ello, lo que minimiza los riesgos de complicaciones.

No existe riesgo de ningún tipo en la obtención de las muestras de orina.

Los datos acerca de su identidad y su información médica no serán revelados en ningún momento como lo estipula la ley, por tanto, en la recolección de datos clínicos usted no enfrenta riesgos mayores a los relativos a la protección de la confidencialidad la cual será

protegida mediante la codificación de sus muestras y de su información.

## **BENEFICIOS POTENCIALES**

Este estudio no está diseñado para beneficiarle directamente. Sin embargo, la búsqueda de la relación entre las concentraciones de AGEs y la presencia o no de complicaciones crónicas podría permitir desarrollar nuevos blancos terapéuticos y con esto hacer un tratamiento más personalizado de esta enfermedad. Además gracias a su participación altruista, su comunidad se puede beneficiar significativamente al encontrar nuevas formas de atender este problema médico.

## **CONSIDERACIONES ECONÓMICAS**

No se cobrará ninguna tarifa por participar en el estudio ni se le hará pago alguno. Tampoco está contemplado el pago de gastos de transportación para asistir al Instituto para la toma de muestra.

## **COMPENSACIÓN**

Es poco probable la ocurrencia de lesiones durante la toma de muestra, pero si sucedieran, nosotros le proporcionaremos la atención inmediata necesaria. No contamos con presupuesto para financiar compensaciones por lesiones. El Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán no brinda ningún tipo adicional de compensación para cubrir daños.

## **ALTERNATIVAS A SU PARTICIPACIÓN**

Su participación es voluntaria. Por lo que usted puede elegir no participar en el estudio. En este estudio no se medicará al grupo control. Tampoco se contempla cambios en los tratamientos médicos de los grupos diabéticos sin y con complicaciones. Estos pacientes continuarán con el tratamiento que tienen indicado, y su seguimiento y adecuación es responsabilidad exclusiva de su especialista.

## ***POSIBLES PRODUCTOS COMERCIALES DERIVABLES DEL ESTUDIO:***

Los materiales serán propiedad del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ). Si un producto comercial es desarrollado como resultado del estudio, tal insumo será propiedad del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y

Nutrición, Salvador Zubirán (INCMNSZ) o de quienes ellos designen. En tal caso, usted no recibirá un beneficio financiero.

### ***ACCIONES A SEGUIR DESPUÉS DEL TÉRMINO DEL ESTUDIO:***

Usted puede solicitar los resultados de sus exámenes clínicos y de las conclusiones del estudio al Dr. Eulises Díaz Díaz del INCMNSZ (teléfono: 54870900, Ext. 2408). La investigación es un proceso largo y complejo. El obtener los resultados finales del proyecto puede tomar varios meses.

### ***PARTICIPACIÓN Y RETIRO DEL ESTUDIO:***

Su participación es VOLUNTARIA. Si usted decide no participar, no se afectará su relación con el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán (INCMNSZ) o su derecho para recibir atención médica o cualquier servicio al que tenga derecho. Si decide participar, tiene la libertad para retirar su consentimiento e interrumpir su participación en cualquier momento sin perjudicar su atención en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán (INCMNSZ). Se le informará a tiempo si se obtiene nueva información que pueda afectar su decisión para continuar en el estudio.

El investigador o el patrocinador del estudio pueden excluirlo del estudio si no cumpliera los criterios clínicos de interés para el presente estudio.

El estudio puede ser terminado en forma prematura si el paciente decide abandonar el estudio. Para solicitar la terminación de su participación en el estudio solo bastará con avisar al responsable del proyecto.

### ***CONFIDENCIALIDAD Y MANEJO DE SU INFORMACIÓN***

Su nombre no será usado en ninguno de los estudios. Las muestras biológicas obtenidas no contendrán ninguna información personal y se codificará con un número de serie para evitar cualquier posibilidad de identificación. Por disposición legal las muestras biológicas, incluyendo la sangre, son catalogadas como residuos peligrosos biológico-infecciosos y por esta razón durante el curso de la investigación su muestra no podrá serle devuelta. Es posible que sus muestras biológicas así como su información médica y/o genética puedan ser usadas para otros proyectos de investigación análogos relacionados con la enfermedad en estudio. No podrán ser usados para estudios de investigación que no estén relacionados o que tenga como objetivos el estudio de condiciones patológicas distintas a las estudiadas en este proyecto. Sus muestras podrán ser almacenadas por los investigadores hasta por 4 años.



Los códigos que identifican su muestra estarán solo disponibles a los investigadores titulares, quienes están obligados, por ley, a no divulgar su identidad. Estos códigos serán guardados en un archivero con llave y solo tendrán acceso los investigadores. Existe la posibilidad de que su privacidad sea afectada como resultado de su participación en el estudio. Su confidencialidad será protegida como lo marca la ley. Será mantenida asignando códigos a su información. El código es un número de identificación que no incluye datos personales. Ninguna información sobre su persona será compartida con otros sin su autorización, excepto:

- Si es necesario para proteger sus derechos y bienestar (por ejemplo, si ha sufrido una lesión y requiere tratamiento de emergencia) o;
- Es solicitado por la ley.

Monitores o auditores del estudio podrán tener acceso a la información de los participantes.

Si usted decide retirarse del estudio, podrá solicitar el retiro y destrucción de su material biológico y de su información. Todas las hojas de recolección de datos serán guardadas con las mismas medidas de confidencialidad, y solo los investigadores titulares tendrán acceso a los datos que tienen su nombre.

La Comisión de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición aprobó la realización de este estudio. Dicho comité es quien revisa, aprueba y supervisa los estudios de investigación en humanos en el Instituto. En el futuro, si identificamos información que consideremos importante para su salud, consultaremos con dicha Comisión de ética que supervisa el estudio para decidir la mejor forma de darle esta información a usted y a su médico. Además, le solicitamos que nos autorice recontactarlo, en caso de ser necesario, para solicitarle información que podría ser relevante para el desarrollo de este proyecto.

Los datos científicos obtenidos como parte de este estudio podrían ser utilizados en publicaciones o presentaciones médicas. Su nombre y otra información personal serán eliminados antes de usar los datos.

Si usted lo solicita su médico de cabecera será informado sobre su participación en el estudio.

## **IDENTIFICACIÓN DE LOS INVESTIGADORES**

En caso de que usted sufra un daño relacionado al estudio, por favor póngase en contacto con Dr. Eulises Díaz Díaz en el INCMNSZ (teléfono: 54870900, ext. 2408).

Si usted tiene preguntas sobre el estudio, puede ponerse en contacto con el Dr. Eulises Díaz Díaz en el INCMNSZ (teléfono: 54870900, ext. 2408).

Si usted tiene preguntas acerca de sus derechos como participante en el estudio, puede hablar con el coordinador del Comité de Ética en Investigación del INCMNSZ (Dr. Carlos A. Aguilar Salinas. Teléfono: 54870900, ext. 2318 o 2321).

### **DECLARACIÓN DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO**

He leído con cuidado este consentimiento informado, he hecho todas las preguntas que he tenido y todas me han sido respondidas satisfactoriamente. Para poder participar en el estudio, estoy de acuerdo con todos los siguientes puntos:

Estoy de acuerdo en participar en el estudio descrito anteriormente. Los objetivos generales, particulares del reclutamiento y los posibles daños e inconvenientes me han sido explicados a mi entera satisfacción.

Estoy de acuerdo en donar de forma voluntaria mis muestras biológicas de sangre y orina para ser utilizadas en éste estudio. Así mismo, mi información médica y biológica podrá ser utilizada con los mismos fines.

Estoy de acuerdo, en caso de ser necesario, que se me contacte en el futuro si el proyecto requiere coleccionar información adicional o si encuentran información relevante para mi salud.

Mi firma también indica que he recibido un duplicado de este consentimiento informado.

Por favor responda las siguientes preguntas

	<b>SÍ</b> (marque por favor)	<b>NO</b> (marque por favor)
a. ¿Ha leído y entendido la forma de consentimiento informado, en su lenguaje materno?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
b. ¿Ha tenido la oportunidad de hacer preguntas y de discutir este estudio?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
c. ¿Ha recibido usted respuestas satisfactorias a todas sus preguntas?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
d. ¿Ha recibido suficiente información acerca del estudio y ha tenido el tiempo suficiente para tomar la decisión?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
e. ¿Entiende usted que su participación es voluntaria y que es libre de suspender su participación en este estudio en cualquier momento sin tener que justificar su decisión y sin que esto afecte su atención médica o sin la pérdida de los beneficios a los que de otra forma tenga derecho?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
f. <b>Si aplica:</b> ¿Autoriza se dé acceso a sus registros médicos para este estudio de investigación y para propósitos regulatorios a _____, sus representantes, los auditores, oficinas regulatorias del estudio, otras agencias gubernamentales de la salud	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>



	SÍ (marque por favor)	NO (marque por favor)
en México y posiblemente otras agencias gubernamentales de la salud en otros países en donde se pueda considerar al fármaco en estudio para la aprobación de su comercialización?		
g. ¿Entiende los posibles riesgos, algunos de los cuales son aún desconocidos, de participar en este estudio?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
h. ¿Entiende que puede no recibir algún beneficio directo al participar en este estudio?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
i. ¿Ha discutido usted otras opciones de tratamiento con el médico participante en el estudio y entiende usted que otras opciones de tratamiento están a su disposición?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
j. ¿Entiende que no está renunciando a ninguno de sus derechos legales a los que es acreedor de otra forma como sujeto en un estudio de investigación?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
k. ¿Entiende que el médico participante en el estudio puede retirarlo del mismo sin su consentimiento, ya sea debido a que Usted no cumplió con los requerimientos del estudio o si el médico participante en el estudio considera que médicamente su retiro es en su mejor interés?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
l. <b>Si aplica:</b> ¿Entiende que el estudio puede ser suspendido por el patrocinador del estudio en cualquier momento?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
m. ¿Entiende que usted recibirá un original firmado y fechado de esta Forma de Consentimiento, para sus registros personales?	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

**Declaración del paciente:** Yo, \_\_\_\_\_ declaro que es mi decisión participar en el estudio. Mi participación es voluntaria. He sido informado que puedo negarme a participar o terminar mi participación en cualquier momento del estudio sin que sufra penalidad alguna o pérdida de beneficios. Si suspendo mi participación, recibiré el tratamiento médico habitual al que tengo derecho en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ) y no sufriré perjuicio en mi atención médica o en futuros estudios de investigación. Yo puedo solicitar información adicional acerca de los riesgos o beneficios potenciales derivados de mi participación en el estudio. Puedo obtener los resultados de mis exámenes clínicos si los solicito. Estoy enterado de que si tengo preguntas sobre el estudio, puede ponerme en contacto con el Dr. Eulises Díaz Díaz al teléfono 54870900, ext. 2408. También estoy enterado que si tuviera preguntas acerca de mis derechos como participante en el estudio, puede hablar con el coordinador del Comité de Ética en Investigación del INCMNSZ (Dr. Carlos A. Aguilar Salinas. Teléfono: 54870900 ext. 2318 o 2321). Así mismo comprendo que debo informar a los investigadores de cualquier cambio en mi estado de salud (por ejemplo, uso de nuevos medicamentos, cambios en el consumo de tabaco) o en la ciudad donde resido, tan pronto como sea posible. He leído y entendido toda la información que me han dado sobre mi participación en el estudio. He tenido la oportunidad para discutirlo y hacer preguntas. Todas las preguntas han sido respondidas a mi satisfacción. He entendido que recibiré una copia firmada de este consentimiento informado.



\_\_\_\_\_  
Nombre del Participante                      Firma del Participante                      Fecha

\_\_\_\_\_  
Coloque su huella digital si no sabe escribir

\_\_\_\_\_  
Nombre del representante legal                      Firma del representante legal                      Fecha  
(si aplica)

\_\_\_\_\_  
Nombre del Investigador                      Firma del Investigador                      Fecha  
que explicó el documento

\_\_\_\_\_  
Nombre del Testigo 1                      Firma del Testigo 1                      Fecha

Dirección: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Relación que guarda con el participante: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Nombre del Testigo 2                      Firma del Testigo 2                      Fecha

Dirección: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Relación que guarda con el participante: \_\_\_\_\_

Lugar y Fecha: \_\_\_\_\_

**(El presente documento es original y consta de 9 páginas)**