



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN
INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO PARA LA
CUANTIFICACIÓN DE INSULINA HUMANA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :
JOSÉ ANTONIO ALVARADO RÍOS

DIRECTOR DE TESIS:
DR. EULISES DÍAZ DÍAZ

ASESOR DE TESIS:
Q.F.B. TERESA BENÍTEZ ESCAMILLA



MÉXICO, Ciudad de México, Marzo 2016



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
PRESENTE.

Comunico a usted que el alumno ALVARADO RÍOS JOSÉ ANTONIO con número de cuenta 30407799-1 de la carrera de Q. F. B. se le ha fijado el día 07 del mes de Marzo de 2016 a las 09:00 hrs., para presentar examen profesional, que tendrá lugar en la sala de exámenes profesionales Campus II de esta Facultad, con el siguiente jurado:

- | | |
|------------|-----------------------------------|
| PRESIDENTE | DR. JOSÉ LUIS A. MORA GUEVARA |
| VOCAL* | DR. EULISES DÍAZ DÍAZ |
| SECRETARIO | Q.F.B. TERESA BENÍTEZ ESCAMILLA |
| SUPLENTE | Q.F.B. JOSÉ OSCAR GONZÁLEZ MORENO |
| SUPLENTE | MTRA. YOLANDA FLORES CABRERA |

El título de la tesis que se presenta es: **Desarrollo y validación de un inmunoensayo enzimático para la cuantificación de insulina humana**

Opción de titulación: *Tesis Experimental*

ATENTAMENTE
 "POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
 México, D.F. a 09 de Febrero del 2016

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
 DIRECTOR DIRECCIÓN

DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

RECIBI

OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES Y DE GRADO

Vc. Sr.

URA RAQUEL RETANA UGALDE
 JEFA DE LA CARRERA DE Q.F.B.

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Hormonas Proteicas del Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán" (INCMNSZ), bajo la dirección del Dr. Eulises Díaz Díaz y la asesoría de la Q.F.B. Teresa Benitez Escamilla.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN
INMUNOENSAYO ENZIMÁTICO PARA LA
CUANTIFICACIÓN DE PRODUCTOS FINALES DE
GLICACIÓN AVANZADA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A :
JUAN CARLOS AURIOSTIGUE BAUTISTA

DIRECTOR DE TESIS:
DR. EULISES DÍAZ DÍAZ

ASESOR DE TESIS:
Q.F.B. GEORGINA ERNESTINA RÍOS OLIVERA



MÉXICO, D.F. JUNIO 2014



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES "ZARAGOZA"

DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN
ESCOLAR
PRESENTE.

Comunico a usted que el alumno AURIOSTIGUE BAUTISTA JUAN CARLOS,
con número de cuenta 40700981-7 de la carrera de Q. F. B.,
se le ha fijado el día 02 del mes de Junio de 2014 a las 13:00 hrs.,
para presentar examen profesional, que tendrá lugar en la sala de exámenes
profesionales Campus II de esta Facultad, con el siguiente jurado:

PRESIDENTE	DR. RUBÉN MARROQUÍN SEGURA
VOCAL*	DR. EULISES DÍAZ DÍAZ
SECRETARIO	Q.F.B. GEORGINA ERNESTINA RÍOS OLIVERA
SUPLENTE	DRA. RAQUEL RETANA UGALDE
SUPLENTE	MTRA. YOLANDA FLORES CABRERA

El título de la tesis que se presenta es: **Desarrollo y validación
de un inmunoensayo enzimático para la cuantificación de productos finales
de glicación avanzada.**

Opción de titulación: *Tesis Experimental.*

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
México, D.F. a 07 de Mayo de 2014.

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECTOR

RECIBI

OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES
Y DE GRADO

Vo Bo

DRA. MARTINA A. SÁNCHEZ RCOYIGÜEZ
JEFA DE LA CARRERA DE Q.F.B.

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Hormonas Proteicas del Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", bajo la dirección del Dr. Eulises Díaz Díaz y la asesoría de la Q.F.B. Georgina Ernestina Ríos Olivera. El trabajo fue financiado a través del Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social SSA/IMSS/ISSSTE-CONACYT mediante el proyecto SALUD-2011-01-161976 que lleva por título "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".



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA

DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Evaluación de la capacidad de la medición de los productos finales de glicación avanzada como marcador del deterioro del control glucémico a largo plazo y de la presencia de enfermedad renal crónica en el paciente diabético.

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

P R E S E N T A

M. en C. ITZEL URIBE JIMÉNEZ

DIRECTORES DE TESIS

Dra. Julia Pérez Ramos.

Dr. Eulises Díaz Díaz.

ASESOR

Dr. Jorge Salmerón Castro.

México D.F, 6 Julio, 2016



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

DCB.084.12

México, D. F. a 14 de junio de 2012.

Uribe Jiménez Itzel
Presente

La Comisión del Doctorado en Ciencias Biológicas le informa que HA SIDO ACEPTADA SU SOLICITUD de ingreso a este posgrado.

Se solicita que amplie sus conocimientos en estadística y enfocarse en los objetivos de su proyecto.

Se le recuerda que es indispensable que obtenga usted el grado en un máximo de tres años que es el tiempo normal que marca el plan de estudios.

Es importante que a la brevedad se ponga en contacto con esta coordinación para continuar con los trámites de su ingreso. Le damos la más cordial bienvenida.

Atentamente
"Casa Abierta al Tiempo"
Comisión Académica

Dra. María Jesús Ferrara Guerrero

Dra. Reyna Fierro Pastrana

Dra. Elizabeth Hernández Pérez

Dr. Manuel Arnojo Castillo Rivera

Dr. Daniel Mota Rojas

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

UNIDAD CUAJIMALPA
Calle Artificios #40, Col. Hidalgo
Delg. Alvaro Obregón, C.P. 01120

UNIDAD IZTAPALAPA
Av. San Rafael Atlixco N° 186, Col. Vicentina,
Iztapalapa, C.P. 09340, México, D.F.
Tel: 5804-4911

UNIDAD XOCHIMILCO
Calz. del Hueso 1000, Col. Villa Quietud,
A.P. 23-181, Coyoacán, 04960, México
Tel: 5483-75-04
Correo: doctocb@correo.xoc.uam.mx



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Dra. Ma. De los Dolores Reyes Duarte

Dr. Pablo Corcuera Martínez del Río

Dr. Rafael Bojalil Parra

Dr. Cuahtémoc Pérez González

Dr. Ernesto Rivera Becerril

Ccp. (codirectora). Dra. Pérez Ramos Julia
(codirector). Dr. Díaz Díaz Eulises

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

UNIDAD CUAJIMALPA

Calle Artificios #40, Col. Hidalgo
Delg. Alvaro Obregon, C.P. 01120

UNIDAD IZTAPALAPA

Av. San Rafael Atlixco N0 185, Col. Vicentina,
Iztapalapa, C.P. 09340, México, D.F.
Tel: 5804-4911

UNIDAD XOCHIMILCO

Calz. del Hueso 1000, Col. Villa Quietud,
A.P. 23-181, Coyoacán, 04950, México
Tel: 5483-75-04
Correo: doctocb@correo.xoc.uam.mx



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Evaluación del valor diagnóstico de la medición de los productos finales de glucosilación avanzada (AGEs) y sus productos de degradación, para predecir tempranamente el daño de la función renal en el paciente diabético.”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
José Antonio Alvarado Ríos

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Armando Roberto Tovar Palacio.
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Eulises Díaz Díaz.
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.
Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes.
Facultad de Química.

Ciudad de México. 8 de Junio, 2016

CPMDCBQ/062/2014

ALVARADO RIOS JOSE ANTONIO

Presente

Por medio de la presente me es grato informarle que ha sido **ACEPTADO** a la Maestría del Posgrado en Ciencias Bioquímicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

De acuerdo al plan de estudios, la Maestría en Ciencias Bioquímicas tiene una duración de cuatro semestres y se cursa en tiempo completo. El Comité Académico resolvió que usted pueda ingresar en el semestre 2015/1 (agosto de 2014), o si así conviene a sus intereses diferir su ingreso al semestre 2015/2 (enero de 2015).

El Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas (PMDCBq) está inscrito en el Padrón Nacional de Posgrados de Calidad del CONACyT y cuenta actualmente con el nivel Internacional, por lo que todos sus estudiantes tienen derecho a beca en caso de cumplir con los requisitos establecidos en el reglamento de becas de CONACyT. Por lo mismo es importante que en caso de que Ud. reciba una remuneración diferente a la beca lo informe a la Coordinación del Programa para determinar si no se infringe la normatividad vigente.

A nombre del Comité Académico del PMDCBq quiero hacerle llegar una felicitación por su ingreso al Posgrado que sirva al mismo tiempo de estímulo para que lo concluya exitosamente y en los tiempos que marca el plan de estudios.

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Ciudad Universitaria, DF, a 16 de junio de 2014

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ROBERTO CORIA ORTEGA

PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS CIENTÍFICOS



SOCIEDAD MEXICANA DE NUTRICIÓN Y ENDOCRINOLOGÍA, A.C.

Otorga la presente

CONSTANCIA

Mesa Directiva
2012 - 2013

Dr. Salvador Zubirán Anchondo †
Fundador

Dr. J. Jorge Espinoza Campos
Presidente

Dr. Francisco Javier
Velázquez Chávez
Secretario

Dr. José Arturo Bermúdez
Gómez Llanos
Tesorero

Dr. Alfredo Ulloa Aguirre
Vicepresidente

Dr. Rafael Campuzano Rodríguez
Subsecretario

Dr. José Roberto Gómez Cruz
Subtesorero

A: Eulises Díaz Díaz

Por la presentación en Cartel del trabajo titulado:

*“METODOLOGÍA PREPARATIVA Y ANALÍTICA PARA
LA CUANTIFICACIÓN DE PRODUCTOS FINALES DE
GLICOSILACIÓN AVANZADAS Y SUS
SUBPRODUCTOS DE DEGRADACIÓN.”*

Durante el LIII Magno Congreso Internacional de esta
Sociedad, llevado a cabo del 12 al 15 de Noviembre en la
Ciudad de Cancún, Quintana Roo.

Noviembre 2013.

Dr. J. Jorge Espinoza Campos
Presidente

Dr. Francisco J. Velázquez Chávez
Secretario

Dr. José Arturo Bermúdez
Tesorero



Mesa Directiva
2012 – 2013

Dr. Salvador Zubirán Anchondo †
Fundador

Dr. J. Jorge Espinoza Campos
Presidente

Dr. Francisco Javier
Velázquez Chávez
Secretario

Dr. José Arturo Bermúdez
Gómez Llanos
Tesorero

Dr. Alfredo Ulloa Aguirre
Vicepresidente

Dr. Rafael Campuzano Rodríguez
Subsecretario

Dr. José Roberto Gómez Cruz
Subtesorero

SOCIEDAD MEXICANA DE NUTRICIÓN Y ENDOCRINOLOGÍA, A.C.

Durante la celebración del LIII Congreso Internacional de la Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología, que se llevo a cabo en Cancún, Quintana Roo del 12 al 15 de noviembre del año en curso, tuvimos 146 trabajos libres de las diferentes áreas de la Endocrinología, que se presentaron en la modalidad de CARTELES.

Como se menciona en la convocatoria enviada previamente se elegirían los mejores Carteles por área, a los cuales se les otorgaría como **PREMIO** lo siguiente:

1er. Lugar BECA al Congreso 96th Endocrine Society que se llevará a cabo en la Ciudad de Chicago del 21 al 24 de junio de 2014. Los trabajos premiados en primer lugar tendrán que presentarlo en extenso ante la Comisión de Divulgación Científica de la SMNE para su publicación en la Revista de Nutrición y Endocrinología. Este último requisito es obligatorio para poder ser merecedor a esta beca.

2do. Lugar BECA al LIV Congreso de la Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología a celebrarse del 3 al 6 de diciembre en Mérida, Yucatán.

En ambos casos la beca incluye cuota de inscripción, transportación y hospedaje al Congreso a celebrarse en 2014.

Los ganadores por área son:

DIABETES MELLITUS

1° METODOLOGÍA PREPARATIVA Y ANALÍTICA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PRODUCTOS FINALES DE GLICOSILACIÓN AVANZADAS Y SUS SUBPRODUCTOS DE DEGRADACIÓN.

Eulises Díaz Díaz

2° 001.- DIABETES, OBESIDAD, HIPERTENSIÓN Y ENFERMEDAD CAROTÍDEA ATROSCLEROSA EN SUJETOS SIN HISTORIA DE INFARTO CEREBRAL O ISQUEMIA CEREBRAL TRANSITORIA.

Erwin Chiquete

2° 021.- ANÁLISIS DE LOS FACTORES DE RIESGO PREDICTORES DE LA PROGRESIÓN A DIABETES MELLITUS TIPO 2 EN POBLACIÓN CON PREDIABETES DEL OCCIDENTE DE MÉXICO, COHORTE PROSPECTIVA.

Miguel Angel Polanco Preza

2° 026.- CONTRIBUCIÓN DE LA VARIANTE rs9282541 DE ABCA1 AL RIESGO DE DIABETES TIPO 2 EN POBLACIÓN INDÍGENA MAYA DE LA PENÍNSULA DE YUCATÁN.



UNIVERSIDAD
DE GUANAJUATO

1 al 3 Octubre 2014

Sede:
Espacios Magnos de Rectoría
de Campus Guanajuato.

1er Simposio Iberoamericano

AGES

Los AGES y La Salud

Otorga la Presente

CONSTANCIA

Eulises Díaz Díaz

a:

Mario Cárdenas León, Itzel Uribe Jiménez, José Antonio Alvarado Ríos,
Juan Carlos Auriostigue Bautista, José Ricardo Correa-Rotter, Carlos Alberto Aguilar Salinas, Fernando Larrea

Por la presentación del **TRABAJO LIBRE** titulado:

"Desarrollo y Validación de Inmunoensayos Empleados para la Cuantificación de Productos Finales de Glicación Avanzada."

Dr. Carlos Hidalgo Valadez
Director de la División de Ciencias de la Salud
Universidad de Guanajuato

Dra. Ma. Eugenia Garay Sevilla
Directora del Departamento de Ciencias Médicas
Co-Directora del Comité Organizador
Universidad de Guanajuato

Dr. Jaime Uribarri
Co-Director del Comité Organizador
Mount Sinai School of Medicine, New York





UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO

1 al 3 Octubre 2014

Sede:
Espacios Magnos de Rectoría
de Campus Guanajuato.

Por Seminario Interdisciplinario

AGES

Los AGES y La Salud

Otorga la Presente

CONSTANCIA

Itzel Uribe Jiménez

Por el Dr. Carlos Díaz Díaz, Jorge Sánchez Castro, Julia Pérez Ramos, María Carifera y León, José Antonio Abadillo Ruiz, Juan Carlos Agustino Buitola, José Ricardo Campa Buitón, Carlos Alberto Aguilar Chávez, Fernando Lora.

Por la presentación del TRABAJO LIBRE titulado:

"Evaluación de la Capacidad de la Medición de los Productos Finales de Glicación Avanzada para Predecir el Desarrollo de la Nefropatía Diabética."

Dr. Carlos Hidalgo Velasco

Dr. Carlos Hidalgo Velasco
Catedrático de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Guanajuato

Dr. Mtra. Eugenia Gatzky Sevilla

Dr. Mtra. Eugenia Gatzky Sevilla
Catedrática de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Guanajuato

Dr. Jaime Uchiani

Dr. Jaime Uchiani
Catedrático de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Guanajuato



LOURS UNIVERSITY
EXCELLENCE



CONGRESO NACIONAL DE ENDOCRINOLOGIA PEDIATRICA
ENDOPED 2014

La Habana, Cuba 19-21 de noviembre del 2014

DIPLOMA

PARTICIPANTE: Dr. Eulises Díaz Díaz

Metodología preparativa y analítica para el desarrollo de
inmunoensayos empleados en la cuantificación de productos
TEMA: Finales de glicación avanzada (AGEs)

EN CALIDAD DE:

- | | | | |
|----------------------|--------------------------|--------------------|-------------------------------------|
| CONFERENCISTA | <input type="checkbox"/> | CURSO PRE CONGRESO | <input checked="" type="checkbox"/> |
| PRESIDENTE DE SESIÓN | <input type="checkbox"/> | SIMPOSIO | <input type="checkbox"/> |
| COMUNICACIÓN LIBRE | <input type="checkbox"/> | PÓSTER | <input type="checkbox"/> |
| | | DELEGADO | <input checked="" type="checkbox"/> |

PO La Olla

Dra. Teresa Montesino Estévez
Secretaria Comité Organizador

Dr. Francisco Carvajal

Dr. Francisco Carvajal
Martínez

Dictamen No. 077/14

Otorga 1 Créditos

Firma autorizada [Firma]





CONGRESO NACIONAL DE ENDOCRINOLOGIA PEDIATRICA
ENDOPED 2014

La Habana, Cuba 19-21 de noviembre del 2014

DIPLOMA

PARTICIPANTE: Dr. Eulisis Díaz Díaz

TEMA: OBESIDAD Y SU ASOCIACIÓN CON COMPONENTES DEL SÍNDROME METABÓLICO EN UNA MUESTRA DE NIÑOS DE ESCUELAS PÚBLICAS URBANAS DEL ESTADO DE MÉXICO

EN CALIDAD DE:

CONFERENCISTA CURSO PRE CONGRESO
PRESIDENTE DE SESIÓN SIMPOSIO
COMUNICACIÓN LIBRE PÓSTER
DELEGADO

COAUTORES:

DR. ABELARDO AVILA CURIEL
DR. CARLOS GALINDO GÓMEZ
DRA. LILIANA JUÁREZ MARTÍNEZ
DR. FRANCISCO ENRIQUE GÓMEZ RODRÍGUEZ
DR. MARCO ANTONIO AVILA ARCO

Dra. Teresa Montesino Estévez
Secretaria Comité Organizador

Dr. Francisco Carvajal
Martínez

Dictamen No. 077/14

Otorga 2 Créditos

Firma autorizada: [Firma]

SOCIEDAD MEXICANA DE NUTRICIÓN Y ENDOCRINOLOGÍA, A.C.



Mesa Directiva
2013 - 2014

Otorga la presente

CONSTANCIA

A: Eulices Díaz Díaz

Por la presentación del trabajo titulado:

“Evaluación de las concentraciones circulantes de Productos Finales de Glicación Avanzada derivados de glucosa y su asociación con la disminución de la tasa de filtrado glomerular durante la Diabetes Mellitus.”

Durante el LIV Congreso Internacional de esta Sociedad, llevado a cabo del 3 al 6 de Diciembre en la Ciudad de Mérida, Yucatán.

Diciembre, 2014.

Dr. Alfredo Ulloa Aguirre
Presidente

Dr. Rafael Campuzano Rodriguez
Secretario

Dr. José Roberto Gómez Cruz,
Tesorero

ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/263684598>

Modulation of Oxidative Stress in Fatty Liver of Rat with Metabolic Syndrome by Hibiscus Sabdariffa

Article in *Immunology Endocrine & Metabolic Agents - Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry - Immunology Endocrine & Metabolic Agents)* · December 2013

DOI: 10.2174/18715222113139990060

CITATION

1

READS

17

7 authors, including:



Verónica Guarner

Instituto Nacional de Cardiología

69 PUBLICATIONS 319 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Antonio Díaz-Cruz

Universidad Nacional Autónoma de México

24 PUBLICATIONS 196 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

Modulation of Oxidative Stress in Fatty Liver of Rat with Metabolic Syndrome by Hibiscus Sabdariffa

Zúñiga-Muñoz AM¹, Guarner V¹, Diaz-Cruz A², Diaz-Diaz E³, Nava-Cuellar C², Beltrán-Rodríguez U¹ and Pérez-Torres I^{1*}

¹Department of Cardiovascular Biomedicine, Department of Pathology and Department of Physiology, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", Juan Badiano No. 1, Sección XVI, Tlalpan, México DF, C.P. 14080

²Department of Animal Nutrition and Biochemistry, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, Ciudad Universitaria, México DF C.P. 04510

³Department of Reproduction Biology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", Vaseo de Quiroga 15, Sección XVI, Tlalpan, México DF, C.P. 14000

Abstract: Metabolic syndrome (MS) is associated with oxidative stress, both at early and advanced stages of the disease. Studies have confirmed the important role of medicinal plants or their active components in the prevention, treatment and lowering of risk factors in MS. Others authors have observed that polyphenols from *Hibiscus sabdariffa* L. (HSL) calyces increase cellular antioxidant capacity. We studied rat groups: Control (C), Control plus 30 g per liter of HSL calyces infusion (C+HSL 3%), 30 % Sucrose-fed (MS) in their drinking water and 30 % Sucrose fed plus HSL calyces infusion (MS+HSL) at the concentration of 7.5, 15 and 30 g per liter. The administration of HSL infusion to the MS rats increased the concentration of antioxidant capacity, catalase, superoxide dismutase and peroxidases activity enzymes in a dependent way, while the activity of glutathione peroxidase decreased in the liver. Indices of lipid peroxidation and protein carbonylation decreased in the liver, and systolic blood pressure, body weight, intra-abdominal fat and serum levels of glycation, triglycerides, insulin and HOMA index also decreased. These results suggest that the treatment with HSL infusion may decrease oxidative stress in MS liver and that it could be regarded as an alternative treatment for MS.

Keywords: Antioxidant capacity, antioxidants enzymes, carbonylation of the proteins, FRAP, Hibiscus sabdariffa L, HOMA index, insulin resistance, lipid peroxidation, metabolic syndrome, non alcoholic fatty liver, non-esterified fatty acids, oxidative stress, polyphenols, reactive oxygen species, superoxide anion.

INTRODUCTION

MS may be defined by the association of at least three of the following pathologies: arterial hypertension, dyslipidemia, insulin resistance and obesity [1]. It has been observed that 70% of the adult patients and 25.5% of the pediatric patients with this syndrome have non-alcoholic fatty liver (NAFL) [2, 3]. NAFL results from the increase in the concentration of serum free fatty acids and their accumulation as triglycerides in the liver tissue due to insulin resistance [4]. In our laboratory we have developed a rat model of MS by administration of 30% sucrose in the drinking water during 24 weeks. The animals have several metabolic and functional abnormalities usually observed in the clinic such as: hypertension, hypertriglyceridemia, obesity and insulin resistance [5], which allow the increase in the serum concentration of non-esterified fatty acids and their accumulation as triglycerides in liver tissue. This accumulation produces an excess of reactive oxygen species (ROS) [4], as well as the loss of the antioxidant reserves and the inactivation of the antioxi-

dant enzymatic system, resulting in NAFL [2]. It has been reported that this type of hepatic oxidative stress is characterized by both the diminution of the concentration of reduced glutathione (GHS) and by the low activity of the enzymes SOD and CAT, with an increase in the lipid peroxidation and protein carbonylation [4].

The association of NAFL and oxidative stress defines both the early stages of MS and its transition to more advanced stages such as non alcoholic liver steatosis, cirrhosis and, in a reduced number of cases, predisposition to hepatocellular carcinoma [2]. Hence the importance of seeking strategies to improve the antioxidant capacity in subjects who suffer from NAFL as a consequence of MS, since it has been reported that in these patients the activities of the enzymes catalase (CAT), and Cu-Zn superoxide dismutase (Cu-Zn SOD) are decreased [5], while concentration of carotenoids, ascorbic acid, vitamin E, vitamin A and selenium is low [6].

The calyces of *Hibiscus sabdariffa* L. (HSL) have been used to treat gastrointestinal disorders, liver diseases, hypercholesterolemias and hypertension for many decades, in traditional medicine throughout the world [7]. At present, it is known that both the calyces and the infusion of HSL contain phenolic compounds such as protocatechuic acid, flavonoids

*Address correspondence to this author at the Department of Pathology, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", Juan Badiano No. 1, Sección XVI, Tlalpan, México DF, C.P. 14080. Tel: 525 573 29 11 Ext. 1362; Fax: 525 573 09 26; E-mail: perortor@yaho.com.mx

such as anthocyanins, quercetin, caffeic acid and epigallocatechin-3-0-gallate [8]. In general, these polyphenolic compounds have been found to be protective for the cellular components from damage by oxidation, thus avoiding cellular death [9].

Taking into account the previous observations, which suggest the participation of the antioxidant system in the metabolic and functional processes of the NAFL in the rat model of MS, and the above considerations of the antioxidant properties of HSL infusion, the antioxidant effects of four different concentrations of the infusion of HSL (0.75%, 1.5% and 3%) were determined in the liver of MS rats using some markers of oxidative stress (lipid peroxidation, carbonylation, as well as glycation in serum). The activities of some antioxidant enzymes such as catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) manganese (Mn), copper-zinc (Cu-Zn), peroxidases, glutathione peroxidase (GPX) and the non-enzymatic defenses, were estimated by the ferric reducing antioxidant power (FRAP) in liver.

MATERIAL AND METHODS

Preparation of the HSL Calyces Infusion

The infusion was prepared as follows: 7.5, 15 and 30 g (0.75, 1.5 and 3% respectively), the HSL calyces were added to a liter of boiling (95-100°C) drinking water for 10 minutes and then left to cool. The solution was filtered and then 300 g sucrose were added. It was stored at 4°C until consumption.

Antioxidant Capacity of HSL Calyces Infusion

The antioxidant capacity of the HSL infusion was measured by FRAP. 50 µl of HSL infusion were suspended in 1.5 ml of reaction mixture (300 mM acetate buffer pH 3.6, 20 mM hexahydrate of ferric chloride, 10 mM of 2, 4, 6 Tris-2-pyridil-s-triazine dissolved in 40 mM chlorhydric acid were added in a relation of 10:1:1 v/v respectively); the mixture was shaken vigorously in a vortex for 5 seconds. Then it was incubated at 37° C for 15 minutes in the dark. The absorbance was measured at 593 nm. The calibration curve was obtained using FeSO₄ [10]. Total percentage of polyphenols was measured by the laboratory of toxicology of the FMVZ, UNAM.

Animals and Diet

Experiments in animals were approved by the Laboratory Animal Care Committee of our institution and were conducted in compliance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of NIH. Sixty Male Wistar rats (150 ± 5 g), were housed with a 12:12 light-dark cycle and randomly separated into six groups of ten animals: group 1: control rats (C), given tap water for drinking; group 2: control rats, given drinking water containing 3% of HSL calyces infusion; group 3: MS rats, given drinking water containing 30% of sucrose for 24 weeks, as well as the treatment with HSL infusion: group 4: MS+HSL 0.75%; group 5: MS+HSL 1.5% and group 6: MS+HSL 3%. Water and rodent commercial food (23% of crude protein, 4.5% of crude fat, 8 % of ashes and 2.5% of added minerals) were given *ad libitum*. At the end of the 24 weeks of treatment, the animals were weighed

and their systolic blood pressure (SBP) was measured by the tail-cuff method (Pérez-Torres *et al.*, 2009). After overnight fasting, the animals were subjected to euthanasia with a guilotine.

Serum and Tissue Sampling

The blood was collected and centrifuged for 20 minutes at 3000 rpm, at 4°C. The serum was separated and stored at -70°C. The liver was separated and dissected while fresh; it was homogenized in a sucrose solution (25 mM sucrose, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.35) with protease inhibitors (1 mM PMSF, 2 µM pepstatin, 2 µM leupeptin and 0.1% aprotinine), centrifuged at 2500 rpm for 10 minutes at 4°C. The supernatant was separated and stored at -70° C. Total proteins were determined by the method of Lowry [11]. The intra-abdominal fat was separated, weighed and then discarded.

Biochemistry and Advanced Glycation of the Serum

The measurement of cholesterol, triglycerides, glucose, was carried out with enzymatic kits from Pointe Scientific Inc. (Canton, Michigan, USA). Serum insulin was evaluated using specific kit for rat from Linco Research, Inc. (Missouri, USA); the sensibility was 0.05 ng/ml. Homeostasis model assessment (HOMA) was used as an index to measure the degree of insulin resistance and was calculated by the formula: [insulin (µIU/mL) X glucose (mmol/L)]/22.5 [12].

Serum AGEs concentration was evaluated by Radioimmunoassay (RIA), according to the RIA method of Rubio-Ruiz [13]. The anti-AGEs specific polyclonal antibody, were produced in rabbit using BSA glycated (AGE-BSA) as immunogen. The AGE-BSA prepared by incubation of BSA (50 mg/mL) with glucose (0.5 M), during 90 days at 37°C, in dark under sterility condition was also labeled with ¹²⁵I by chloramine T method, and used as radioactive tracer. The AGE-BSA used had in average, 96% of glycation, evaluating by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry (MALDI-TOF) and analyzed with the BSA's sequence from GenBank number CAA76847 (gi:3336842) and the programme: PyMOL v0.99 (DeLano Scientific LLC, CA, USA). The antiserum was doubly purified; first in Affi-Gel 102-BSA to remove antibodies anti-BSA and subsequently in Affi-Gel 102-AGE-BSA to retrieve the specific antibodies anti-AGEs. Purified antibodies were titrated and employed in the liquid phase RIA with precipitation by second antibody, using an anti-rabbit IgG antiserum produced in lamb. The calibrators were prepared by Lowry quantification and fluorescence analysis using Luminescence Spectrometer; model LS 50B from Perkin Elmer. The calibrator's specific activity was established by the fluorescence emitted by 1 mg/mL of AGE-BSA [300 U/(mg/mL)]. The standard was diluted to establish a range of 0-19200 µU/mL, where the RIA is linear. The analytical sensitivity was 20 µU/mL (µU = micro-units of arbitrary fluorescence to 370/440 nm). The intra e inter-coefficients of variation were 5.7 and 7.9%, respectively.

Evaluation of Antioxidant Enzymatic System

The measurement of the activity of antioxidant enzymes was carried out by electrophoresis in 8% polyacrylamide

native gels [14]. To determine the activity of CAT, the gel was washed with distilled water during 5 minutes; this procedure was repeated three times, then it was incubated with a mixture of 1% $K_3Fe(CN)_6$ and 1% of $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ for 10 minutes in the dark and then washed with distilled water to stop the reaction [15].

To determine the activity of SOD, the gel was washed with distilled water during 5 minutes; this procedure was repeated three times, then it was incubated with 2.45 mM nitro blue tetrazolium (NBT) for 20 minutes, then the NBT solution was discarded and the gel was incubated in a solution of 28 mM EDTA, 0.028 mM riboflavin, 36 mM phosphate buffer pH 7.8. After 15 minutes of incubation in the dark, the NBT stain for O_2 was developed by exposure to UV light for another 10 minutes [15]. Finally, to determine the activity of peroxidases, the gel was washed with distilled water during 5 minutes; this procedure was repeated three times and was developed according to a modified method of Abrams and Webster [16], incubating in a mixture of 0.3 mg/ml 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine dissolved in a mixture of ethanol, acetic acid and water (1:1:1 v/v) with H_2O_2 for 10 minutes in the dark. The gels were analyzed by densitometry with an image Sigma Scan Pro 5 Analyzer.

The activity of enzyme GPX was measured by spectrophotometry: 1 mg of protein from the liver homogenate was suspended in 1.6 ml of 50 mM phosphate buffer (pH 7.0), with added 0.2 mM NADPH, 1 mM GHS and 1 UI/ml glutathione reductase. The mixture was incubated for 5 minutes at room temperature, then 100 μ l of 0.25 mM H_2O_2 were added and the reading was taken immediately at 340 nm (initial reading) and again after 5 minutes (final reading) [17].

Evaluation of Antioxidant Capacity of the Non-enzymatic System

For the precipitation of the proteins in the samples 100 μ l of 10% $ZnSO_4$ and 100 μ l of 0.5 N NaOH were added to one mg of protein from the liver homogenate and centrifuged at $7155 \times g$, by a modification of the method described by Pérez LP. [18], 50 μ l of the supernatant were suspended in 1.5 ml of reaction mixture (300 mM acetate buffer pH 3.6, 20 mM hexahydrate of ferric chloride, 10 mM of 2, 4, 6 Tris-2-pyridil-s-triazine dissolved in 40 mM chlorhydric acid (HCl) were added in a relation of 10:1:1 v/v respectively); the mixture was shaken vigorously in a vortex for 5 seconds. Then it was incubated at 37° C for 15 minutes in the dark. The absorbance was measured at 593 nm. The calibration curve was obtained using Fe^{2+} ($FeSO_4$) [10].

Lipid Peroxidation (TBARS)

TBARS, a marker of damage by free radicals, was measured by a standard method. To 1 mg of protein from the liver homogenate, 50 μ l methanol with 4% BHT plus phosphate buffer pH 7.4 were added. The mixture was shaken vigorously in a vortex for 5 seconds and then incubated in a water bath at 37° C for 30 minutes. This was followed by the addition of 1.5 ml of 0.8 M thiobarbituric acid and then incubated in a water bath at boiling temperature for 1 hour. After this time and to stop the reaction, the samples were placed on ice; 1 ml 5% KCL was added to each sample as well as 5 ml

n-butanol; they were shaken in a vortex for 30 seconds and centrifuged at 2000 rpm. at room temperature for 2 minutes. Then the n-butanol phase was extracted and the absorbance was measured at 532 nm. The calibration curve was obtained using tetraethoxypropane as standard [15].

Protein Carbonylation

To measure the carbonylation of the proteins, 1 mg of protein from liver homogenate was added to 500 μ l of 2.5 N HCl or 500 μ l of 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH). It was vigorously mixed in vortex and incubated in darkness at room temperature during one hour, shaking in vortex every 15 minutes. At the end of the incubation period, 500 μ l 20% trichloroacetic acid were added, and the mixture was centrifuged at 15000 g for 5 minutes. The supernatant was discarded, continuing with the washings, first removing the precipitate with a sealed capillary tube, adding 1ml ethanol/ethylacetate, allowing 10 minutes repose between each washing to permit the elimination of DNPH, mixing and centrifuging at 15000g for 10 minutes; this was repeated twice. Finally, 1 ml of solution of 6 M guanidine hydrochloride with 20 mM monobasic phosphate (KH_2PO_4) pH 2.3 was added and it was incubated again at 37° C during half hour. Absorbance was read in a spectrophotometer at 370 nm, using air as blank and molar absorption coefficient of $22000M^{-1}cm^{-1}$ [19].

Statistical Analyses

Statistical analysis and graphics were performed with a SigmaPlot 11 program. The data are presented as the mean \pm SEM. Statistical significance was determined by two-way ANOVA test, followed by the post-hoc Tukey test. Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$.

RESULTS

Antioxidant Capacity of the HSL Calyces Infusion and Total Polyphenols Percentage

The antioxidant capacity measured by FRAP in the different concentrations of HSL calyces infusion was 43.02 ± 3.30 nmol of Fe II/ml for 0.75 %, 63.42 ± 4.76 nmol of Fe II/ml for 1.5 % and 85.69 ± 10.36 nmol of Fe II/ml for 3 %. The total polyphenol percentage present in the calyces of HSL was 3.80 % per g.

Effects of the Treatment with HSL Infusion in the Animal SBP, Body Weight, Body Fat, Advanced Glycation and Biochemistry Serum

Table 1 shows that the SBP in the MS group were significantly elevated in comparison with the C group ($p < 0.001$), but the treatment with HSL significantly decreased the SBP in the MS groups at the concentrations of 0.75%, 1.5% and 3% (all with $p < 0.001$). There was no significant difference in the SBP between C and C+HSL 3% groups.

The body weight in the MS group was higher than in the C group ($p < 0.001$). The treatment with HSL significantly reduced the body weight in the MS groups at concentrations of 0.75% and 3% (all with $p < 0.05$). There was no significant

Table 1. Effects of the treatment with HSL infusion upon the systolic blood pressure (SBP), body weight (BW), body fat (BF) and serum. Data are means \pm SE, n=8 each group. MS vs. other groups statistically significant at: *p<0.05, **p<0.005, ***p<0.001.

	C	C+HSL 3%	MS	MS+HSL 0.75%	MS+HSL 1.5%	MS+HSL 3%
SBP (mmHg)	113.8 \pm 1.5	117.9 \pm 0.6	135.7 \pm 0.8***	124.9 \pm 0.8***	125.3 \pm 0.9***	125.9 \pm 0.9***
Body weight (g)	427.0 \pm 19.6	449.9 \pm 18.5	553.5 \pm 12.6***	479.6 \pm 15.2*	513.0 \pm 20.8	475.0 \pm 12.0*
Body Fat (g)	4.2 \pm 0.6	7.5 \pm 1.0	14.6 \pm 0.9***	13.8 \pm 1.1	13.1 \pm 1.1	10.1 \pm 0.7*
Cholesterol (mg/dL)	105.4 \pm 0.5	101.5 \pm 1.5	105.5 \pm 1.2	103.3 \pm 1.1	98.4 \pm 1.2***	100.5 \pm 0.8*
Triglycerides (mg/dL)	103.7 \pm 2.3	116.6 \pm 3.6	163.8 \pm 4.9***	153.6 \pm 5.3	130.4 \pm 6.0***	115.0 \pm 2.6***
Glucose (mmol/dL)	6.5 \pm 0.2	5.4 \pm 0.1	6.7 \pm 0.1	6.6 \pm 0.1	6.5 \pm 0.1	6.3 \pm 0.1
Insulin (μ U/mL)	2.6 \pm 0.2	2.8 \pm 0.6	26.0 \pm 1.1***	18.1 \pm 1.4***	13.0 \pm 1.3***	10.3 \pm 1.0***
HOMA Index	1.1 \pm 0.0	0.7 \pm 0.2	6.2 \pm 0.2***	4.1 \pm 0.6**	3.3 \pm 0.4***	2.5 \pm 0.1***
AGEs (μ U/mL)	31.9 \pm 0.7	35.1 \pm 2.2	317.0 \pm 24.7***	149.4 \pm 23.7***	197.1 \pm 12.1***	199.1 \pm 19.0***

difference in the body weight between C and C+HSL 3% groups, (Table 1).

Table 1 shows that the intra-abdominal fat in the C group was significantly lower than in the MS group ($p < 0.001$), but the treatment with HSL decreased the intra-abdominal fat in the MS group at the concentration of 3% ($p = 0.01$). There was no significant difference in the intra-abdominal fat between C and C+HSL 3% groups.

There was no significant difference in the concentration of cholesterol between the C and MS groups, but after the treatment with HSL in the MS groups, it was found that the cholesterol decreased at the concentration of 1.5% ($p < 0.001$) and 3% ($p = 0.02$). There was no significant difference in the concentration of cholesterol between C and C+HSL 3% groups, (Table 1).

Table 1 shows that the serum triglycerides in the MS group were significantly elevated in comparison with the C group ($p < 0.001$), but the treatment with HSL significantly decreased the levels of triglycerides in the MS groups at the concentrations of 1.5% and 3% (all with $p < 0.001$). There was no significant difference in the concentration of serum triglycerides between C and C+HSL 3% groups.

There was no significant difference in the concentration of glucose between experimental groups (Table 1).

Table 1 shows that the serum insulin in the MS group was significantly elevated in comparison with the C group ($p < 0.001$), but the treatment with HSL significantly reduced the levels of insulin in the MS groups at the concentrations of 0.75%, 1.5% and 3% (all with $p < 0.001$). There was no significant difference in the serum insulin between C and C+HSL 3% groups.

The HOMA index calculated for MS group was higher than in C group ($p < 0.001$). But in the MS groups with treatment of HSL at 0.75%, 1.5% and 3%, the index was significantly reduced, all with $p < 0.001$, compared with MS group. There was no significant difference in the HOMA index calculated for C and C+HSL 3% groups, (Table 1).

In the C group the serum concentration of advanced glycation end products (AGEs) was significantly lower than in MS ($p < 0.001$). The serum concentration of AGEs decreased in the groups MS+HSL at 0.75%, 1.5% and 3%, all with $p < 0.001$ with respect to the MS group without treatment. There was no significant difference in the concentration of cholesterol between C and C+HSL 3% groups, (Table 1).

Antioxidant Enzymatic System

Figure 1A shows that the enzymatic activity of CAT in the MS group was significantly lower than in the C group by $26.65 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \times \text{mg}^{-1} \text{protein}$ ($p = 0.01$). When comparing the enzymatic activity of CAT, from the groups that received treatment with HSL at 0.75%, 1.5% and 3%, it was found significantly higher than that in the group without treatment, by 26.5 ($p = 0.01$), 30.58 ($p = 0.005$) and 42.01 ($p < 0.001$), respectively. Figure 1B shows that there was no significant difference in the enzymatic activity of CAT between C and C+HSL 3% groups.

In Figure 2A it can be observed that there is no significant difference in the activity of the enzyme Mn-SOD between the groups C and MS. Nevertheless, when comparing the enzymatic activity of Mn-SOD from MS group with the groups where treatment with HSL was given at 0.75%, 1.5% and 3%, a higher activity was observed in the groups with

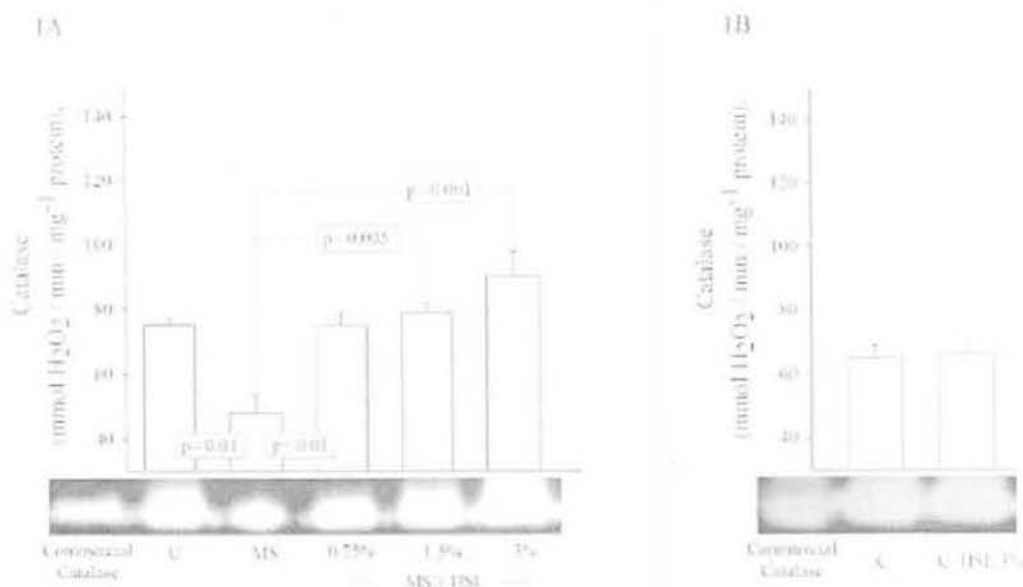


Fig. (1). Effect of the treatment with HSL infusion upon the catalase activity in the liver homogenate. Data are means \pm SE, n=8 each group.

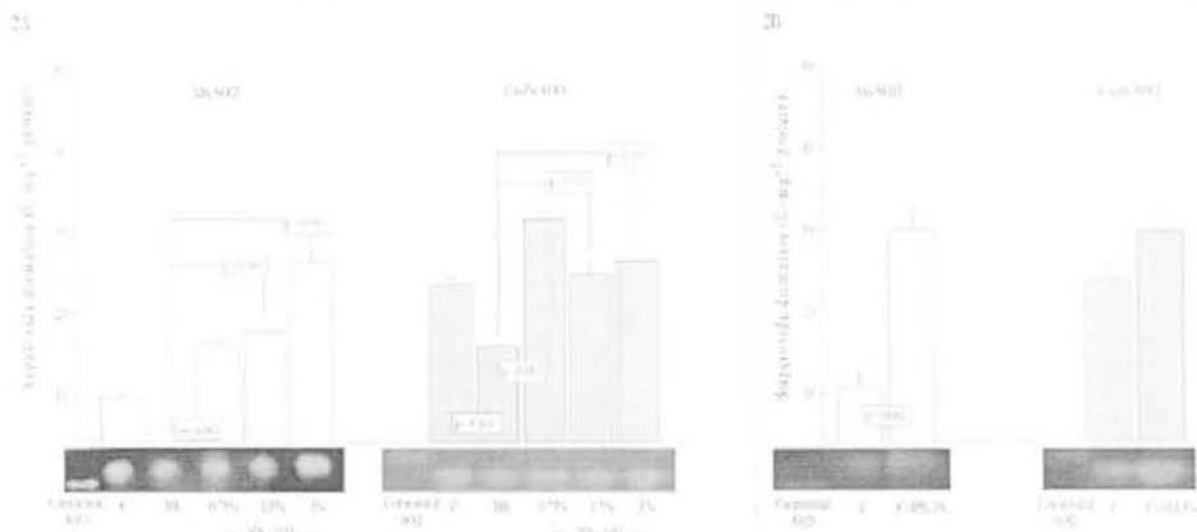


Fig. (2). Effect of the treatment with HSL infusion upon the superoxide Mn and Cu-Zn activity in the liver homogenate. Data are means \pm SE, n=8 each group.

treatment, by 10.72, 12.77 and 20.77 U/mg⁻¹ protein, respectively, all with p<0.001 with relation to MS group. Also in (Fig. 2B). It can be observed that the activity of Mn-SOD is incremented in the C+HSL 3% group by 16.73 (p<0.001) with relation to C group.

Likewise, the activity of the enzyme Cu-Zn SOD was significantly higher in the C group by 7.62 U/mg⁻¹ (p= 0.001) in comparison with the MS group. But the treatment with HSL increased the activity of Cu-Zn SOD in the MS groups at the concentrations of 0.75%, 1.5% and 3% by 15.97, 9.07 and 10.71 U/mg⁻¹ (all with p<0.001), respectively with relation to MS group (Fig. 2A). There was no significant difference in the enzymatic activity of Cu-Zn SOD between C and C+HSL 3% groups, (Fig. 2B).

Figure 3A shows that the enzymatic activity of the peroxidases from the MS group is significantly diminished by

1.63 U/mg-1, protein (p=0.003) with respect to the C group. Although in the groups MS +HSL at 15 % and 3% there is an increase in the enzymatic activity of 1.20 (p=0.03) and 2.75 U/mg⁻¹ protein (p <0.001), respectively with relation to MS group. Figure 3B shows that there was no significant difference in the enzymatic activity of Cu-Zn SOD between C and C+HSL 3% groups.

The activity of the enzyme GPX from the C group was lower than that of the MS group by 0.072 mmol/min/ of oxidized NADPH (p<0.001). Nevertheless, when comparing the MS group with those that received the treatment with HSL 0.75%, 1.5%, and 3 %, the enzymatic activity was lesser by 0.064, 0.077 and 0.056 mMol/min/mg of oxidized NADPH (all with p<0.001 (Fig. 4A). There was no significant difference in the enzymatic activity of Cu-Zn SOD between C and C+HSL 3% groups, (Fig. 4B).

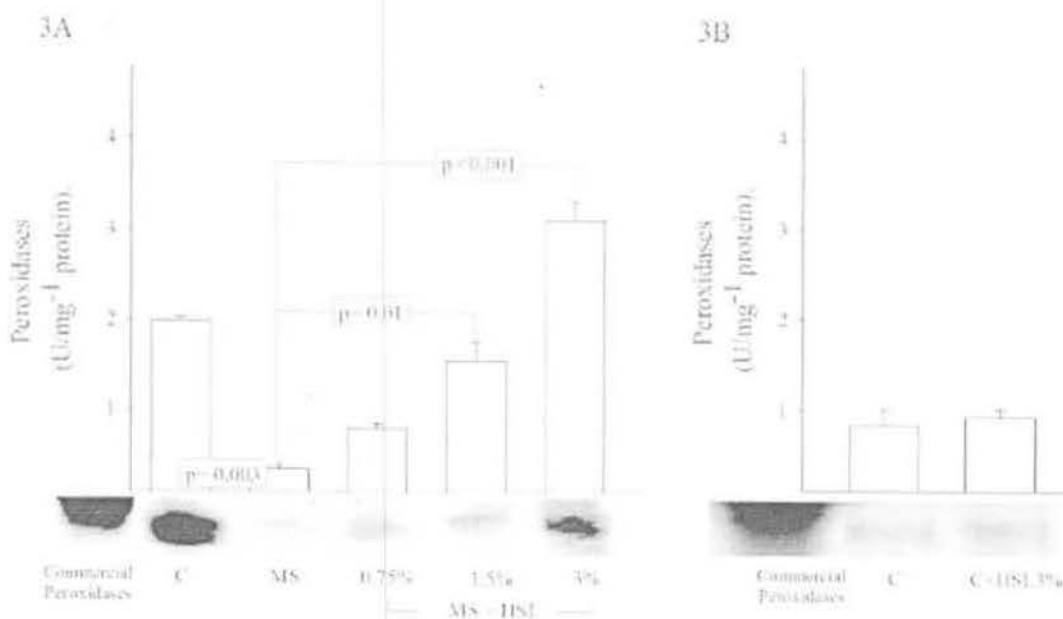


Fig. (3). Effect of the treatment with HSL infusion upon the peroxidase activity in the liver homogenate. Data are means \pm SE, $n=8$ each group.

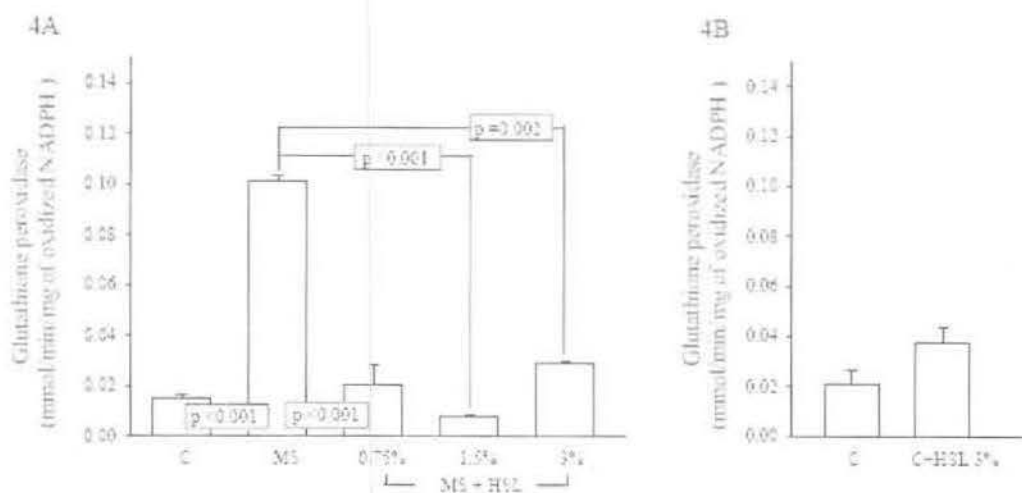


Fig. (4). Effect of the treatment with HSL infusion upon the glutathione peroxidase activity in the liver homogenate. Data are means \pm SE, $n=8$ each group.

Effects of the Treatment with HSL in FRAP, Lipid Peroxidation and Protein Carbonylation in the Liver of the MS Rats

Table 2 shows that the antioxidant capacity of the non-enzymatic system in the C group is higher than in the MS group ($p=0.006$). In the MS groups treated with HSL it was found that the antioxidant capacity of the non-enzymatic system increased at the concentration of 0.75% ($p=0.003$), 1.5% ($p=0.007$) and 3% ($p=0.002$) with respect to MS group. There was no difference in the antioxidant capacity of the non-enzymatic system between C and C+HSL 3% groups.

The index of lipid peroxidation is shown in Table 2; it was significantly higher in the MS group compared with the C group ($p<0.001$). Nevertheless, a decrease was observed in the MS groups with HSL treatment at 0.75% ($p<0.001$), 1.5% ($p=0.01$) and 3% ($p<0.001$) with respect to MS group.

There was no difference in the index of lipid peroxidation between C and C+HSL 3% groups.

The protein carbonylation in the MS group was significantly higher than in the C group ($p<0.001$), but there was a decrease of it in the MS groups with HSL treatment at 0.75% ($p<0.001$), 1.5% ($p<0.001$) and 3% ($p<0.001$) with respect to MS group. There was no difference in the protein carbonylation between C and C+HSL 3% groups, (Table 2).

DISCUSSION

Polyphenols of the HSL Calyces Infusion

In this paper we tested if the antioxidant properties of HSL calyces infusions could improve the deteriorated state of MS rats. The antioxidant effects could be due to the presence of polyphenols. We have estimated total polyphenol

Table 2. Effects of the treatment with HSL infusion upon the antioxidant capacity of the non enzymatic system (FRAP) and over the markers of oxidative stress: lipid peroxidation (TBARS) and carbonylation in the liver of the MS rats. Data are means \pm SE, n=8 each group. MS vs. other groups statistically significant at: * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$.

	C	C+HSL 3%	MS	MS+HSL 0.75%	MS+HSL 1.5%	MS+HSL 3%
FRAP (nmol of Fe II/mg)	112.4 \pm 0.8	114 \pm 2.9	91.2 \pm 4.0 [*]	106.2 \pm 4.8 ^{**}	109.5 \pm 2.8 [*]	115.6 \pm 0.7 ^{**}
TBARS (nmol MDA/mg)	10.3 \pm 0.3	12.3 \pm 0.9	18.5 \pm 0.8 ^{***}	12.1 \pm 0.9 ^{***}	14.5 \pm 0.9 [*]	10.2 \pm 0.6 ^{***}
Protein Carbonylation (ng de carbonyls/mg)	6.3 \pm 0.1	6.1 \pm 0.2	7.1 \pm 0.1 ^{***}	6.6 \pm 0.2 ^{***}	5.9 \pm 0.4 ^{***}	6.0 \pm 0.3 ^{***}

percentage present in HSL calyces and the antioxidant capacity of the infusion, finding that the antioxidant capacity was increased according to the amounts of HSL used for each concentration, it has been reported that in 66% of the polyphenols contained in the calices passed to the infusion and also the antioxidant capacity measured by FRAP is explained in 95.24% of the occasions by the quantity of the polyphenols present in the infusion [20]. The polyphenols of the HSL calyces infusion would have been ingested and absorbed by the MS animals favoring an increase in the antioxidant system.

Systolic Blood Pressure

The results show that in our MS model the animals develop hypertension and this increase in the SBP is related to a low availability of nitric oxide (NO) [21]. This decrease of NO may be due to several factors, among them the uncoupling of the eNOS by absence of substrate or cofactors, which induces low production of NO. This could be oxidized by the superoxide anion (O_2^-), generating the NOO[•] and increasing the oxidative stress, which, in turn, alters the vasodilatation dependent on the endothelium, inducing an increase in SBP [22]. The treatment with HSL at 0.75%, 1.5% and 3% in MS groups had an antihypertensive effect. This could be attributed to the presence of anthocyanines in the calyces of HSL, as well as delphinidine and cyanidine-3-O-sambubiosides, which have an antihypertensive effect due to two synergic and complementary mechanisms of action: the first is diuretic, probably by a pharmacokinetic process similar to those of the antagonists of aldosterone (increases the elimination of water and natriuresis, without modifying the excretion of potassium) [23]. The second is that they are inhibitors, by competition, of the angiotensin converting enzyme (ACE). Some authors suggest that the flavonoids and other polyphenols act as chelating agents of the zinc atom present in the active center of ACE [24]. Likewise, there are ions that can dilate or contract the blood vessels, thereby playing a discrete role in the regulation of the blood pressure; such as Ca^{++} , which, when its concentration increases, stimulates the contraction of smooth muscle. However, the methanolic extract of HSL can inhibit the Ca^{++} influx into vascular smooth muscle cells, thereby reducing vasoconstriction [25].

Intra-abdominal Fat and Triglycerides

On the other hand, in the model of MS, an increase in body weight and intra-abdominal fat in comparison with C was observed. When the 3% treatment with HSL was implemented, body weight the rats decreased. This effect could be due to a decrease in lipogenesis because of the hibiscus acid or +/- hydroxycitrate (+/-HCA), because some authors have indicated that this acid could be transformed by the intestinal flora in -/-HCA. This compound has the capacity to inhibit, by competition, the extramitochondrial enzyme ATP-citrate-lyase [26], which catalyses the breaking-up of citrate to obtain oxaloacetate and acetyl-CoA, this being the most important step for the synthesis of fatty acids. Likewise, +/-HCA inhibits the formation of malonyl-CoA, which stimulates the activity of carnitine transferase, resulting in the diminution of lipogenesis and the increase in the lipid oxidation and/or in glucogenogenesis [27]. It has been demonstrated in rodents, that the oral administration of -/-HCA suppresses the intake of food and reduces weight gain when the rats are fed high-carbohydrate diets [28]. It has also been shown that +/-HCA is an inhibitor of the α -amilase [29] and the α -glucosidase, particularly the latter. This enzyme takes care of the degradation of oligosaccharides to monosaccharides before they are absorbed. When this enzyme is inhibited, the absorption of glucose decreases and, consequently, the postprandial levels of glucose [30], thus decreasing the generation of AcetylCoA, the main substrate for the synthesis of fatty acids.

Another study has shown that the aqueous extract of HSL is capable of inhibiting the differentiation of adipocytes in vitro by blocking the release of the transcription factors necessary for this process, without affecting the viability of the cells. The authors conclude that the aqueous extract of HSL inhibits the accumulation of lipids in 46.6% of adipocytes [31].

Regarding these effects, the MS rats had a significant increase in serum triglycerides, which decreased in the MS groups when treated with HSL at 0.75% and 1.5%. The decrease in serum triglycerides could be explained by the amount of soluble fiber present in the calices of the plant HSL. It has been estimated that each 250 ml. of HSL infusion contains 166 mg of fiber [20], which causes high viscosity solutions in the small intestine, thereby affecting the entero-hepatic recirculation of bile acids and diminishing the lipid absorption, since it limits the disponibility of these lip-

ids for the intestinal epithelium cells [32]. On the other hand, as already mentioned, the *-HCA* decreases lipogenesis either by reduction of the ingestion, affecting the absorption of glucose, and/or by enzymatic blockade. It should be mentioned that the treatment with HSL in MS rats also decreased the serum level of cholesterol; this could be explained by the presence of phytosterols, associated to the soluble fiber, such as ergosterol and β -cytosterol that inhibit the absorption of cholesterol by the enterocytes [20].

Insulin Resistance

In spite of finding no hyperglycemia in MS animals, the HOMA index is increased. This index allows us to evaluate the insulin resistance, by means of the concentrations of plasma glucose and insulin. When the HOMA index is below 2.5 it is considered as normal, when it is $>2.5-3$, it indicates deterioration of the sensitivity to insulin, and if it is >3 there is insulin resistance. With the treatment of HSL infusion there was a decrease in the HOMA index. This effect may be due to the presence of cyanidine-3-glucoside which is capable of decreasing the expression of pro-inflammatory adipocytokines MCP1 and TNF α , allowing the expression of the transporter GLUT4 in the white adipose tissue. This facilitates the transport of glucose to the interior of adipocytes, reducing the serum concentration of the protein RBP4 and decreasing the activity of the enzyme glucose-6-phosphatase, therefore increasing the consumption of glucose by signaling of insulin in the skeletal muscle [33].

In the liver, gluconeogenesis is suppressed, increasing the sensitivity to insulin and causing decrease of both serum glucose and oxidative stress [33]. Our results show that the HOMA index in the animals treated with the infusion of 3% HSL was <2.5 , suggesting that the biological answer of insulin in the tissues is normal. This, added to a tendency of the glucose concentration to decrease, could explain the decrease in the serum AGEs and the specific receptors, thus protecting the cellular components from damage by oxidation; this effect has been described by other authors, who conclude that it can be due to the presence of the polyphenol epigallocatechine-3-O-gallate [9, 34].

Antioxidant Enzymes

On the other hand, the antioxidant capacity given by the enzymes CAT, Cu-Zn SOD and peroxidases decreased, while the activity of the Mn-SOD did not change, and the activity of GPX increased in MS rats. Nevertheless, when giving the treatment with HSL to MS rats, the activity of the enzymes CAT, Mn-SOD, and Cu-Zn SOD increased. Other investigations observed that the treatment with HSL extracts increased the activity of the enzymes CAT and SOD, and increased the antioxidant capacity of the liver. In this way, they avoided the production of ROS as well as their adverse effects, such as the expression of the transcription factors Bax, tBib and pJNK [35], which decrease hepato-cellular apoptosis induced by ROS with the consequent fibrosis, by activation of the hepatic stellate cells [36]. The activity of peroxidases increased in all the treated groups, thus reducing the production of ROS, since the peroxidases are able to eliminate H₂O₂ by means of a reaction similar to that of catalase [37].

The activity of the enzyme GPX decreased in all the groups treated with HSL, which would probably reduce the utilization of GHS, increasing its concentration and saving NADPH in the liver of MS rats. To reduce again the oxidized glutathione, the enzyme glutathione reductase requires NADPH as a cofactor [38]. The saving of NADPH could decrease the cellular energetic expenditure since the reducing equivalent is produced in the collateral pathway of the phosphate-pentoses. This alternative oxidation of glucose does not generate ATP, since its purpose is to provide ribose-5-phosphate and NADPH used for the synthesis of fatty acids and steroids or, as already mentioned, to work as a cofactor for glutathione reductase [38]. The treatment with the extract of HSL increases the concentration of cellular GHS [34-35, 39-40], which is the major soluble antioxidant in the cytosol, nucleus and mitochondria, since it has the capacity to trap the HO (hydroxyl) and O₂⁻, as well as regenerating vitamins E and C to their active form [41-42]. This possible increase in the concentration of GHS could partly explain the elevation in the antioxidant capacity of the non-enzymatic system observed in the MS animals with treatment of HSL, at all concentrations.

Oxidation Markers

It is relevant to point out that the joint diminution both in the peroxidation index and hepatic carbonylation as well as in the serum glycation observed in the animals treated with HSL is probably due to the synergic action of the polyphenols present in the infusion and the antioxidant systems both enzymatic and non-enzymatic.

CONCLUSION

The infusion of HSL calyces has antioxidant properties that allow the increase in antioxidant capacity of both systems, enzymatic and non-enzymatic, in the liver of the MS animals, in this way decreasing the lipid peroxidation, carbonylation in the liver and advanced serum glycation, and thus protecting the MS rats from oxidation damages.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have no personal or financial conflict of interest in relation to the present study.

ACKNOWLEDGEMENTS

The present study was supported by the Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez and the Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. All authors participated in the conception, design, conduction, interpretation of the data and approved the final manuscript. Our thanks to Marco Antonio Rosas Ortega for technical support in the animal care.

ABBREVIATIONS

ACE	=	Angiotensin converting enzyme
AGEs	=	Advanced glycation end products
ATP	=	Adenosine triphosphate
BHT	=	Butyl hydroxytoluene

C	=	Control
Cu-Zn	=	Copper-zinc
DNP	=	2, 4-dinitrophenylhydrazine
eNOS	=	Endothelial nitric oxide sintase
FRAP	=	Ferric reducing antioxidant power
GIIS	=	Reduced glutathione
GPX	=	Glutathione peroxidase
HCA	=	Hibiscus acid
HCl	=	Chlorhydric acid
HSL	=	<i>Hibiscus Sabdariffa L.</i>
KCL	=	Chlorure potassium
KH ₂ PO ₄	=	Monobasic phosphate
MCPI	=	Monocyte chemoattractant protein-1
Mn	=	Manganese
MS	=	Metabolic syndrome
NADPH	=	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NAFL	=	Non-alcoholic fatty liver
NBT	=	Nitro blue tetrazolium
NO	=	Nitric oxide
NOO ⁻	=	Peroxonitrite
O ₂ ⁻	=	Superoxide anion
ROS	=	Reactive oxygen species
SBP	=	Systolic blood pressure
SOD	=	Superoxide dismutase
TNF α	=	Tumor necrosis factor- α

REFERENCES

- [1] Grundy, S.M. Metabolic syndrome pandemic. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Bio.*, **2008**, *28*(4), 629-636.
- [2] Nseir, W.; Nassar, F.; Assy, N. Soft drinks consumption and nonalcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.*, **2010**, *16*(21), 2579-2588.
- [3] Patton, H.M.; Yates, K.; Unalp-Arida, A.; Behling, C.A.; Huang, T.T.; Rosenthal, P.; Sanyal, A.J.; Schwimmer, J.B.; Lavine, J.E. Association between metabolic syndrome and liver histology among children with nonalcoholic fatty liver disease. *Am. J. Gastroenterol.*, **2010**, *105*(9), 2093-2102.
- [4] Ruiz-Ramírez, A.; Chávez-Salgado, M.; Peñeda-Flores, J.A.; Zapata, E.; Masso, F.; El-Hafidi, M. High-sucrose diet increases ROS generation, FFA accumulation, UCP2 level, and proton leak in liver mitochondria. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **2011**, *301*(6), E1198-E1207.
- [5] Baños, G.; Medina-Campos, O.N.; Maldonado, P.D.; Zamora, J.; Pérez, I.; Pavón, N.; Pedraza-Chaverri, J. Antioxidant enzymes in hypertensive and hypertriglyceridemic rats: effect of gender. *Clin. Exp. Hypertens.*, **2005**, *27*(1), 45-57.
- [6] Ford, E.S.; Mokdad, A.H.; Giles, W.H.; Brown, D.W. The metabolic syndrome and antioxidant concentrations: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Diabetes*, **2003**, *52*(9), 2346-2352.
- [7] Farombi, E.O.; Fakoya, A. Free radical scavenging and antigenotoxic activities of natural phenolic compounds in dried flowers of *Hibiscus sabdariffa L.* *Mol. Nutr. Food Res.*, **2005**, *49*(12), 1120-1128.
- [8] Peng, C.H.; Chyau, C.C.; Chan, K.C.; Chan, T.H.; Wang, C.J.; Huang, C.N. Hibiscus sabdariffa polyphenolic extract inhibits hyperglycemia, hyperlipidemia, and glycation-oxidative stress while improving insulin resistance. *J. Agric. Food Chem.*, **2011**, *59*(18), 9901-9909.
- [9] Wang, S.C.; Lee, S.F.; Wang, C.J.; Lee, C.H.; Lee, W.C.; Lee, H.J. Aqueous Extract from *Hibiscus sabdariffa* Linnaeus Ameliorate Diabetic Nephropathy via Regulating Oxidative Status and Akt/Bad/14-3-3 γ in an Experimental Animal Model. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.*, **2011**, *2011*, 938126-938135.
- [10] Benzie, I.F.; Strain, J.J. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol.*, **1999**, *299*, 15-27.
- [11] Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **1951**, *193*(1), 265-275.
- [12] Matthews, D.R.; Hosker, J.P.; Rudenski, A.S.; Naylor, B.A.; Treacher, D.F.; Turner, R.C. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*, **1985**, *28*, 412-419.
- [13] Rubio-Ruiz, M.A.; Diaz-Diaz, E.; Cárdenas-León, M.; Argüelles-Medina, R.; Sánchez-Canales, P.; Larrea-Gallo, F.; Soria-Castro E.; Guarner-Lans, V. Glycation does not modify bovine serum albumin (BSA)-induced reduction of rat aortic relaxation: The response to glycated and nonglycated BSA is lost in metabolic syndrome. *Glycobiology*, **2008**, *18*(7), 517-525.
- [14] Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **1970**, *227*(5259), 680-685.
- [15] Pérez-Torres, I.; Roque, P.; El Hafidi, M.; Diaz-Diaz, E.; Baños, G. Association of renal damage and oxidative stress in a rat model of metabolic syndrome. Influence of gender. *Free. Radic. Res.*, **2009**, *43*(8), 761-771.
- [16] Abrams, J.J.; Webster, D.A. Purification, partial characterization, and possible role of catalase in the bacterium *Vitreoscilla*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1990**, *279*(1), 54-59.
- [17] Flohé, L.; Günzler, W.A. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.*, **1984**, *105*, 114-121.
- [18] Pérez T.I.; El Hafidi M.; Zamora-González J.; Infante O.; Chavira R.; Baños G. Modulation of aortic vascular reactivity by sex hormones in a male rat model of metabolic syndrome. *Life Sci.*, **2007**, *80*, 2170-2180.
- [19] Reznick, A.Z.; Packer, L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.*, **1994**, *233*, 357-363.
- [20] Sáyago-Ayerdi, S.G.; Arranz, S.; Serrano, J.; Goñi, I. Dietary fiber content and associated antioxidant compounds in Roselle flower (*Hibiscus sabdariffa L.*) beverage. *J. Agric. Food Chem.*, **2007**, *55*(19), 7886-7890.
- [21] Touyz, R.M. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension*, **2004**, *44*(3), 248-252.
- [22] Cai, H.; Harrison, D.G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ. Res.*, **2000**, *87*(10), 840-844.
- [23] Herrera-Arellano, A.; Miranda-Sánchez, J.; Avila-Castro, P.; Herrera-Alvarez, S.; Jiménez-Ferrer, J.E.; Zamilpa, A.; Román-Ramos, R.; Ponce-Monter, H.; Tortoriello, J. Clinical effects produced by a standardized herbal medicinal product of *Hibiscus sabdariffa* on patients with hypertension. A randomized, double-blind, lisinopril-controlled clinical trial. *Planta Med.*, **2007**, *73*(1), 6-12.
- [24] Ojeda, D.; Jiménez-Ferrer, E.; Zamilpa, A.; Herrera-Arellano, A.; Tortoriello, J.; Alvarez, L. Inhibition of angiotensin convertin enzyme (ACE) activity by the anthocyanins delphinidin- and cyanidin-3-O-sambubiosides from *Hibiscus sabdariffa*. *J. Ethnopharmacol.*, **2010**, *127*(1), 7-10.
- [25] Ajay, M.; Chai, H.J.; Mustafa, A.M.; Gilani, A.H.; Mustafa, M.R. Mechanisms of the anti-hypertensive effect of *Hibiscus sabdariffa L.* calyces. *J. Ethnopharmacol.*, **2007**, *109*(3), 388-393.
- [26] Carvajal-Zarrabal, O.; Hayward-Jones, P.M.; Orta-Flores, Z.; Nolasco-Hipólito, C.; Barradas-Dermitt, D. M.; Aguilar-Uscanga, M.G.; Pedroza-Hernández, M.F. Effect of *Hibiscus sabdariffa L.* dried calyx ethanol extract on fat absorption-excretion, and body

- weight implication in rats. *J. Biomed. Biotechnol.*, **2009**, *2009*, 394592-394597.
- [27] Kovacs, E.M.; Westerterp-Plantenga, M.S.; de Vries, M.; Brouns, F.; Saris, W.H. Effects of 2-week ingestion of (-)-hydroxycitrate and (-)-hydroxycitrate combined with medium-chain triglycerides on satiety and food intake. *Physiol. Behav.*, **2001**, *74*(4-5), 543-549.
- [28] Leonhardt, M.; Langhans, W. Hydroxycitrate has long-term effects on feeding behavior, body weight regain and metabolism after body weight loss in male rats. *J. Nutr.*, **2002**, *132*(7), 1977-1982.
- [29] Hansawasdi, C.; Kawabata, J.; Kasai, T. Alpha-amylase inhibitors from roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) tea. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2000**, *64*(5), 1041-1043.
- [30] Hansawasdi, C.; Kawabata, J.; Kasai, T. Hibiscus acid as an inhibitor of starch digestion in the Caco-2 cell model system. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2001**, *65*(9), 2087-2089.
- [31] Kim, J.K.; So, H.; Youn, M.J.; Kim, H.J.; Kim, Y.; Park, C.; Kim, S.J.; Ha, Y.A.; Chai, K.Y.; Kim, S.M.; Kim, K.Y.; Park, R. Hibiscus sabdariffa L. water extract inhibits the adipocyte differentiation through the PI3-K and MAPK pathway. *J. Ethnopharmacol.*, **2007**, *119*(2), 260-267.
- [32] Kristensen, M.; Jensen, M.G.; Aarestrup, J.; Petersen, K.E.; Sondergaard, L.; Mikkelsen, M.S.; Astrup, A. Flaxseed dietary fibers lower cholesterol and increase fecal fat excretion, but magnitude of effect depend on food type. *Nutr. Metab.*, **2012**, *9*, 8-16.
- [33] Sasaki, R.; Nishimura, N.; Hoshino, H.; Ito, Y.; Kadowaki, M.; Ichi, T.; Tamaki, A.; Nishimura, S.; Fukuda, I.; Ashida, H.; Hori, F.; Tsuda, T. Cyanidin 3-glucoside ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity due to downregulation of retinol binding protein 4 expression in diabetic mice. *Biochem. Pharmacol.*, **2007**, *74*(11), 1619-1627.
- [34] Yamabe, N.; Yokozawa, T.; Oya, T.; Kim, M. Therapeutic potential of (-)-epigallocatechin 3-O-gallate on renal damage in diabetic nephropathy model rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2006**, *319*(1), 228-236.
- [35] Liu, L.C.; Wang, C.J.; Lee, C.C.; Su, S.C.; Chen, H.L.; Hsu, J.D.; Lee, H.J. Aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* L. decelerates acetaminophen-induced acute liver damage by reducing cell death and oxidative stress in mouse experimental models. *J. Sci. Food Agric.*, **2010**, *90*(2), 329-337.
- [36] Liu, J.Y.; Chen, C.C.; Wang, W.H.; Hsu, J.D.; Yang, M.Y.; Wang, C.J. The protective effects of *Hibiscus sabdariffa* extract on CCl₄-induced liver fibrosis in rats. *Food Chem. Toxicol.*, **2006**, *44*(3), 336-343.
- [37] Mayes, P.A. Oxidacion Biologica. In: *Bioquímica de Harper*; Murray, R.K., Mayes, P.A., Granner, D.K., Rodwell, V.W., Eds; Mexico, **1997**, pp. 143-150.
- [38] Mayes, P.A. Via de la pentosa fosfato y otras vias del metabolismo de las hexosas. In: *Bioquímica de Harper*; Murray, R.K., Mayes, P.A., Granner, D.K., Rodwell, V.W., Eds; Mexico, **1997**, pp. 245-256.
- [39] Ali, B.H.; Mousa, H.M.; El-Mougy, S. The effect of a water extract and anthocyanins of *hibiscus sabdariffa* L. on paracetamol-induced hepatotoxicity in rats. *Phytother. Rev.*, **2003**, *17*(1), 56-59.
- [40] Wang, C. J.; Wang, J.M.; Lin, W.L.; Chu, C.Y.; Chou, F.P.; Tseng, T.H. Protective effect of *Hibiscus* anthocyanins against tert-butyl hydroperoxide-induced hepatic toxicity in rats. *Food Chem. Toxicol.*, **2000**, *38*(5), 411-416.
- [41] Chaudière, J.; Ferrari-Iliou, R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food Chem. Toxicol.*, **1999**, *37*(9-10), 949-962.
- [42] Powers, S.K.; Lennon, S.L. Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc. Nutr. Soc.*, **1999**, *58*(4), 1025-1033.

Received: March 15, 2013

Revised: May 01, 2013

Accepted: May 07, 2013

The Efficacy of Pregabalin in the Treatment of Prediabetic Neuropathic Pain

Alejandra González-Duarte, MD, PhD,* Mónica Lem, MD,*
Eulises Díaz-Díaz, PhD,† Cinthia Castillo, MD,* and Karla Cárdenas-Soto, MD*

Objective: We report the results of a pilot, enrichment-design, placebo-controlled crossover trial of pregabalin for the treatment of prediabetic small-fiber neuropathic pain.

Methods: Individuals with impaired fasting glucose or impaired glucose tolerance and neuropathic pain were evaluated according to UTAH Early Neuropathy Scale (UENS), Quantitative Sensory Testing, and intraepidermal nerve fiber density (IENFD). Symptoms were graded according to the Numeric Rating Scale (NRS). Individuals who responded to the administration of placebo were not eligible. Pregabalin was initiated at a dose of 75 mg qid and tapered up to 300 mg bid. Only individuals with a reduction of pain scores $\geq 30\%$ were eligible to continue with the double-blind phase, which consisted of a randomized crossover period of 1 month of pregabalin and 1 month of placebo, with 7 days of washout between periods.

Results: Forty-five participants were enrolled in the study. There was 36% reduction in the NRS from baseline after 1 month of single-blind pregabalin (NRS = 5.1 ± 2.6). Twenty-six participants were eligible for the double-blind phase. There was further reduction of pain in the double-blind pregabalin and the placebo groups, but the pregabalin group had a statistically significant reduction of pain (NRS = 3.2 ± 2.2 vs. 4.0 ± 2 ; $P < 0.05$). Participants who did not respond showed a lower IENFD than those who responded, suggesting more severe nerve damage.

Conclusions: This pilot study showed improvement of prediabetic neuropathic pain. Participants with higher pain scores at baseline had higher UENS scores and a lower IENFD. Limitations of the study include the small number of participants and the carry-over effect.

Key Words: prediabetes, small fiber neuropathy, impaired glucose tolerance, impaired fasting glucose

(*Clin J Pain* 2016;32:927–932)

Received for publication June 26, 2015; revised February 1, 2016; accepted December 5, 2015.

From the Departments of *Neurology, and †Reproductive Biology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Mexico City, Mexico.

A.G.-D. wrote the grant proposal, was the PI of the study, analyzed the results, and wrote the manuscript. M.L., C.C., and K.C.-S. were the coordinators of the study and contributed to the collection and the elaboration of the manuscript. E.D.-D. processed the laboratory samples for obtaining the AGEs and contributed to the elaboration of the manuscript.

Supported by a grant obtained from an Investigator Initiative Research funded by Pfizer Inc, Nueva York, NY. A.G.-D. has contributed to Pfizer and Alynham as an amyloidosis expert speaker and as a part of advisory boards. The remaining authors declare no conflict of interest.

Reprints: Alejandra González-Duarte, MD, PhD, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Neurology Department, Vasco de Quiroga 15, Sección XVI, Tlalpan, CP 14000, México D.F. (e-mail: gonzalezduarte@aoL.com).

Copyright © 2016 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.
DOI: 10.1097/AJP.0000000000000339

BACKGROUND

Prediabetes, defined as either impaired fasting glucose (IFG) or impaired glucose tolerance (IGT), is a milder form of glucose dysmetabolism that precedes diabetes mellitus.^{1,2}

Prediabetes may be the cause of neuropathy in 36%,³ 42%,^{4,5} or up to 56%⁶ of the patients with neuropathy of undetermined etiology. In individuals with prediabetes, neuropathic pain is noticed in 4.2% to 8.7% of the cases.^{7–11} Neuropathy associated with prediabetes is clinically similar to early diabetic neuropathy due to injury of small-diameter unmyelinated or lightly myelinated nociceptive and autonomic fibers¹²; numbness, burning pain, and paresthesias in the feet are common complaints, although abnormalities are relatively mild and consist of selective length-dependent loss of small-fiber modalities, such as pinprick and temperature loss, without significant signs of large-fiber dysfunction.^{13–15}

Should individuals with prediabetes be managed any differently than individuals with other causes of peripheral neuropathy?^{16–20} Pregabalin is one of the multiple available effective medications for neuropathic pain,^{21,22} but there is no evidence that pregabalin can treat pain associated with small-fiber damage or dysfunction in prediabetic patients.

We used a previously described enrichment strategy to assess and compare the efficacy of pregabalin in individuals with prediabetic painful small-fiber neuropathy, using a single-blind and double-blind crossover study.²³ In addition to the classic fasting and 2-hour glucose levels, we also used novel techniques to quantify the endproducts of non-enzymatic glycation simultaneously.^{24–27}

METHODS

Study Design

This study consisted of an enriched prospective single-blind phase followed by a double-blind crossover phase, similar to other previously described studies.²⁸ Such a strategy has already been proved useful at confirming responses to neuropathic pain agents with small sample sizes, short treatment duration phases, and low baseline pain scores²³ (Fig. 1). Enrichment phase, period A, was designed to lower the placebo response rate by excluding individuals who responded to placebo. Identical 75 mg placebo capsules were administered bid for 1 week. The maximum pain score of each day was recorded every night, averaged at the end of the week, and compared with the baseline score of each participant. Individuals with a pain score response $\geq 30\%$ with placebo were excluded from the study. Enrichment phase, period B, was designed to correctly identify individuals who responded to pregabalin since the beginning of the study. Pregabalin was titrated to a maximum tolerable dose over 1 week (maximum 300 mg

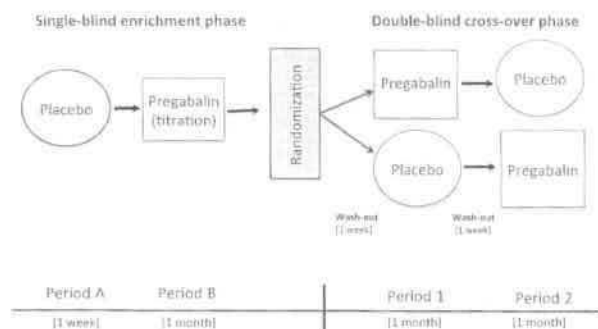


FIGURE 1. Study design flow chart.

bid). Participants received the same dose for the following 2 weeks. On the fourth week, the dose was titrated down to zero. Pain scores were recorded every night, but only the scores obtained during the 2 weeks when the participant received the maximum tolerated dose were averaged and compared with baseline scores. Participants who met the criteria for periods A (placebo response of pain scores < 30%) and B (reduction of pain scores \geq 30%) were eligible to continue to the double-blind crossover phase. The Double-blind Crossover Phase consisted of randomizing participants into pregabalin at the period A dose or placebo for two 4-week double-blind crossover treatment periods, each preceded by a 1-week washout. Each 4-week treatment period consisted of a 1-week titration up phase, 2-week maintenance, and a 1-week titration down phase. Pregabalin titration was performed as fast as possible to shorten the duration of the study, as we expected that the dropout rates could increase if the study was very long. Participants then crossed over to the active/placebo arm for the second 4-week treatment period. Participants were provided with acetaminophen tablets (500mg) for breakthrough pain. Acetaminophen was chosen as a breakthrough pain control due to its safe profile and rare side effects.²⁹ Opioids were proscribed, given their potential to cause dizziness, which could confound the results. If participants displayed uncontrolled moderate or severe pain even after the use of paracetamol, they were eliminated from the study. The study duration was 24 months overall and 15 weeks for each participant.

Prediabetes Evaluation

Prediabetes was diagnosed using the American Diabetes diagnostic criteria³⁰; IFG was diagnosed if the serum glucose was between 100 and 125mg/dL after a 12-hour overnight fast. IGT was defined as a serum glucose between 140 and 199 mg/dL 2 hours after a 75-mg dextrose load in an oral glucose tolerance test. The measurement of advanced glycation endproducts derived from glucose (AGEs), as markers of long-term glycemic control, was performed in the serum of participants after 12-hour fasting at the entry visit using RIA and ELISA techniques developed recently at our institution, already used in previous studies of metabolic complications during metabolic syndrome.²⁵⁻²⁷ The method of RIA measures glycosylated proteins intact, whereas ELISA measures total AGEs, glycosylated proteins intact, and its degradative products such as glycosylated peptides and adduct AGEs. For calibrating assays, standard curves were prepared from a standard solution of glycosylated BSA at a concentration of 1 mg/mL, synthesized in

our laboratory (fluorescence units [370/440nm] per milliliter of the solution of AGE-BSA standard).

Neuropathy Evaluation

Participants were clinically defined as having neuropathic pain if neuropathic symptoms were present: symptoms consisted of burning pain, numbness, or paresthesias developing symmetrically in the feet with distal-to-proximal progression. The Utah Early Neuropathy Scale (UENS) was used as a measurement of early sensory predominant neuropathy.²⁸ The UENS was performed at the initial visit for all participants. Quantitative Sensory Testing (QST) for temperature (in Celsius) and vibration thresholds (Vibration Units) was performed with a TSA-II neurosensory analyzer (Medoc), using the method of limits for each variable.^{31,32} Autonomic-mediated cutaneous sweat production in response to iontophoresed acetylcholine (QSART), expressed in microliters, was performed using a QSWEAT machine (WR Medical) with a standardized protocol.^{31,32} The nerve fiber density was assessed by 3-mm skin-punch biopsies 5 cm from the ankle, cut in 50- μ m-thick sections, stained for the pan-axonal marker PGP 9.5, and examined microscopically in a blinded manner to calculate the intraepidermal nerve fiber density (IENFD) according to standardized counting criteria.^{32,33} For all study participants, common alternative causes of neuropathy were excluded by vitamin B₁₂, TSH, antinuclear antibodies, and serum electrophoresis and immunofixation screening.³⁻⁵ Potential participants with a family history of neuropathy, independent of diabetes or with a disease known to be associated with neuropathy, such as hepatitis C, systemic lupus erythematosus, or Sjögren disease, were excluded.

Pain Evaluation

The Numeric Rating Scale (NRS) for pain is an 11-point numerical pain scale (0 = no pain, 10 = pain as bad as you can imagine) that assesses pain before going to bed.³⁴⁻³⁶ Participants rated their pain according to the instruction, "Please enter your pain by circling the number below that best describes your pain, on average, in the last 24 hours." The Patient Global Impression of Change Score (PGICs) is a 7-point scale that evaluates the impression of changes in pain (1 = very much better to 7 = very much worse); it was used to evaluate the perceived improvements in the NRS.³⁷ As a secondary endpoint, Daily Sleep Interference (DSI) was assessed by the patient on an 11-point ranking scale, where 0 = pain did not interfere with sleep to 10 = pain completely interfered with sleep.

Statistical Analysis

The main outcome was the mean score for pain while taking the maximal tolerated dose of pregabalin. The number of participants to treat was calculated on the basis of previous estimates of variance, where 40 participants were required to provide the study with 80% power to detect (with a 2-sided α of 0.05) a mean difference in pain intensity \geq 30% in the average scores at week 4 in each period.²³ On the basis of previous dropout rates of approximately 10%,³⁸ we calculated that if 44 patients were enrolled, 40 would complete all treatment periods. Patients who completed at least 2 treatment periods were included in the efficacy analysis. Patients who received at least 1 dose of the study medication were included in the analysis of adverse effects. Data were summarized descriptively and modeled using appropriate statistical methodology.

Institutional Review Board

The Ethics and the Investigation Boards of our Institution approved the study and the written informed consent form. All the patients signed the Informed Consent. Documents are protected in our archives.

RESULTS

Demographics

Of the 45 participants enrolled, 34 (75%) were women. Their mean age was 54 years (range, 33 to 85 y). Thirty-four participants had IFG (a mean fasting glucose of 117.8 ± 10.5 mg/dL) and 11 had OGI (a mean 2-h glucose of 174.1 ± 18.6 mg/dL). All participants had neuropathic bilateral pain in the feet, prediabetes, and abnormal abnormal UENS examination (mean 9.3 ± 3.4 points) corroborating definite neuropathic pain according to the revised definition of neuropathic pain.³⁹ In addition, the mean QST threshold was 39.5°C (35 to 50°C) for warm sensation, 6.18°C (1 to 32°C) for cold sensation, and 10.1 U (1 to 69 U) for vibration, all of which are abnormal according to our control group. QSART was very impaired in all participants, with a mean sweat volume of 0.27 mL (0 to 1 mL). The mean nerve fiber density was 7.1 nerve fibers per mm (± 4.7 nerve fibers per mm).

There were no differences between participants with IFG and IGT. Two participants (4.4%) were placebo responders, and 7 participants (15%) were pregabalin non-responders. Ten participants were further excluded from the study (Fig. 2). Twenty-six participants were eligible for the cross-over trial: 10 began in the group of pregabalin followed by placebo and 16 began with placebo followed by pregabalin. Thirty percent of the participants used acetaminophen as an occasional breakthrough analgesic throughout the trial. Participants were instructed to rate pain before the use of acetaminophen to avoid modifications when rating the degree of pain.

The NRS of Pain

The mean NRS of pain at entry was 8.2 ± 1 ; after 1 week of single-blind placebo, it was 7.9 ± 1 . NPS was 36%

below baseline after 1 month of single-blind pregabalin, with a NRS reduction to 5.1 ± 2.2 . Twenty-six participants (57%) were eligible for the double-blind phase. Pain was further reduced in the double-blind pregabalin and the double-blind placebo groups (3.2, vs. 4.0, $P = 0.000$) (Fig. 3A). Although both groups had considerably reduced pain, the difference was statistically significant between the pregabalin and the placebo phases (-0.71 , -1.0 to 0.36 , $P = 0.000$).

DSI Scores

At entry, 11 (17.2%) participants had a DSI score of 1 (sleep well and had no pain), 28 (43%) gave a score of 2 (sleep almost all night, but wake up with pain), and 6 (9.3%) gave a score of 3 (sleep really poorly because of the pain). There were no statistically significant changes with placebo. Grades improved significantly after single-blind pregabalin: 19 (30%) participants graded sleep interference as 1, 16 (25%) achieved a grade of 2, and only 1 (1%) gave a score of 3 ($P = 0.045$). This response was maintained through the trial (Fig. 3B).

Global Impression of Change

PGIC scores of improvement (1 to 3) were achieved in 8 participants (12%) in the single-blind placebo, 26 (41%) in the single-blind pregabalin, 23 (36%) in the double-blind pregabalin, and 20 (31%) in the double-blind placebo phases. Unchanged scores were achieved in 20 participants (46%) in the single-blind placebo, 8 (12%) in the single-blind pregabalin, 5 (8%) in the double-blind pregabalin, and 6 (9%) in the double-blind placebo phases (Fig. 3C). Worsening was achieved in 5 participants (15%) in the single-blind placebo, 2 (6.4%) in the single-blind pregabalin, 1 (4%) in the double-blind placebo, and none in the double-blind pregabalin phases.

Risk Factors

Participants with lower pain scores ($\text{NRS} \leq 5$) in the double-blind pregabalin phase had statistically significantly higher IENFD levels (7.8 ± 5.1 vs. 5.2 ± 2.4 fibers/mm;

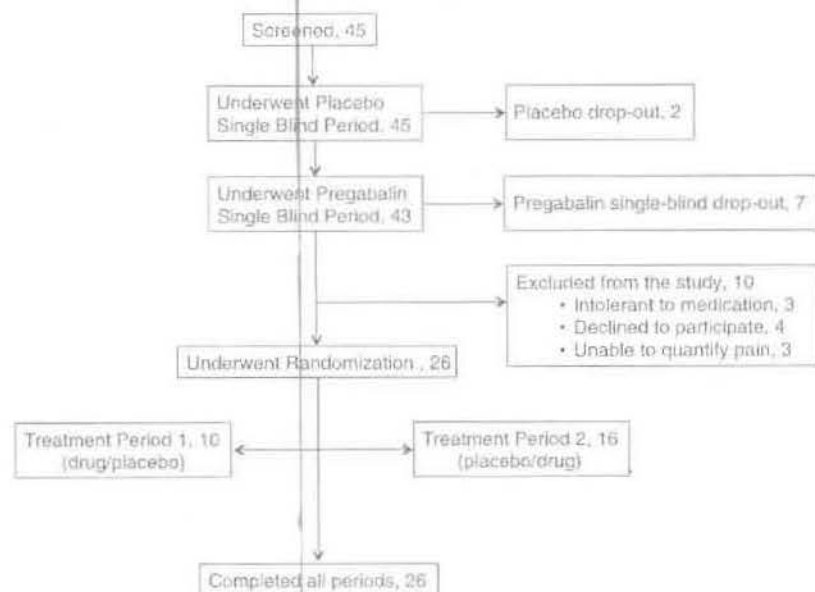


FIGURE 2. Study flow chart.

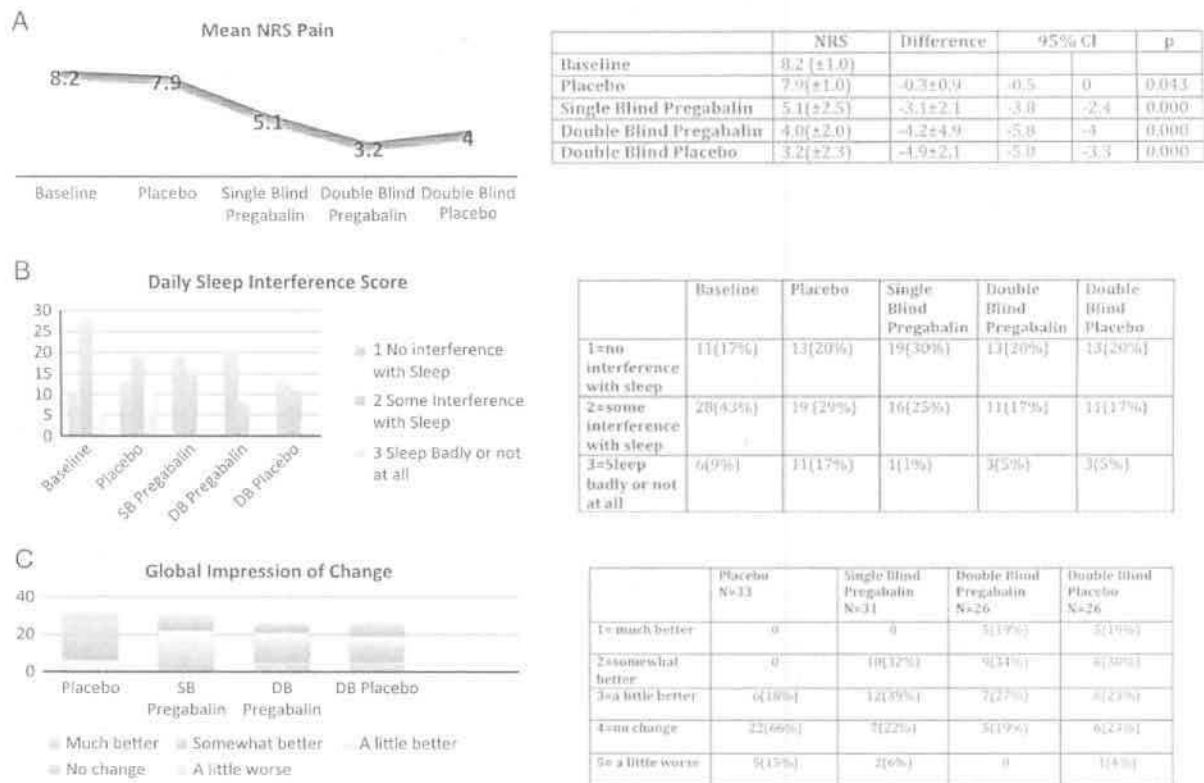


FIGURE 3. A, Mean Numeric Rating Scale (NRS) Pain. B, Daily Sleep Interference Score. C, Global Impression of Change.

$P = 0.01$). They also had lower fasting glucose levels (116 ± 16 vs. 123 ± 15 mg/dL), body mass index (BMI) (30 ± 5.6 vs. 33 ± 9.4), vibration thresholds (10.4 vs. 12.9 VU), and UENS scores (7.7 vs. 9.0 points); however, these indicators did not reach statistical significance.

The Pregabalin Dosage

Maximum tolerated doses of pregabalin were 75 mg/d in 7 participants, 75 mg/bid in 12 participants, 150 mg/bid in 11 participants, and 300 mg/bid in 15 participants. The only side effect was dizziness, which impaired 4 participants from increasing pregabalin above 75 mg/d, and 3 participants discontinued the study. There was 1 nonserious, possibly related adverse event consisting of a fall and fracture of the metatarsal bones while running down the stairs at night.

AGEs

In addition to measuring fasting serum glucose levels, we used 2 innovative measurements to determine the serum levels of AGEs, performed simultaneously with the measurement of fasting glucose. Higher levels of AGEs were found in participants with abnormal IENFD (RIA: 1671 vs. 555 μ U/mL, $P = 0.04$; ELISA: 1438 vs. 558 mU/mL, $P = NS$).

DISCUSSION

Our results in this small pilot study showed that pregabalin might prove to be useful for the treatment of pre-diabetic small-fiber neuropathic pain, pending results from larger studies. The PGICs showed improvement in 41% of the participants in the single-blind pregabalin phase and in 36%

in the double-blind pregabalin phase. DSIs scores were also better in the single-blind and the double-blind pregabalin phases. It is possible that the better quality of sleep accounts for the significant PGIC improvement. Results are similar to those obtained in painful diabetic neuropathy.^{21,22,40}

Interestingly, participants with higher pain scores at entry (NRS of 9 or 10) had a higher BMI (31 ± 9.2 vs. 29 ± 4 ; $P = 0.00$), lower IENFD scores (5.8 ± 2.9 vs. 7.8 ± 5.3 nerve fibers per mm; $P = 0.02$), and higher vibration thresholds in the QST (12.2 ± 16.3 vs. 5.28 ± 3.9 VU; $P = 0.01$). Fasting and 2-hour serum glucose levels were similar between higher and lower baseline pain scores, as were the diagnoses of IGT and IFG. Even though some population-based studies suggest a gradient for the prevalence of neuropathy, where it may be the highest in participants with manifest diabetes mellitus, followed by individuals with IGT, and the least in those with IFG,⁴¹ in our study, pain-intensity scores and pain control were similar in participants with IGT or IFG.

For this study, we used the enrichment crossover study design described by Ho et al.²³ The main advantage of the ESCD is the effective evaluation of participants with pain who did not respond to placebo and responded successfully to the active treatment before continuing to the next phase. In the second phase, the participants were compared with their own scores in a double-blind phase. The influence of confounding covariates was avoided when each patient served as his or her own control. As in other enrichment crossover studies, determining the criteria for treatment response during the enrichment phase was a major issue of this design. The standard definition of a clinically important improvement in

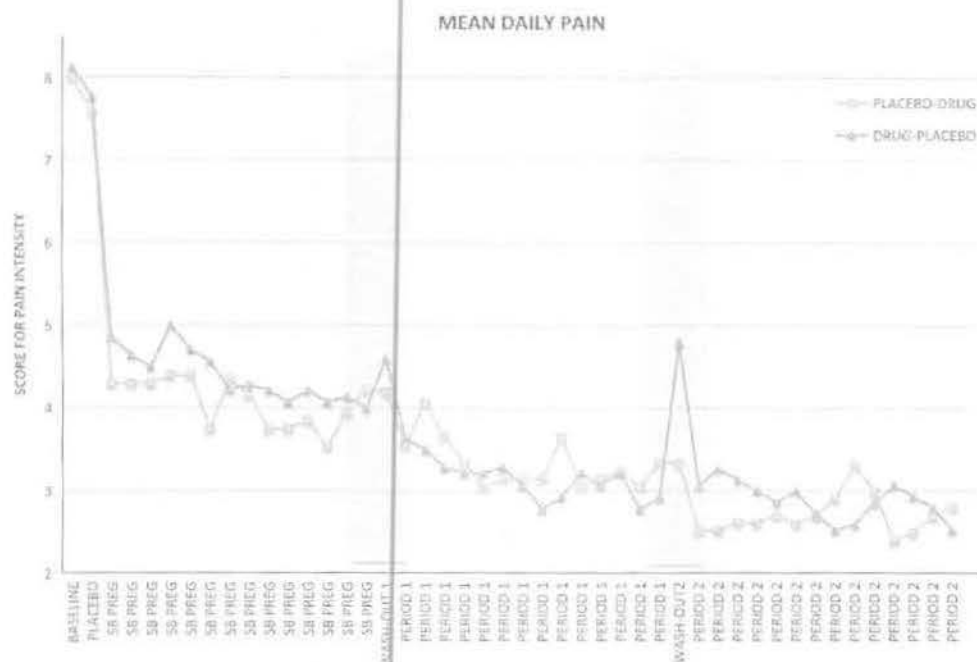


FIGURE 4. The mean daily pain score graded by the Numeric Rating Scale through the trial.

clinical trials of pain therapies using the 11-point numerical pain rating scale has been defined as clinically important when a reduction of approximately 2 points or a 30% change is achieved.³¹ In our study, pain reduction was observed between baseline and single-blind pregabalin, between baseline and double-blind pregabalin, and between double-blind pregabalin and double-blind placebo; however, the greater magnitude of the difference was seen between baseline and single-blind pregabalin. We estimate that the magnitude of the response in the double-blind crossover period would have been higher if we had increased the duration of treatment, given that response rates continued to increase between 2 and 4 weeks (Fig. 4), or if the washout period had been longer.

We defined "definite responders" as those individuals in whom the NRS was below 5 after the double-blind pregabalin phase (after the crossover). Overall, 23 (74%) participants were definite responders and only 8 participants had NRS between 6 and 8 at the completion of the single-blind pregabalin phase. Definite responders had statistically significantly higher IENFD levels (7.8 ± 5.1 vs. 5.2 ± 2.4 fibers/mm, $P = 0.01$). In addition, fasting glucose levels and BMI were lower in responders (116 ± 16 vs. 123 ± 15 mg/dL and 30 ± 5.6 vs. 33 ± 9.4 , respectively), although these indicators did not reach statistical significance. These findings suggest that participants with objective markers of direct or indirect nerve damage changes were less responsive to treatment.

Smith et al³² previously showed that IENFD correlated with higher levels of fasting glucose. We also found a significant association with abnormal IENFD, defined as <5 nerve fibers per millimeter, and higher fasting glucose levels (130 ± 14 vs. 117 ± 5 mg/dL, $P = 0.05$). In addition, we found the same correlation with higher levels of AGEs measured through RIA and ELISA. Many of the effects of hyperglycemia are mediated by nonenzymatic glycosylation of proteins and the formation of AGEs. This phenomenon is accelerated under conditions where the glucose concentration

is chronically high. The formation of AGEs is a consequence of long exposure to hyperglycemia through the effects of nonenzymatic glycation of proteins. AGE formation is associated with structure-function alterations of proteins, such as collagen, and particularly in tissues where these proteins accumulate.²⁶⁻²⁸ This innovative discovery supports the idea that AGE formation may play a role as a mediator of chronic neuropathy in altered glucose states; it remains to be elucidated whether its harmful effect is a consequence of higher levels of these products or longer exposure to these products.

Interestingly, the baseline pain intensity was not associated with the response rate, serum glucose levels, or AGEs; however, definite responders had a higher IENFD density in skin biopsies and lower AGEs in the serum, suggesting that the real nonresponders may be at a more advanced clinical stage.

The limitations of the study were the high number of participants who did not meet the criteria for entering the double-blind crossover phase. This issue diminished the power of the study due to the lower number of participants, and sample calculations for this type of study should consider only those groups that may be candidates for the enrichment phase. A second limitation was the high response rate that continued to increase, including the placebo phase, despite the washout periods. A second randomization and longer washout periods may have prevented these responses. Finally, the innovative methods for quantifying AGEs that were measured in this study from pyrrolic and imidazole structures originated by non-oxidative pathways of glucose, whereas other commercial kits measure them primarily from glyoxal, a product of glucose oxidation. Fortunately, total levels of serum AGEs correlated between both methods of measurement. We propose a larger study to investigate the role of AGEs and their correlations to IENFD and pain response in prediabetic states.

REFERENCES

- De Veet F, Dekker JM, Stehouwer CD, et al. Similar 9-year mortality risks and reproducibility for the World Health Organization and American Diabetes Association glucose tolerance categories: The Hoorn study. *Diabetes Care*. 2000;23:40-44.
- Ferrannini E, Massari M, Nannipieri M, et al. Plasma glucose levels as predictors of diabetes: The Mexico City Diabetes Study. *Diabetologia*. 2009;52:818-824.
- Singleton JR, Smith AG. Neuropathy associated with prediabetes: what is new in 2007? *Curr Diab Rep*. 2007;7:420-424.
- Singleton JR, Smith AG, Bromberg MB. Painful sensory polyneuropathy associated with impaired glucose tolerance. *Muscle Nerve*. 2001;24:1225-1228.
- Novella SP, Inzucchi SE, Goldstein JM. The frequency of undiagnosed diabetes and impaired glucose tolerance in subjects with idiopathic sensory neuropathy. *Muscle Nerve*. 2001;24:1229-1231.
- Sumner CJ, Sheth S, Griffin JW, et al. The spectrum of neuropathy in diabetes and impaired glucose tolerance. *Neurology*. 2003;60:108-111.
- Smith AG, Singleton JR. Impaired glucose tolerance and neuropathy. *Neurologist*. 2008;14:23-29.
- Ziegler D, Rathmann W, Dickhaus T, et al. KORA Study Group. Neuropathic pain in diabetes, prediabetes and normal glucose tolerance: The MONICA KORA Augsburg Surveys S2 and S3. *Pain Med*. 2009;10:393-400.
- Dyck JB, Dyck PJ. Diabetic polyneuropathy. In: Dyck PJ, Thomas PJ, eds. Philadelphia: W.B. Saunders; 1999:255-278.
- Feldman EL, Stevens MJ, Russell JW, et al. Diabetic neuropathy. In: Taylor S, ed. *Current Review of Diabetes*. Philadelphia: Current Medicine; 1999:71-84.
- Singleton JR, Smith AG, Bromberg MB. Increased prevalence of impaired glucose tolerance in patients with painful sensory neuropathy. *Diabetes Care*. 2001;24:1448-1453.
- Divisova S, Vickova E, Hnojčikova M, et al. Prediabetes/early diabetes-associated neuropathy predominantly involves sensory small fibers. *J Peripher Nerv Syst*. 2012;17:341-350.
- Duby JJ, Campbell RK, Setter SM, et al. Diabetic neuropathy: an intensive review. *Am J Health Syst Pharm*. 2004;61:160-173, quiz 175-6.
- Tavec J, Zhou L. Small fiber neuropathy: a burning problem. *Cleve Clin J Med*. 2009;76:297-305.
- Holland NR, Crawford TO, Hauer P, et al. Small-fiber sensory neuropathies: clinical course and neuropathology of idiopathic cases. *Ann Neurol*. 1998;44:47-59.
- Singleton JR. Evaluation and treatment of painful peripheral polyneuropathy. *Semin Neurol*. 2005;25:185-195.
- Attal N, Cruceu G, Baron R, et al. EFNS guidelines on the pharmacological treatment of neuropathic pain: 2009 revision. *Eur J Neurol*. 2010;17:1113-1123.
- Wild S, Roglic G, Green A, et al. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*. 2004;27:1047-1053.
- Benjamin SM, Valdez R, Geiss LS, et al. Estimated number of adults with prediabetes in the US in 2000: opportunities for prevention. *Diabetes Care*. 2003;26:645-649.
- Geiss LS, James C, Gregg EW, et al. Diabetes risk reduction behaviors among US adults with prediabetes. *Am J Prev Med*. 2010;38:403-409.
- Freyenhagen R, Strojek K, Griesing T, et al. Efficacy of pregabalin in neuropathic pain evaluated in a 12-week, randomised, double-blind, multicentre, placebo-controlled trial of flexible- and fixed-dose regimens. *Pain*. 2005;115:254-263.
- Frampton JE, Scott LJ. Pregabalin: in the treatment of painful diabetic peripheral neuropathy. *Drugs*. 2004;64:2813-2820.
- Ho tw, Backonja M, Ma J, et al. Efficient assessment of neuropathic pain drugs in patients with small fiber sensory neuropathies. *Pain*. 2009;141:19-24.
- Maikta Z, Radolf S, Rayfield EJ, et al. Advanced glycosylation end products in patients with diabetic neuropathy. *N Engl J Med*. 1991;325:836-842.
- Yanagisawa K, Makita Z, Shiroshita K, et al. Specific fluorescence assay for advanced glycation end products in blood and urine of diabetic patients. *Metabolism*. 1998;47:1348-1353.
- Ceriello A. Hyperglycaemia: the bridge between non-enzymatic glycation and oxidative stress in pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Nutr Metab*. 1999;12:42-46.
- Cárdenas-Leon M, Díaz-Díaz E, Argüelles-Medina R, et al. Glicación y entrecruzamiento de proteínas en la pathogenesis de la diabetes y el envejecimiento [Glycation and protein crosslinking in the diabetes and ageing pathogenesis]. *Revista de Investigación Clínica*. 2009;61:505-520.
- Singleton R, Bixby B, Russell J, et al. The Utah Early Neuropathy Scale: a sensitive clinical scale for early sensory predominant neuropathy. *J Peripher Nerv Syst*. 2008;13:218-227.
- Raskin P, Huffman C, Yurkewicz L, et al. Pregabalin in subjects with painful diabetic peripheral neuropathy using an NSAID for other pain conditions: a double-blind crossover study. *Clin J Pain*. 2005. [Epub ahead of print] PMID: 25968451.
- American Diabetes Association. American Diabetes Association: Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2003;26:S5-S20.
- Peltier A, Smith AG, Russell JW, et al. Reliability of quantitative sudomotor axon reflex testing and quantitative sensory testing in neuropathy of impaired glucose regulation. *Muscle Nerve*. 2009;39:529-535.
- England JD, Gronseth GS, Franklin G, et al. Practice parameter: the evaluation of distal symmetric polyneuropathy: the role of autonomic testing, nerve biopsy, and skin biopsy (an evidence-based review). Report of the American Academy of Neurology, the American Association of Neuro-muscular and Electrodiagnostic Medicine, and the American Academy of Physical Medicine and Rehabilitation. *PMR*. 2009;1:14-22.
- Kennedy WR, Wendelschafer-Crabb G, Walk D. Use of skin biopsy and skin blister in neurologic practice. *J Clin Neuromuscul Dis*. 2000;1:196-204.
- Downie WW, Leatham PA, Rhind VM, et al. Studies with pain rating scales. *Ann Rheum Dis*. 1978;37:378-381.
- Farrar JT, Young JP, LaMoreaux L, et al. Clinical importance of changes in chronic pain intensity measured on a 11-point numeric pain rating scale. *Pain*. 2001;94:149-158.
- Farrar JT, Pritchett YL, Robinson M, et al. The clinical importance of changes in the 0 to 10 numeric rating scale for worst, least and average pain intensity: analyses of data from clinical trials of duloxetine in pain disorders. *J Pain*. 2010;11:109-118.
- Parsons B, Emir B, Knapp L. Examining the time to improvement of sleep interference with pregabalin in patients with painful diabetic neuropathy and postherpetic neuralgia. *Am J Ther*. 2015;22:257-68.
- Gilron I, Bailey JM, Tu D, et al. Nortriptyline and gabapentin, alone and in combination for neuropathic pain: a double-blind, randomised controlled crossover trial. *Lancet*. 2009;374:1252-1261.
- Treede RD, Jensen TS, Campbell JN, et al. Neuropathic pain. Redefinition and a grading system for clinical and research purposes. *Neurology*. 2008;70:1630-1635.
- Huffman C, Stacey BR, Tuchman M, et al. Efficacy and safety of pregabalin in the treatment of patients with painful diabetic neuropathy and pain on walking. *Clin J Pain*. 2015;31:946-958.
- Papanas N, Vinik AL, Ziebler D. Neuropathy in prediabetes: does the clock start ticking early? *Nat Rev Endocrinol*. 2011;7:682-690.
- Smith AG, Russell J, Feldman EL, et al. Lifestyle intervention for pre-diabetic neuropathy. *Diabetes Care*. 2006;29:1294-1299.

INFORME TÉCNICO FINAL

ORIGINAL ARTICLE

Title:

Longitudinal Changes in Circulating Concentrations of Advanced Glycation end Products, its Association with the Development of Diabetes Mellitus in Mexican population

Running Title:

Longitudinal changes of AGEs and Diabetes Mellitus

Authors:

Itzel Uribe Jiménez^{a,b}, Eulises Díaz-Díaz^b, Jorge Salmerón Castro^{c,d}, Julia Pérez Ramos^e, Mario Cárdenas León^b, José Antonio Alvarado Ríos^{b,i}, Juan Carlos Auriostigue Bautista^{b,g}, Ricardo Correa-Rotter^h, Carlos Alberto Aguilar Salinasⁱ, Fernando Larrea^b.

^aProgram of Postdegree in Biological Sciences and Health (PhD student), Autonomous Metropolitan University, Xochimilco Unit, Mexico, DF, Mexico.

^bDepartment of Reproductive Biology, ⁱDepartment of Nephrology and Mineral Metabolism,

ⁱDepartment of Endocrinology, National Institute of Medical Sciences and Nutrition "Salvador Zubirán", Mexico, DF, Mexico.

^cCenter for Population Health Research, National Institute of Public Health, and

^dEpidemiological Research Unit and Health Services, Mexican Social Security Institute Cuernavaca, Morelos.

^eDepartment of Biological Systems, Autonomous Metropolitan University, Xochimilco Unit, Mexico, DF, Mexico.

^fProgram of Postdegree in Biochemical Sciences (Masters student), National Autonomous University of Mexico.

^gFaculty of Higher Studies "Zaragoza", National Autonomous University of Mexico, Mexico, DF, Mexico.

Address reprinting requests to: Eulises Díaz-Díaz, Departamento de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", Vasco de Quiroga No. 15, Colonia Belisario Domínguez Sección XVI, C.P. 14080, Delegación Tlalpan, México, D.F., México. Tel.: (55) 54870900 Ext.: 2408. E-mail: eulisesd@yahoo.com

Abstract

Background. Diabetes Mellitus (DM) is characterized by the production and accumulation of advanced glycation end products (AGEs), which are identified as one of the key mechanisms in the development of chronic complications in subjects with DM.

Aims of the study. To evaluate the longitudinal changes in circulating AGEs concentrations to predict the development of DM in a cohort of Mexican individuals.

Methods. A cohort of 781 workers from the Social Security Institute in Morelos, Mexico, was studied. Clinical and metabolic parameters were obtained and serum AGEs concentrations and other variables in a baseline and in a second sample obtained seven years later were measured. AGEs were quantified by a specific radioimmunoassay developed in our laboratory. Association between changes in circulating levels of AGEs and development of DM was evaluated.

Results. The diabetic subjects had higher circulating levels of AGEs than those normoglycemic or with impaired fasting glucose in both samples studied (471 vs. 246 and 342 $\mu\text{U}/\text{mL}$, $p < 0.001$; and 912 vs. 428 and 519 $\mu\text{U}/\text{mL}$, $p < 0.001$), respectively. A multinomial logistic regression analysis showed that subjects who had AGEs concentration ≥ 450 $\mu\text{U}/\text{mL}$ in the baseline sample had a relative risk ratio of 10.7 to develop DM seven years later ($p < 0.001$).

Conclusions. Circulating AGEs concentration is a good early marker to predict risk of developing DM.

Key Words:

AGEs, Insulin resistance, Impaired fasting glucose, Glucose intolerance, Diabetes Mellitus.

Introduction

Advanced glycation end products (AGEs) derived from glucose are molecular structures generated *in vivo* by prolonged exposure to chronic hyperglycemic like in poorly controlled subjects with DM (1,2). Early evaluations of AGEs could be a valuable strategy to proactively detect metabolic alterations in subjects prone to develop DM (3). The production and accumulation of AGEs has been identified as one of the key mechanisms in the development of chronic complications of DM. Therefore, it is thought that measurement of circulating AGEs could be a useful marker to predict the chronic complications of DM, particularly those resulting in chronic kidney disease (4-10).

In this regard, efforts to develop sensitive assays, as the one described in this communication, might help to fill up the lack of reliable methodology to address important needs in the process of decreasing the prevalence and complications of emerging chronic non-transmissible diseases affecting the world's health nowadays. Herein, we described and validated a specific radioimmunoassay using a highly specific antiserum against AGEs derived from glucose.

Materials and Methods

Subjects Selection

This study was approved by the Scientific and Ethical Review Committee of the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", (key protocol: BRE 557-12/15-1), and included 781 subjects from a cohort of workers of the Social Security Institute in Morelos, Mexico, who met the following inclusion criteria: ≥ 20 years of age, with a full medical record and complete laboratory data. Initial serum samples (baseline) and those after a seven-year period were frozen until assayed. All participants signed the corresponding informed consent.

Measurements

Anthropometric measurements were performed by trained staff for this purpose, using a calibrated stadiometer (Seca 206, Hamburg, Germany) and a calibrated scale (Seca 872, Hamburg, Germany). Blood pressure was measured using a WHO approved sphygmomanometer (OMRON HEM-7200, Omron Corporation, Matsusaka, Japan).

Blood samples were collected after an overnight fasting of at least 12 hours, neither having performed intense physical activity nor ingested alcohol and frozen until assayed. Serum glucose, creatinine, uric acid, total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol and triglycerides were measured by enzymatic colorimetric methods using reagents from Pointe Scientific (Pointe Scientific Inc., Missouri, USA) and an automated biochemical analyzer Mindray BS-200 (Mindray Medical International Limited, Shenzhen, China). Insulin and AGEs derived from glucose were measured by radioimmunoassays (RIA) using a gamma counter Cobra II (Packard Instrument Company, Inc., Connecticut, USA). The index of insulin resistance was estimated by the Homeostatic Model Assessment (HOMA) (11). The estimated glomerular filtration rate (eGFR) was calculated according to Levey *et al* in 2009 (12), and values adjusted for body surface area (13).

Serum insulin concentrations were measured by a RIA previously developed by our working group and carefully validated by comparison of the results with the obtained by the Abbott IMX automated benchtop immunochemistry analyzer (Abbott laboratories, Chicago, USA), which is used for routine measurement of insulin in our laboratory. This method is a competitive double-antibody radioimmunoassay. The RIA has a linearity range from 0 to 209 $\mu\text{IU/mL}$ and a detection limit of 0.21 $\mu\text{IU/mL}$. The intra- and inter-assay precision coefficients were 6.5% and 6.0%, respectively. No interferences with hemoglobin up to 150 mg/dL, bilirubin up to 15 mg/dL, cholesterol up to 668 mg/dL, and triglycerides up to 4192 mg/dL were found.

Serum AGEs concentrations were measured by a specific RIA developed in our laboratory (14,15). This assay has a linearity range from 0 to 19200 $\mu\text{U/mL}$; that in mass concentration is 0 to 64 ng/mL of glycated BSA used as standard, with a detection limit of 20 $\mu\text{U/mL}$. The intra- and inter-assay coefficients of variation were 6.1% and 7.3%, respectively. No interferences with hemoglobin up to 185 mg/dL, bilirubin up to 255 mg/dL, cholesterol up to 860 mg/dL, and triglycerides up to 2664 mg/dL, were found.

Statistical Analysis

Results are expressed as mean and its 95% confidence intervals. The degree of association between two parameters was evaluated by simple linear regression analysis, and the associations between one dependent variable and many independent variables were established by a multiple linear regression model. The comparisons of parameters between groups were performed using Bonferroni multiple comparison tests. The sensibility, specificity and the optimal cutoff values were obtained by the ROC curves. The relative risk ratio (RRR) of developing impaired fasting glucose or DM seven years later, in subjects that had serum AGEs concentrations at baseline higher than the optimal cutoff value, was estimated by a multinomial logistic regression model. All statistical analyzes and graphs were performed using STATA 13 program.

Results

Features and Changes in the Metabolic Condition of the Study Population

The study population consisted of 781 subjects: 602 women and 179 men. Initially, 595 were normoglycemics (NG), 144 had impaired fasting glucose (IFG) and 42 suffered type 2 diabetes (DM). On the second measurement (7 years later), the metabolic status changed, only 422 were NG, 248 had IFG and the number of diabetics increased from 42 to 111 subjects.

Association between Serum AGEs Concentration with Clinical and Metabolic Parameters

The multiple linear regression analysis using the data from total study population showed that serum AGEs concentration was significantly associated with biological age [β coef. = 5.22 (4.01-6.42); $p < 0.001$], serum glucose [β coef. = 2.49 (2.00-2.97); $p < 0.001$], serum creatinine [β coef. = 237.6 (130.51-344.69); $p < 0.001$], and serum uric acid [β coef. = 23.94 (12.76-35.11); $p < 0.001$]. When the regression model was simplified excluding anthropometric parameters such as biological age, weight, height, body surface area, and serum creatinine (which are including in the estimation of glomerular filtration rate), an inverse and significant association between serum AGEs concentrations and eGFR, was observed [β coef. = -2.41(-3.29--1.52); $p < 0.001$].

The novelty of the interrelationship between AGEs and uric acid led us to again evaluate this possible association, considering the serum uric acid concentrations as the dependent variable. The multiple linear regression model, clearly showed that uric acid was significantly associated only with serum creatinine [β coef. = 1.06 (0.63-1.48); $p < 0.001$] and glomerular filtration rate [β coef. = -0.026 (-0.031--0.021); $p < 0.001$] and not with biological age, serum glucose or serum AGEs concentrations.

Reference Values for Serum AGEs Concentrations

The expected values for serum AGEs concentration depending on the biological age were established by a simple linear regression model using the subjects who remain NG and without clinical or metabolic disorders during the seven years of the study duration (control group). Since the aging process is associated with an increment in serum AGEs concentration; both measurements, baseline and seven years later, were analyzed together to include the aging process in the results interpretation. The main anthropometric and metabolic characteristics of the control subjects selected to estimate the reference values are shown in Table 1. It can be observed that in both, first and second measurement, all clinical and metabolic parameters are in normal range or very close of them.

The control group was divided into subgroups by decades of age and sex. The results show that serum AGEs concentration increased over the years, without significant differences between men and women. The results obtained from total control group and the separated by sex are shown in table 2. The data in Table 3, instead of the average value, show the expected serum AGEs concentration estimated through the simple linear regression model, considering the minimum and maximum values of biological age of each subgroup and the lower and upper limits of confidence intervals 95% of mean obtained from the regression model. As is possible observe by comparing the tables, the expected values for AGEs concentrations estimated by the regression model (Table 3) agrees well with the values obtained from the control subjects divided by

decades (Table 2), therefore using the regression model it can estimate the expected AGEs concentration for a particular biological age, which gives an additional precision to medical interpreting. The expected values for serum AGEs concentrations should be considered as the value of the upper limit of confidence interval 95% of the mean for each biological age.

Serum AGEs Concentrations and Glycemic state

The study population was divided into 5 groups depending on glycemic state initially and 7 years later, according to the criteria of the American Society of Diabetes (16) as follows: NG: serum fasting glucose <100 mg/dL; IFG: serum fasting glucose of 100-125.9 mg/dL; DM: serum fasting glucose \geq 126 mg/dL. The 5 groups formed were: 1) NG1-NG2: subjects who at baseline were NG and remained NG in the second measurement; 2) IFG1-IFG2: subjects with IFG both initially and 7 years later; 3) DM1-DM2: subjects who were diabetic both initially and 7 years later; 4) NG1-IFG2: subjects who initial were NG and later became IFG; and 5) NG1-DM2: subjects initially NG who developed DM 7 years later.

The serum AGEs concentrations were lower in the NG group, increased in the group with IFG and were higher in the group of subjects with DM, both in first and second measurement (Table 4). The deterioration in glycemic control led to an increase in serum AGEs concentrations. The subjects who were initially NG and in the second measurement suffering from IFG had a higher increase in serum AGEs concentrations compared with the subjects who remained NG (256 vs. 192 μ U/mL; $p < 0.001$). Likewise, the increases in serum AGEs concentrations were still much higher in subjects who were initially NG and 7 years later developed DM (441 vs. 192 μ U/mL; $p < 0.001$).

The others metabolic and clinical parameters which correlated with serum AGEs concentrations in the total population (biological age, serum uric acid and creatinine concentrations, as well as eGFR) do not showed significantly changes outside from their expected physiological values between measurements or between the groups; only the serum glucose concentration showed significantly changes between measurements: Group 1: NG1-NG2: 85.0 (84.3-85.7)-90.3 (89.7-90.8) mg/dL ($p < 0.001$), in the first (1) and second (2) measurement, respectively; Group 2: IFG1-IFG2: 105.4 (104.4-106.5)-108.1 (106.8-109.4) mg/dL ($p = 0.003$); Group 3: DM1-DM2: 183.6 (165.2-201.9)-176.4 (152.7-200.2) mg/dL ($p = 0.308$); Group 4: NG1-IFG2: 90.3 (89.4-91.2)-105.9 (105.2-106.6) mg/dL ($p < 0.001$) and Group 5: NG1-DM2: 89.6 (86.8-92.3)-144.1 (127.2-160.9) mg/dL ($p < 0.001$). All groups, except the DM1-DM2, increased its serum glucose concentration from baseline to 7 years later.

Estimation of Optimal Cutoff Value of Serum AGEs concentrations for Screening of IFG or DM

The optimal cutoff values of serum AGEs concentrations for screening of IFG or DM was estimated by the ROC curves using the data from all NG and IFG subjects ($n = 1431$, first and second measurement together), and NG and DM subjects ($n = 1125$, first and second measurement together); respectively. The Figure 1 shows the relationship between sensitivity and specificity values at several cut points, which allowed the estimations of optimal cutoff value for each condition. The optimal cutoff value for screening of IFG was ≥ 400 μ U/mL with an area under the ROC curve of 0.69 and an Odds Ratio (OR) = 2.77; while the optimal cutoff value for screening of DM was ≥ 450 μ U/mL with an area under the ROC curve of 0.82, and an OR = 6.83.

The prevalence of IFG and DM in the studied population was 29% and 10% respectively. The analytical ability of the method for screening the patients with IFG or DM using the optimal cutoff values of serum AGEs concentration is shown in Table 5.

Diagnostic Value of Serum AGEs Concentrations to Predict the Risk of Deterioration in Glycemic Control

The relative risk ratio of change in the glycemic control status adjusted for age and sex was estimated through a multinomial logistic regression model, using the optimal cutoff values. The subjects who initially had serum AGEs concentrations ≥ 400 $\mu\text{U/mL}$, had almost twice the risk of developing IFG seven years later (RRR = 1.98 (1.26-3.11); $p = 0.003$). Likewise, those subjects who initially had serum AGEs concentrations ≥ 450 $\mu\text{U/mL}$ had approximately 11 times more risk of developing DM seven years later (RRR = 10.7 (3.75-30.52); $p < 0.001$).

Discussion

This study demonstrated that measurements of AGEs in serum using our immunoassay is a trustworthy strategy to monitor long-term glycemic control in order to establish adequate and prompt treatment interventions aimed at decreasing the incidence of further chronic complications in subjects at risk to develop glucose metabolic alterations. The results showed that in the study population, the prevalence of IFG and DM was 29% and 10% respectively, which agreed well with that reported in the Mexican National Health and Nutrition Survey 2012 (17). In addition, this study confirmed the high incidence in the Mexican population of DM, with 69 new cases, an increase of 164% in a lag-time of only 7 years.

In this study, we also attempted to establish the potential use of serum AGEs level as markers of long-term glycemic control, as well as, their association with relevant clinical and metabolic parameters. This study demonstrated that serum AGEs were positively associated with various variables such as; the biological age, serum glucose and serum uric acid and creatinine concentrations, and negatively associated with the eGFR. AGEs formation increases with age, particularly and most importantly in the presence of high glucose serum concentrations. It is also known and should be taken into consideration that glycation is a biological label to identify molecules that have remained for a long time in the circulation. These products must be removed as part of the cell turnover homeostasis of living organisms. In general, glycated products are degraded by phagocytes; the degradation fragments are then released into the blood stream and finally excreted in the urine (18-20). The association observed in this study between AGEs and uric acid concentrations is unclear, since no evidence exists on the role of uric acid in the process of AGEs formation. However, the negative and significant associations in this study of AGEs and uric acid with eGFR might suggest that kidney as one of variables common between AGEs and uric acid concentrations.

We also evaluated the serum AGEs concentration in healthy subjects who did not develop IFG or DM along the study. This group was subdivided by decades of biological age and sex. The finding that aging by itself was a variable significantly associated to increasing serum AGEs regardless the sex is of importance since it would be of help in establishing reference values in Mexican subjects. Interestingly was the finding that only in the 40-49 year-old subgroup, men showed a significant higher serum AGEs concentration compared to the group of age-matched control women. This difference should be further studied, given the high prevalence of DM in this group of age in the general population. As stated above, data in the control group allowed us to establish age-based reference values of serum AGEs concentrations that we believe will be important in the process of evaluating treatment strategies on the bases of early interventions in individuals at risk of developing glucose metabolic alterations.

The associations between serum AGEs concentrations with changes in serum glucose levels in both the baseline and in the seven-year serum samples were analyzed. The results showed that in NG control subjects, the serum AGEs concentrations in the two samples studied and their changes were lower than in those from subjects that previously had or developed hyperglycemia. The level of AGEs correlated with the degree of hyperglycemia, so the group considered as having DM, showed the highest concentration of AGEs in serum. Interestingly, the subjects who had normal glucose levels in the baseline sample and showed hyperglycemia in the sample taken seven years later were those who showed the greatest increases in serum AGEs concentrations

even higher than those that have been already hyperglycemic in the first measurement. This suggests that the development of DM is accompanied by an accelerated increase of AGEs synthesis; hence the importance of regular monitoring the serum AGEs concentration in subjects with high risk of developing DM.

In order to establish more accurately the diagnostic value and its potential use as a marker of long-term glycemic control, the optimal cutoff values to screening of subjects with IFG or DM were estimated. In the present study, the best ratio of sensitivity and specificity to screening IFG was obtained with a cutoff value of ≥ 400 $\mu\text{U/mL}$ and an OR value of 2.77, suggesting that subjects with IFG has approximately 3 times more likelihood to have serum AGEs concentrations ≥ 400 $\mu\text{U/mL}$ that those belonging to the NG control group. With this cutoff value, the method is able to correctly classify 80% of subjects having serum AGEs concentrations < 400 $\mu\text{U/mL}$ as NG subjects (NPV = 79.9%); remaining 20% of subjects not adequately classified who have serum AGEs concentrations ≥ 400 $\mu\text{U/mL}$ being still NG subjects. Likewise, the best ratio of sensitivity and specificity to screening DM was obtained with a cutoff value of ≥ 450 $\mu\text{U/mL}$ and an OR value of 6.83, suggesting that subjects with DM has approximately 7 times more likelihood to have serum AGEs concentrations ≥ 450 $\mu\text{U/mL}$ that those belonging to the NG control group. With this cutoff value, the method is able to correctly classify 96% of subjects having serum AGEs concentrations < 450 $\mu\text{U/mL}$ as non-diabetic subjects (NPV = 95.8%); remaining only 4% of subjects not adequately classified who have serum AGEs concentrations ≥ 450 $\mu\text{U/mL}$ being still non-diabetic subjects. Since the sensitivity and specificity are parameters that depend on the prevalence of the studied condition, a high negative predictive value is more important for screening purposes. Therefore we consider that selected optimal cutoff values are appropriate for the purposes of screening subjects with potential deterioration in glycemic control.

These results can be explained by the fact that increases in serum AGEs concentration depend on a previous wrong glycemic control, initially due to a state of insulin resistance, follow-up later to the development of IFG, glucose intolerance and DM. Indeed and because the formation of AGEs is a slow process that depends mainly on the levels of glucose; increases in serum AGEs concentrations are more associated with the presence of DM than with temporary or transient states of insulin resistance, impaired fasting glucose or glucose intolerance. However, in a previous study in a rat model of metabolic syndrome induced by *ad libitum* consumption of 30% sucrose solution during six months, characterized by arterial hypertension, hypertriglyceridemia without impairment of fasting plasma glucose due to a marked compensatory hyperinsulinemia, the measuring of circulating AGEs using our immunoassay, showed that rats with metabolic syndrome had serum AGEs concentrations 10 times higher that control group. In addition, these high concentrations of AGEs were reduced by the use of a natural extract of Hibiscus Sabdariffa employed to treat the oxidative stress of these rats (14). But above all, a recent study about neuropathy in pre-diabetic patients with impaired fasting glucose, showed that the use of Pregabalin was less effective to relieve the pain in those subjects who had lower intraepidermal nerve fiber density, which had higher serum AGEs concentrations measured by our radioimmunoassay. This proves that our analytical methodology is able to measure increases in serum AGEs concentrations associated with the deterioration of glycemic control, which promote tissue damages due to the toxic effect of glucose, even in pre-diabetic states (15).

Other interesting aspect observed in this study is the fact that despite the serum glucose concentration was not increased, but rather decreased slightly in the second measurement in the DM subjects, the serum AGEs concentrations increased very significantly. This confirms that synthesis of AGEs and their harmful effects such as protein cross-linking, among others, may continue even until long time after the serum glucose concentrations decrease or even return to euglycemia, as it has been previously suggested (21,22).

As mentioned before, the main objective of this study was to establish the association of AGEs generation with biological age and serum glucose concentration. This strategy allowed us to propose that timely identification of individuals at risk (AGEs ≥ 450 $\mu\text{U}/\text{mL}$) may be of help to decrease the development of DM and thus preventing future complications.

Finally, it is important to point out that the vast majority of studies on AGEs in DM and its complications have focused in the establishment of associations between serum and/or tissue AGEs and glycemia, including or not the presence of chronic complications. In this study, we have not only developed a new and reliable methodology to measure AGEs but also this study contributes in establishing the reference values in a sample of Mexican individuals. We believe that due to the analytical validity of the immunoassay used and presented herein, it could be of major utility in clinical practice and experimental studies.

Conclusions

The results obtained in this study could be of clinical help by setting up early and cost effective interventions aimed at controlling the prevalence of metabolic diseases and their chronic complications.

Acknowledgments

The group of authors gratefully acknowledges the financial support granted of Sectorial Fund for Health Research and Social Security, from National Council of Science and Technology of Mexico. SSA/IMSS/ISSSTE-CONACYT, 2011; the support received from the Epidemiological Research Unit and Health Services, Mexican Social Security Institute, Cuernavaca, Morelos, for the facilities to recruitment of study subjects, and Program of Postdegree in Biological Sciences and Health, Autonomous Metropolitan University, Xochimilco Unit, Mexico, DF, Mexico.

References

1. Cárdenas-León M, Díaz-Díaz E, Argüelles-Medina R, et al. Glycation and protein crosslinking in the diabetes and ageing pathogenesis. *Rev Invest Clin* 2009;61:505-520.
2. Goh SY, Cooper ME. Clinical review: The role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:1143-1152.
3. Li R, Zhang P, Barker LE, et al. Cost-effectiveness of interventions to prevent and control diabetes mellitus: a systematic review. *Diabetes Care* 2010;33:1872-1894.

4. Ciobanu DM, Olar LE, Stefan R, et al. Fluorophores advanced glycation end products (AGEs)-to-NADH ratio is predictor for diabetic chronic kidney and cardiovascular disease. *J Diabetes Complications* 2015;29:893-897.
5. Garay-Sevilla ME, Regalado JC, Malacara JM, et al. Advanced glycosylation end products in skin, serum, saliva and urine and its association with complications of patients with type 2 diabetes mellitus. *J Endocrinol Invest* 2005;28:223-230.
6. Luis-Rodríguez D, Martínez-Castelao A, Gorriz JL, et al. Pathophysiological role and therapeutic implications of inflammation in diabetic nephropathy. *World J Diabetes* 2012;3:7-18.
7. Nass N, Bartling B, Navarrete Santos A, et al. Advanced glycation end products, diabetes and ageing. *Z Gerontol Geriatr* 2007;40:349-356.
8. Rigalleau V, Cougnard-Gregoire A, Nov S, et al. Association of advanced glycation end products and chronic kidney disease with macroangiopathy in type 2 diabetes. *J Diabetes Complications* 2015;29:270-274.
9. Yamagishi S, Matsui T. Advanced glycation end products, oxidative stress and diabetic nephropathy. *Oxid Med Cell Longev* 2010;3:101-108.
10. Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM. Mechanisms of disease: advanced glycation end-products and their receptor in inflammation and diabetes complications. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2008;4:285-293.
11. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28:412-419.
12. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* 2009;150:604-612.
13. Verbraecken J, Van de Heyning P, De Backer W, et al. Body surface area in normal-weight, overweight, and obese adults. A comparison study. *Metabolism* 2006;55:515-524.
14. Zúñiga-Muñoz AM, Guarner V, Díaz-Cruz A, et al. Modulation of oxidative stress in fatty liver of rat with metabolic syndrome by Hibiscus Sabdariffa. *Immunol Endocr Metab Agents Med Chem* 2013;13:196-205.
15. González-Duarte A, Lem M, Diaz-Díaz E, et al. Efficacy of Pregabalin in the treatment of prediabetic neuropathic pain. *Clin J Pain* 2015 [Epub ahead of print] PMID: 26670614.
16. Association AD. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2013;36 (Suppl 1):S67-74.
17. Hernández-Avila M, Gutiérrez JP, Reynoso-Noveron N. Diabetes mellitus in Mexico. Status of the epidemic. *Salud Pública Mex* 2013;55(Suppl 2):S129-136.
18. Bohlender JM, Franke S, Stein G, et al. Advanced glycation end products and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005;289:F645-659.
19. Ott C, Jacobs K, Haucke E, et al. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox Biol* 2014;2:411-429.
20. Thornalley PJ. Advanced glycation end products in renal failure. *J Ren Nutr* 2006;16:178-184.
21. Eble AS, Thorpe SR, Baynes JW. Nonenzymatic glycosylation and glucose-dependent cross-linking of protein. *J Biol Chem* 1983;258:9406-9412.
22. Monnier VM, Kohn RR, Cerami A. Accelerated age-related browning of human collagen in diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:583-587.

Table 1. Main anthropometric and metabolic characteristics of normoglycemic control group, both in the baseline and seven years later

Table 2. Serum AGEs concentrations of normoglycemic control group divided into subgroups by decades of age and sex

Table 3. Reference values by age groups estimated through the regression model of the relationship between serum AGE concentration and biological age

Table 4. Longitudinal changes in serum AGEs concentrations in subjects from the cohort divided in five groups based on changes in their glycemic control state

Figure 1. Optimal cutoff values of serum AGEs concentration for screening patients with impaired fasting glucose or Diabetes Mellitus

Table 5. Analytical ability of the method for screening patients with impaired fasting glucose or Diabetes Mellitus using the optimal cutoff values of serum AGEs concentration

Table 1.

Parameters	Normoglycemic Control Group (n = 397)			
	First measurement (Baseline)		Second measurement (Seven years later)	
<i>Clinical Indicators:</i>				
Women	n	%	n	%
Men	336	84.6	336	84.6
	61	15.4	61	15.4
	<u>Mean</u>	<u>95% CI</u>	<u>Mean</u>	<u>95% CI</u>
Age (years)	42.6	41.4-43.8	49.7	48.5-50.8
Weight (Kg)	63.5	62.4-64.8	65.2	64.0-66.4
Height (cm)	157.7	156.9-158.5	157.4	156.7-158.3
Waist Circumference (cm)	87.0	85.8-88.2	90.4	89.3-91.4
Body Mass Index (Kg/m ²)	25.5	25.1-25.9	26.2	25.8-26.7
Body Fat (%)	30.2	29.4-31.0	34.7	33.7-35.8
Body Surface Area (m ²)	1.66	1.64-1.68	1.68	1.66-1.70
Systolic Blood Pressure (mm Hg)	115	114-116	117	115-119
Diastolic Blood Pressure (mm Hg)	70	69-71	72	71-73
<i>Metabolic Indicators:</i>				
Glucose (mg/dL)	85	84-86	90	89-91
Insulin (μIU/mL)	5.85	5.23-6.47	7.24	6.10-8.39
HOMA-IR index	1.25	1.12-1.39	1.62	1.37-1.88
Triglycerides (mg/dL)	136	127-144	156	148-163
Cholesterol (mg/dL)	192	188-196	202	198-205
HDL-Cholesterol (mg/dL)	41	39-43	47	46-48
LDL-Cholesterol (mg/dL)	118	114-122	129	126-133
Uric Acid (mg/dL)	4.6	4.4-4.7	4.9	4.7-5.0
Creatinine (mg/dL)	0.69	0.68-0.70	0.72	0.70-0.73
eGFR (mL/min/1.73m ²)	107	106-109	103	101-105

eGFR, estimated glomerular filtration rate; AGEs, advanced glycation end products; HOMA, homeostasis model assessment. The data are shown as mean (95% CI).

Table 2.

Biological age ranges (years)	All	Men	Women	<i>p</i> Between sexes
	Mean (95% CI); n	Mean (95% CI); n	Mean (95% CI); n	
20-29	264 (222-306); 62	291 (186-396); 6	261 (215-306); 56	0.4320
30-39	288 (264-311); 183	325 (270-380); 34	279 (235-305); 149	0.1011
40-49	325 (305-346); 255	371 (327-416); 44	316 (292-339); 211	0.0400
50-59	375 (351-399); 173	339 (276-402); 25	381 (355-407); 148	0.1894
60-69	440 (412-468); 96	452 (370-534); 12	438 (408-469); 84	0.1655
≥70	502 (415-553); 25	298; 1	510 (461-560); 24	-
All	342 (330-354); 794	355 (328-382); 122	340 (327-353); 672	0.3481

The data are shown as mean (95% CI).

Tabla 3.

Biological age ranges (years)	Serum AGEs concentration ranges (μU/mL)	95% CI	
		Lower	Upper
20-29	221-263	203	289
30-39	268-310	241	345
40-49	315-357	279	401
50-59	362-404	317	457
60-69	409-451	355	513
70-79	456-498	393	569
80-89	503-545	431	625

Regression model to estimate the reference values by biological age:

β Coefficient value: 4.7, β Coef. 95% CI : 3.8-5.6, Intercept: 127,

Root MSE: 160, $p < 0.001$

The data are shown as mean (95% CI).

Table 4.

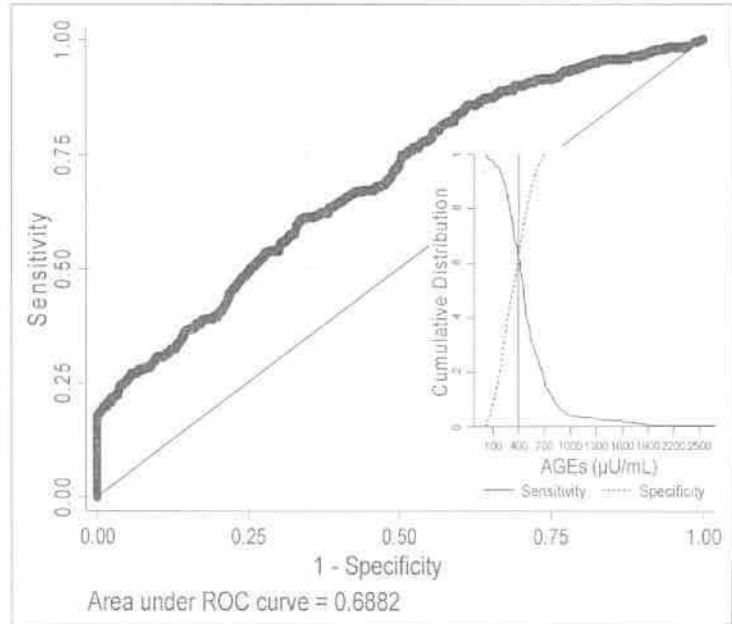
Study groups	First measurement		Second measurement		<i>p</i>	Difference between measurements	
	Mean	95% CI	Mean	95% CI		Mean	95% CI
NG1-NG2 (n = 397)	246 ^a	233-260	438 ^a	424-452	<0.001	192 ^a	179-205
IFG1-IFG2 (n = 68)	342 ^b	304-380	598 ^b	519-676	<0.001	256 ^a	183-328
DM1-DM2 (n = 42)	471 ^c	418-524	912 ^c	639-1185	<0.001	441 ^b	161-721
NG1-IFG2 (n = 180)	308 ^b	285-331	565 ^b	518-613	<0.001	258 ^a	214-302
NG1-DM2 (n = 18)	451 ^{b,c}	352-551	1100 ^c	615-1586	<0.01	649 ^b	191-1107

NG1-NG2: subjects who in both measurements were normoglycemics; IFG1-IFG2: subjects who in both measurements suffered of impaired fasting glucose; DM1-DM2: subjects who in both measurements were diabetics; NG1-IFG2: subjects who were initially normoglycemics and in 7 years developed impaired fasting glucose; NG1-DM2: subjects who were initially normoglycemics and in 7 years developed DM. The data are shown as mean (95% CI). Equal superscript letters mean no significant difference between groups, different superscript letters mean significant differences $p < 0.01$.

Figure 1.

Estimation of optimal cutoff value
for screening patients with impaired
fasting glucose
(n= 1431 observations)

Cut point ($\mu\text{U/mL}$)	Sensitivity (%)	Specificity (%)
≥ 10	100.00	0.00
≥ 50	98.34	2.77
≥ 100	97.39	8.32
≥ 200	93.11	22.77
≥ 300	78.62	44.46
≥ 400	62.23	62.67
≥ 450	52.49	72.48
≥ 500	38.95	80.89
≥ 600	27.08	93.37
≥ 700	17.34	100.00
≥ 800	10.69	100.00
≥ 900	6.41	100.00
≥ 1000	4.28	100.00
≥ 1100	3.80	100.00
> 1100	0.00	100.0



Estimation of optimal cutoff value
for screening patients with Diabetes
Mellitus
(n= 1125 observations)

Cut point ($\mu\text{U/mL}$)	Sensitivity (%)	Specificity (%)
≥ 10	100.00	0.00
≥ 50	100.00	2.77
≥ 100	100.00	8.32
≥ 200	100.00	22.77
≥ 300	92.17	44.46
≥ 400	78.26	62.67
≥ 450	72.17	72.48
≥ 500	59.13	80.89
≥ 600	44.35	93.37
≥ 700	31.30	100.00
≥ 800	22.61	100.00
≥ 900	12.17	100.00
≥ 1000	9.57	100.00
≥ 1100	8.70	100.00
> 1100	0.00	100.00

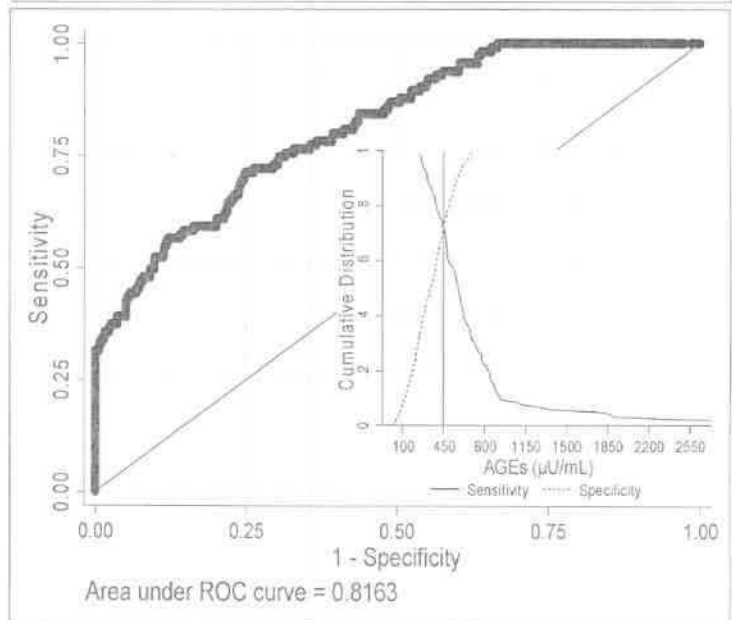


Table 5.

Parameter		Outcome			
		Impaired fasting glucose		Diabetes Mellitus	
		Value	95% CI	Value	95% CI
Observations	n	1431	-	1125	-
Optimal Cutoff		≥400	-	≥450	-
Prevalence	Pr (A)	29.0 %	27.0-31.9	10 %	8.5-12.1
Sensitivity	Pr (+/A)	62.2 %	57.4-66.9	72.2 %	63.0-80.1
Specificity	Pr (-/N)	62.7 %	59.6-65.7	72.5 %	69.6-75.2
Likelihood ratio (+)	Pr (+/A) / Pr (+/N)	1.67	1.49-1.86	2.62	2.25-3.05
Likelihood ratio (-)	Pr (-/A) / Pr (-/N)	0.603	0.528-0.687	0.384	0.285-0.517
Odds ratio	LR (+) / LR (-)	2.77	2.19-3.50	6.83	4.45-10.5
Positive predictive value	Pr (A+)	41.0 %	37.2-44.9	23.0 %	18.7-27.7
Negative predictive value	Pr (N-)	79.9 %	77.0-82.7	95.8 %	94.1-97.1

The data are shown as mean (95% CI).

INFORME TÉCNICO FINAL EN EXTENSO.

Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social. SSA/IMSS/ISSSTE-CONACYT. Convocatoria: S0008-2011-1. Solicitud: 161976.

Responsable Técnico: Dr. Eulises Díaz Díaz.

“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”.

(1)Eulises Díaz Díaz, (2)Itzel Uribe Jiménez, (3)Jorge Salmerón Castro, (4)Julia Pérez Ramos, (1)Mario Cárdenas León, (1)José Antonio Alvarado Ríos, (1)Juan Carlos Auriostigue Bautista, (5)José Ricardo Correa-Rotter, (6)Carlos Alberto Aguilar Salinas, (1)Fernando Larrea.

(1)Departamento de Biología de la Reproducción. (5)Departamento de Nefrología. (6)Departamento de Endocrinología. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”. México, D.F. (2)Posgrado en Ciencias Médicas y de la Salud (Estudiante de Doctorado). Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, México, D.F. (3)Unidad de Investigación Epidemiológica y en Servicios de Salud. Instituto Mexicano del Seguro Social. Cuernavaca, Morelos. (4)Departamento de Procesos Biológicos. Universidad Autónoma Metropolitana; Unidad Xochimilco, México, D.F.

Resumen

Antecedente: Los productos finales de glicación avanzada (AGEs) son un conjunto de estructuras químicas formadas a partir de la reacción de los grupos aminos de proteínas y los grupos aldehídos de los azúcares reductores. La formación de AGEs es un proceso normal en los seres vivos, que se incrementa con la edad de los sujetos y es por ello que es un marcador de envejecimiento. Durante la Diabetes Mellitus la formación de AGEs se incrementa e inducen estrés oxidativo, un estado proinflamatorio y vaso constricción, entre otras afecciones como la pérdida de la capacidad selectiva de filtración glomerular conduciendo a un mal funcionamiento renal en estos pacientes. A pesar de la basta información científica disponible que demuestra el papel nocivo de la formación y acumulación de AGEs en el paciente diabético, aún no se cuenta con una variedad de métodos comerciales accesibles, que permitan medir la tasa de acumulación de AGEs en el paciente diabético.

Objetivo: Desarrollar y validar una metodología analítica propia que nos permita medir masivamente las concentraciones séricas de AGEs para poder identificar cuales pacientes tienen mayor riesgos de desarrollar complicaciones crónicas tales como la nefropatía diabética, antes de que esta tenga manifestaciones clínicas.

Materiales y métodos: Se realizó la síntesis química de AGEs derivados de glucosa, mismos que se emplearon para producir anticuerpos policlonales en conejos y desarrollar un radioinmunoanálisis. Se estudiaron más de 1451 sujetos de una cohorte basal y 10 años después y se realizó además un estudio de casos y controles con pacientes diabéticos con y sin daño renal crónico.

Resultados: Se estableció un valor de referencia para AGEs en población sana abierta de 20 a 85 años de edad y además se estimó valores esperados para la edad de los sujetos. Se estableció una alta asociación entre las concentraciones de AGEs y el estado de descontrol glucémico, así como una relación inversa entre las concentraciones de AGEs y la tasa de filtración glomerular. Se encontró que los AGEs correlacionan con la misma magnitud y significancia con la creatinina sérica, que un marcador específico de daño renal crónico como la PTH. Pero a diferencia de la PTH que se eleva una vez que el daño renal está establecido, los AGEs se van formando y acumulando paulatinamente y se elevan antes de que el daño renal tenga manifestaciones clínicas. Se estimó la sensibilidad (82%) y la especificidad (93%) de la medición de AGEs para diagnosticar el daño renal crónico (creatinina > 1.3 mg/dL); esta ligera falta de concordancia entre ambos diagnósticos puede ser explicado por el hecho de que cada paciente tiene un umbral distinto para soportar los daños silenciosos que produce la hiperglicemia antes de mostrar manifestaciones clínicas; además algunos de los sujetos con daño renal habían sido dializado recientemente y no está claro aún si la diálisis favorece de algún modo la eliminación parcial de AGEs. De cualquier forma, se observó que aquellos pacientes con AGEs mayores a 1000 microU/mL, tienen 46 veces más probabilidades de desarrollar nefropatía diabética.

Conclusión: La metodología desarrollada puede ser una útil herramienta para identificar aquellos pacientes que con mayor probabilidad pudieran desarrollar nefropatía diabética.

Introducción

La diabetes Mellitus se ha convertido en un problema de salud pública a nivel mundial tanto por el costo de los recursos que se requieren para su adecuada atención, como por la limitada disponibilidad de opciones que permitan reducir su impacto. Se estima que abran 552 millones de pacientes con diabetes mellitus y 300 millones de personas con afectación de la tolerancia a la glucosa en el 2030¹. La nefropatía constituye una de las complicaciones crónicas más importantes de la Diabetes Mellitus con repercusiones trascendentes en la calidad de vida de los pacientes y en el pronóstico global de la enfermedad, se estima que la prevalencia de nefropatía diabética es de 39-50%². Se conoce ahora qué condiciones como la hiperglucemia crónica y la hipertensión arterial, explican la patología del daño estructural sobre las nefronas, primeramente a nivel mesangial para posteriormente tornarse en un daño más difuso que se hace progresivo y que a través de los años llega a manifestarse como insuficiencia renal terminal. Los AGEs son estructuras formadas por la exposición prolongada de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos a un estado hiperglucémico crónico propio de la Diabetes Mellitus; lo que conlleva a alteraciones estructurales y funcionales de estas moléculas^{3, 4}. Por tal razón, en los últimos años se ha comenzado a evaluar estrategias terapéuticas encaminadas a evitar su formación y/o a favorecer su eliminación⁵. La producción y la acumulación de AGEs se han identificado como uno de los mecanismos determinantes en el desarrollo de las complicaciones crónicas de la Diabetes Mellitus⁶⁻¹⁴. Por lo que se postula, que la medición de las concentraciones circulantes de AGEs pudiera ser de utilidad para predecir la evolución del daño renal en el paciente diabético^{16, 17}. A pesar de ello, debido a complicaciones metodológicas, aún no se dispone de una variedad de métodos comerciales para medir de forma confiable las concentraciones circulantes de AGEs. El diagnóstico oportuno a través de un tamizaje universal es la mejor estrategia para detectar de manera preventiva el deterioro del estado metabólico del paciente diabético¹⁸, y de esta manera disminuir los gastos derivados de los costosos tratamientos e intervenciones necesarias para hacer frente a las complicaciones crónicas de estos pacientes¹⁹. Por todo lo anterior, el presente trabajo tiene como objetivo desarrollar y validar de un radioinmunoensayo para la cuantificación de productos finales de glicación avanzada y evaluar la asociación de las concentraciones séricas de AGEs medidas por la tecnología desarrollada con el estado de control glucémico y la tasa de filtración glomerular en el paciente diabético, para proponer esta medición como una herramienta complementaria para el monitoreo del paciente diabético que nos permita predecir el desarrollo y la progresión de complicaciones crónicas tales como la nefropatía diabética.

Materiales y métodos

Desarrollo y validación analítica del radioinmunoanálisis.

Síntesis del AGE-BSA

Se disolvió 45.5 g de D-(+)-glucosa anhidra (Sigma Aldrich) y 25 g de BSA (Sigma Aldrich) en 500 mL de PBS, pH 7.4. La disolución se esterilizó por filtración, en campana de flujo laminar, utilizando un sistema desechable de filtración con membrana de 0.22 μm (CORNING); y se incubó a 37°C por 14 semanas. Simultáneamente, fue preparado un control negativo siguiendo el procedimiento anterior, pero sin la adición de glucosa. El monitoreo de la formación de AGEs se realizó mediante la medición de la fluorescencia emitida. Para ello, cada semana se tomó, bajo condiciones de esterilidad, una alícuota de la muestra, se le realizó una dilución 1:50 con buffer PBS, pH 7.4 y se leyó en fluorómetro (Luminescence Spectrometer LS-50B; Perkin Elmer) a 370 nm / 440 nm (longitud de excitación / emisión), con rejillas de 2.5 nm de apertura (Figura 1). Transcurridas las 14 semanas de incubación, la solución de AGE-BSA fue reducida para estabilizar las bases de Schiff formadas y permitir la completa formación de los productos

finales de glicación avanzada. Para lo cual, se adicionó lentamente 10 mL de una solución de 200 mg/mL de borohidruro de sodio a la solución de AGE-BSA (\approx 500 mL), y se mantuvo en agitación durante 1 hora, a temperatura ambiente. Posteriormente, se dializó extensivamente contra buffer fosfato de sodio 20 mM, pH 7.1 durante 3 días con cambios sucesivos de buffer, utilizando membranas de diálisis Spectra de 6-8 KDa. Finalmente, se tomó una alícuota del AGE-BSA para cuantificar su concentración de proteína mediante método de Lowry, y se realizó la evaluación por fluorescencia.

Purificación del AGE-BSA por Affi-Gel Blue

Para eliminar la albumina menos glicada de la mezcla de reacción, se hizo empleo de la tecnología cromatografía de afinidad en Affi-Gel Blue. El Affi-Gel Blue es un gel de agarosa reticulada, que tiene unido covalentemente el colorante Cibacron Blue F3GA, el cual tiene la capacidad de unir específicamente a la albumina. Previo a la purificación del AGE-BSA se evaluó la capacidad de la matriz cromatográfica para unir la BSA así como el proceso de elución. Posteriormente, se llevó a cabo la purificación del AGE-BSA (Figura 2).

Evaluación del proceso de síntesis y purificación del AGE-BSA mediante la medición de la Actividad Específica

Tanto al AGE-BSA y como a la BSA sin glical (control negativo), se les realizó un espectro de fluorescencia para identificar una de las propiedades de los AGEs su capacidad de fluorescer y verificar su formación, utilizando un fluorómetro (Luminescence Spectrometer LS-50B; Perkin Elmer) a 370 nm / 440 nm (longitud de excitación / emisión), con rejillas de 2.5 nm de apertura (Figura 3). Se realizó un análisis de los cambios estructurales ocurridos sobre la molécula de BSA debido al proceso de glicación y poder estimar la eficacia del procedimiento desarrollado. Para ello se analizó primeramente la composición aminoacídica, la estructura primaria y tridimensional de la BSA nativa con ayuda del programa de cómputo PyMOL v0.99 (DeLano Scientific LLC, CA, USA), pudiéndose detectar los posibles sitios de glicación en la molécula de BSA (Figura 4) y posteriormente el análisis de espectrometría de masa y de focalización isoeléctrica, permitieron cuantificar no solo los cambios en el peso de la BSA por adición de las moléculas de glucosa, sino también los cambios en su carga eléctrica (Figura 5). Finalmente, se cuantificó por Lowry las concentraciones de proteína del control negativo, del AGE-BSA sintetizado sin reducir (semana 14), del AGE-BSA reducido con borohidruro de sodio, y del AGE-BSA reducido y purificado por Affi-Gel Blue (primer pico, Figura 2); y se ajustaron a una concentración de 1 mg/mL, utilizando fosfato 20 mM, pH: 7.1. A partir de cada muestra, se realizaron 4 diluciones seriadas 1:2 para obtener las siguientes concentraciones de proteína: 1.0, 0.5, 0.25, 0.125 y 0.063 mg/mL. A cada dilución se le midió la fluorescencia y finalmente se determinó la actividad específica de cada muestra como el resultado de la pendiente al graficar la concentración de proteína de cada dilución contra la fluorescencia emitida y se expresó en Unidades Arbitrarias de Fluorescencia: UAF/(mg/mL) (Figura 6).

Marcaje del AGE-BSA con iodo 125

El AGE-BSA fue marcado con iodo 125 (I^{125}), por el método de cloramina T, para ser empleado como trazador radioactivo en la técnica de RIA. Para ello 10 μ g de AGE-BSA disueltos en 25 μ L de PBS se mezclaron con 10 μ L (1mCi) de NaI^{125} , y 15 μ L de Cloramina T (5 mg/mL), se incubó con agitación por 1 min a TA y posteriormente se detuvo la reacción por adición de 50 μ L de meta-bisulfito de sodio (15 mg/mL). Toda la mezcla de reacción fue purificada en Sephadex G-100 para separar el AGE-BSA marcado del exceso de I^{125} .

Producción de anticuerpos anti-AGE

Tres conejos machos de la raza Nueva Zelanda de 3-4 kg de peso, fueron inmunizados según un esquema de hiperinmunización prolongada, que consistió en una inmunización inicial con 1 mL de AGE-BSA disuelto en Adyuvante Completo de Freund (Sigma Aldrich) a una concentración de 1 mg/mL. Transcurridos 15 días, se les administró un segundo estímulo con 1 mL de AGE-BSA disuelto en Adyuvante Incompleto de Freund (Sigma Aldrich) a la misma concentración. Posteriormente, los animales fueron inmunizados una vez al mes, durante 3 meses, con 1 mL de AGE-BSA en adyuvante incompleto de Freund a una concentración de 0.5 mg/mL. Después de cada inmunización, se recolectaron 3 mL de sangre de cada conejo, por punción en la vena marginal de la oreja, para seguir su respuesta inmune contra el inmunógeno inoculado. Finalmente, mediante el seguimiento de la respuesta inmune de los animales por radioinmunoanálisis (Figura 7), se decidió sangrar a los conejos 120 días posteriores a la primera inmunización. La sangre obtenida de cada animal fue centrifugada para separar el suero, y a éste se le adiciono por cada 10 mL, 1 tableta de inhibidores de proteasas (Complete mini; Roche) disuelta en 1.5 mL de buffer PBS, pH 7.4. El suero hiperinmune así obtenido, se conservó en congelación a 4°C hasta el momento de ser utilizado.

Purificación de los anticuerpos policlonales anti-AGEs mediante la matriz de Affi-Gel 102 – AGE-BSA

Se tomaron 100 mL del suero hiperinmune anti-AGEs, se diluyó con 200 mL de buffer Tris 100 mM, NaCl 100 mM, pH: 7,4 y se le adicionó 1.5 gramos de BSA (Sigma Aldrich), y se dejó incubando a 4°C durante 12 horas. La mezcla se centrifugó durante 30 minutos a 3000 rpm a 4°C y el sobrenadante resultante se recuperó y filtró por vacío, utilizando una unidad de filtración desechable con membrana de 0.2 µm (CORNING). Los 300 mL del suero hiperinmune libre de anticuerpos anti-BSA y se aplicaron a la columna cromatográfica con matriz Affi-Gel 102 – AGE-BSA, a un flujo de 35 mL/h. Se lavó la columna con 200 mL de buffer Tris 100 mM, NaCl 100 mM, pH: 7,4 para arrastrar todas las proteínas no unidas a la matriz y aquellas unidas mediante interacciones débiles no específicas; dicho volumen no fue fraccionado. Posteriormente se pasó 200 mL de buffer glicina 100 mM, NaCl 1M, pH: 3, para eluir los anticuerpos cuyas interacciones con la matriz son sensibles al pH ácido (pico 2), recolectándose fracciones de 3.5 mL. Posteriormente, se pasó 200 mL de buffer trietanolamina 100 mM, NaCl 1M, pH: 11 para eluir los anticuerpos cuyas interacciones con la matriz son sensibles al pH básico (pico 3). Finalmente se lavó la columna con 120 mL de 100 mM, NaCl 100 mM, pH: 7,4, para restablecer las condiciones de pH y fuerza iónica iniciales. Con las fracciones colectadas se obtuvieron dos cromatogramas (Figura 8); el primero por reacción con el reactivo de Bradford (medición de proteína), y el segundo a través de la medición de la capacidad de unión de los anticuerpos por radioinmunoanálisis (medición de la actividad inmunológica).

Se mezclaron las fracciones correspondientes a los picos 2 y 3, y se concentraron los anticuerpos con el empleo de unidades de filtración por centrifugación con membrana de celulosa de 10 kDa (Amicon Ultra; Merck Millipore). Una vez concentrados, los anticuerpos fueron dializados extensivamente contra buffer de fosfatos 20 mM, pH 7.1. Finalmente se les cuantificó la concentración de proteína mediante técnica de Lowry (Figura 8, tabla parte inferior), y los anticuerpos fueron titulados por RIA y verificada su especificidad inmunológica.

Evaluación de la especificidad de reconocimiento de los anticuerpos anti-AGEs producidos y purificados

Se evaluó la especificidad del reconocimiento de los anticuerpos específicos producidos y purificados a través de la medición por RIA del reconocimiento de estos de la BSA nativa y del

AGE-BSA marcados con I^{125} , en dos matrices proteicas BSA y gelatina (Figura 9 parte superior). Una vez comprobada su especificidad de reconocimiento, se realizó la titulación precisa de los anticuerpos policlonales anti-AGEs, pudiéndose establecer la dilución de trabajo de los mismos (Figura 9 parte inferior).

Normalización del RIA de AGEs

Se normalizó un RIA en fase líquida con precipitación por segundo anticuerpo y se estableció el rango lineal del ensayo. Para ello 100 μ L de estándar, muestras o controles fueron mezclados con 100 μ L del anticuerpo purificado y diluido 1/7000 en PBS-BSA 1% y 100 μ L del trazador AGE-BSA- I^{125} con una actividad de 12000 CPM; mezclaron en vortex y se incubaron durante toda la noche a 4°C. Al otro día se les adicionó 200 μ L del reactivo de precipitación, mezclados e incubados 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente los tubos fueron centrifugados a 3000 rpm a 4°C durante 30 min. Una vez centrifugados, los tubos fueron decantados para eliminar la fracción no unida y el precipitado (fracción unida) fue contado en un contador de radiaciones gamma a cuentas por minuto (CPM). Con la relación dosis-respuesta se pudo establecer el rango lineal del ensayo (Figura 10). Una vez normalizado el ensayo se verificó la capacidad de este de reconocer las estructuras AGEs formadas sobre otras proteínas distintas a la BSA empleada para la preparación de AGEs, así como de otras estructuras relacionadas con la formación de los AGEs como la hemoglobina glicosilada (Figura 11).

Evaluación de posibles interferencias analíticas

Finalmente, una vez normalizado el ensayo y verificado su especificidad de reconocimiento, se llevó a cabo el análisis de posibles interferencias analíticas propias de la matriz sérica en la determinación de AGEs por nuestro RIA. Se verificó la influencia del colesterol, los triglicéridos, la bilirrubina y la hemoglobina. Para ello se emplearon muestras séricas de sujetos con altas concentraciones de estos analitos a las que se les adicionó cantidades conocidas del AGE-BSA preparado y se evaluó la recuperación del valor esperado del AGE adicionado una vez medido por el RIA.

Validación clínica de la medición por radioinmunoanálisis de las concentraciones séricas de AGEs para predecir el estado de control glucémico y el estado de la función renal en el paciente diabético.

Sujetos

Para la realización de este estudio se emplearon dos grupos de pacientes:

- a) Una sub-muestra de una cohorte de trabajadores del Seguro Social del Estado de Morelos, conformada finalmente por 1,451 sujetos, de los cuales se logró obtener toda la información clínica y muestras de suero para evaluar los parámetros metabólicos de interés en la etapa inicial y 10 años después, y que fueron divididas inicialmente en tres categorías: 1000 normoglucémicos, 325 insulino resistentes y 126 diabéticos. Mismos que fueron seleccionados teniendo en cuenta que tuvieran edades, sexos y características antropométricas similares entre grupos.
- b) Un grupo de pacientes que acudieron a los servicios de Endocrinología y Nefrología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", de los cuales 148 padecían nefropatía diabética crónica (creatinina sérica > 1.3 mg/dL), 100 eran diabéticos sin nefropatía crónica (creatinina sérica \leq 1.3 mg/dL) y un grupo de 147 sujetos no diabéticos controles, sin daño renal, con edades, sexos y características antropométricas similares a los de los grupos diabéticos.

Para la realización del 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" y todo lo relacionado a la toma y el procesamiento de las muestras, se realizó siguiendo lo establecido en la Declaración de Helsinki de 1964²⁰. Por ello todos los participantes firmaron una carta de consentimiento informado.

Métodos analíticos

A cada participante se le realizaron exámenes de laboratorio, un estudio antropométrico y una encuesta desarrollada en el Instituto Nacional de Salud Pública de México, validada para evaluar hábitos alimenticios, padecimiento de enfermedades crónicas, nivel de apego a los tratamientos, entre otros aspectos de interés médico. Las mediciones antropométricas fueron realizadas por personal capacitado para estos fines, utilizando estadímetros marca SECA 206 y básculas SECA 872 (Seca, Hamburg, Alemania) previamente calibradas. La presión arterial fue medida utilizando un equipo de la marca OMRON HEM-7200 (Omron Corporation, Matsusaka, Japón). Se midieron las concentraciones séricas de glucosa, creatinina, ácido úrico, colesterol total, HDL-Colesterol, LDL-Colesterol y triglicéridos, por métodos enzimáticos colorimétricos utilizando reactivos de la marca Pointe (Pointe Scientific Inc., Missouri, USA) y un analizador bioquímico automatizado marca Mindray BS-200 (Mindray Medical International Limited, Shenzhen, China). La hemoglobina glicosilada (HbA1c), se determinó por HPLC utilizando un equipo VARIAT II, Hemoglobin Testing System de BIORAD. La hormona paratiroidea (PTH) se midió por un método de quimioluminiscencia utilizando un equipo Immunolite 2000 (Siemens, Texas, USA). La insulina y los AGEs se midieron por radioinmunoanálisis en fase líquida desarrollados por nuestro grupo de trabajo; para ello 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), según $HOMA = [Insulina \text{ en ayuna } (\mu U/ml) \times Glucosa \text{ en ayuno } (mmol/L)]/22.5$; donde $HOMA > 2.5$ representa resistencia a la insulina²¹.

Se calculó la tasa de filtración glomerular estimada según el método propuesto por Levey *et al*, en 2009²², ajustada por la superficie corporal según la fórmula propuesta por Mosteller en 1985²³. Esta fórmula tiene en cuenta el sexo, la edad de los sujetos y sus concentraciones séricas de creatinina.

Tasa de Filtrado Glomerular en Mujeres:

Creatinina $\leq 62 \mu\text{mol/L}$ ($\leq 0.7 \text{ mg/dL}$): $TFG = 144 \times (creatinina/0.7)^{-0.329} \times (0.993)^{\text{edad}}$

Creatinina $> 62 \mu\text{mol/L}$ ($> 0.7 \text{ mg/dL}$): $TFG = 144 \times (creatinina/0.7)^{-1.209} \times (0.993)^{\text{edad}}$

Tasa de Filtrado Glomerular en Hombres:

Creatinina $\leq 80 \mu\text{mol/L}$ ($\leq 0.9 \text{ mg/dL}$): $TFG = 141 \times (creatinina/0.9)^{-0.411} \times (0.993)^{\text{edad}}$

Creatinina $> 80 \mu\text{mol/L}$ ($> 0.9 \text{ mg/dL}$): $TFG = 141 \times (creatinina/0.9)^{-1.209} \times (0.993)^{\text{edad}}$

Área de Superficie Corporal:

Se obtuvo el área de superficie corporal (ASC) de cada individuo a partir de la fórmula:

$$ASC = \sqrt{\text{peso} + \text{talla} / 3600}$$

A partir del cálculo de esta medición se obtuvo la TFG ajustada por superficie corporal de 1.73m^2

Establecimiento del valor de referencia para la concentración sérica de AGEs derivados de glucosa en sujetos sanos

Para establecer el valor de referencia de AGEs, se utilizaron los individuos sanos de la cohorte de trabajadores del seguro social, todos aquellos que eran normo-glucémicos y sin resistencia a la insulina, que no padecieran de cáncer, artritis reumatoide, artritis crónica degenerativa, síndrome metabólico, enfermedades endocrinológicas, hipertensión arterial, o disminución en la tasa de filtración renal. Para ello, se seleccionaron los individuos que estaban sanos tanto en la primera como en la segunda medición y se evaluaron las concentraciones circulantes de AGEs. Dado que las concentraciones circulantes de AGEs no tienen una distribución normal, estos fueron transformados con varios ajustes matemáticos. Una vez definido la transformación que mejor ajustaba los datos a una distribución normal, se procedió a la eliminación de valores los valores atípicos, según la metodología propuesta por Solberg HE y Lahti A en 2005²⁴. Una vez depurado los datos atípicos, se establecieron el rango de referencia de los valores contenidos entre el percentil 2.5 y el percentil 97.5, según lo propuesto por Friedrichs K y col en 2012²⁵.

Evaluación de las concentraciones de AGEs en relación con la edad

Para evaluar el incremento de las concentraciones de AGEs asociado al proceso de envejecimiento natural, se utilizaron las muestras de los mismos individuos sanos descritos anteriormente y se correlacionaron sus concentraciones de AGEs con sus correspondientes edades. Con la ecuación regresión se estableció la tabla de valores esperados de las concentraciones circulantes de AGEs por edades en población sana.

Evaluación de la relación entre el control glucémico y las concentraciones circulantes de AGEs en los sujetos de la cohorte a lo largo de los 10 años del estudio

Se analizó el estado metabólico de los sujetos de la cohorte y se clasificaron en tres grupos: normoglucémicos, insulino resistentes y diabéticos y se verificó el cambio en el estado metabólico de cada uno de ellos 10 años después; pudiéndose establecer los cambios en la prevalencia de cada una de las condiciones metabólicas al inicio y al final del estudio. Para evaluar la dinámica de formación y acumulación de AGEs en diferentes condiciones metabólicas: normoglucémicos, insulino resistentes y diabéticos; se utilizaron las muestras de la cohorte a las que se les midieron las concentraciones de AGEs inicialmente y 10 años después. Se utilizaron las muestras de pacientes que a la fecha de ambas mediciones se encontraban en la misma categoría o condición metabólica. Para evaluar la capacidad de nuestro método para detectar cambios en las concentraciones circulantes de AGEs, relacionados con el grado de control glucémico; se utilizaron las muestras de la primera y segunda medición de la cohorte, mismas que fueron subdivididas en 5 categorías, en función de sus estados de control glucémico y su condición clínica:

- a) Normoglicémicos controles (grupo NG: glicemia < 100 mg/dL; insulinemia < 15.6 μ UI/mL; HOMA < 2.5)
- b) Normoglicémicos con hiperinsulinemia compensatoria (grupos NG IR: resistentes a la insulina, con glicemia normal: glicemia < 100 mg/dL; insulinemia > 15.6 μ UI/mL, HOMA > 2.5)
- c) Diabéticos estrictamente bien controlados (grupos DM BC: Glicemia < 100 mg/dL)
- d) Pacientes no diabéticos con deterioro de la tolerancia a la glucosa (grupos DTG: glicemia: 100-125 mg/dL)
- e) Diabéticos moderadamente controlados (grupos DM MC: glicemia: 100-125 mg/dL)
- f) Diabéticos descontrolados (grupo DB NC: glicemia \geq 126 mg/dL)

Evaluación de las características de la función renal de los sujetos de la cohorte

Se analizó el estado de la función renal de los sujetos de la cohorte y se clasificaron en las 5 categorías de estadios de daño renal según las guías K/DOQI del 2002²⁶: 1) Daño renal con una tasa de filtración glomerular (TFG) normal o incrementada (≥ 90 mL/min/1.73m²); 2) Daño renal con una TFG ligeramente disminuida (60-89 mL/min/1.73m²); 3) TFG moderadamente disminuida (30-59 mL/min/1.73m²); 4) TFG gravemente disminuida (15-29 mL/min/1.73m²); 5) Falla renal (<15 mL/min/1.73m²). Se verificó el cambio en la función renal de cada uno de ellos 10 años después; pudiéndose establecer los cambios en la prevalencia de cada una de las categorías de la función renal, al inicio y al final del estudio.

Evaluación de las concentraciones de AGEs y parámetros de control glucémico en relación a su tasa de filtración glomerular.

Para establecer una primera interrelación entre los principales parámetros de control glucémico, las concentraciones séricas de AGEs y el estado de la función renal, se emplearon los datos totales de la primera y segunda medición, un total de 2,902 mediciones. Los individuos fueron clasificados y agrupados según su magnitud de tasa de filtración glomerular al momento de la toma de la muestra, en un grupo que hiperfiltraba (TFG >120 mL/min/1.73 m²), en un grupo con TFG normal (90-120 mL/min/1.73 m²) y un grupo de individuos con una reducción de la TFG (<90 mL/min/1.73 m²) y se compararon entre los grupos sus principales parámetros de control glucémico y las concentraciones séricas de AGEs. Para evaluar la asociación entre los principales parámetros de control glicémico y las concentraciones séricas de AGEs con el estado de la función renal, se realizó un análisis de correlación entre la glucemia, la insulinemia, el índice de resistencia a la insulina, las concentraciones séricas de AGEs y la creatinemia en los tres grupos de sujetos divididos en función de su tasa de filtración glomerular como se describió anteriormente.

Debido a que los pacientes de la cohorte no desarrollaron nefropatía diabéticas, el estudio se complementó con casos y controles de pacientes diabéticos con y sin daño renal.

Evaluación de las concentraciones circulantes de AGEs, de hemoglobina glicosilada y de parámetros de control glucémico en pacientes con Diabetes Mellitus sin y con daño renal crónico.

Para evaluar las concentraciones circulantes de AGEs durante la nefropatía diabética crónica, se estudió una muestra de pacientes diabéticos que acudían a los servicios de Endocrinología y Nefrología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán" y como grupo control empleamos sujetos normoglicémicos de edades y sexos similares. Los pacientes diabéticos se dividieron en dos subgrupos: a) pacientes diabéticos sin daño renal crónico (creatinina ≤ 1.3 mg/dL) y b) pacientes diabéticos con daño renal crónico (creatinina >1.3 mg/dL). Se evaluó además la concentración de hemoglobina glicosilada (HbA1c) y parámetros de control glucémicos tales como la glucemia, la insulinemia y el índice de resistencia a la insulina (HOMA), para compararlas con las concentraciones circulantes de AGEs. En estos pacientes, se evaluó la asociación entre los parámetros de control glucémico, las concentraciones séricas de AGEs y un marcador específico de la nefropatía crónica como la PTH, con la función renal, a través de un análisis de correlación entre estos parámetros con la creatinemia con el fin de verificar cuál marcador bioquímico se relacionaba mejor con el estado de la función renal durante la Diabetes Mellitus.

Evaluación de la sensibilidad y especificidad de la medición de las concentraciones circulantes de AGEs para predecir el daño renal crónico en el paciente diabético

La sensibilidad y especificidad de la medición de las concentraciones circulantes de AGEs para predecir el daño renal crónico, se evaluó a través de la curva ROC. Además, se estimó la concentración sérica de AGEs que permitía obtener la mejor combinación de especificidad y sensibilidad y que fue finalmente utilizada para estimar la probabilidad de padecer daño renal crónico a través de un análisis de regresión logística.

Análisis Estadístico

Todos los análisis estadísticos y las gráficas se realizaron con ayuda del programa STATA 13.

Resultados y Discusiones

Se logró desarrollar una metodología exitosa para la preparación, purificación y evaluación de AGEs derivados de glucosa, que no solo fue útil para producir anticuerpos específicos, sino también como se verá en el apartado de validación clínica, los AGEs preparados "*in vitro*", son equivalentes a los formados "*in vivo*" en los pacientes diabéticos. Producto de la incubación de glucosa con BSA se formaron AGEs coloreados y fluorescentes (Figura 1).

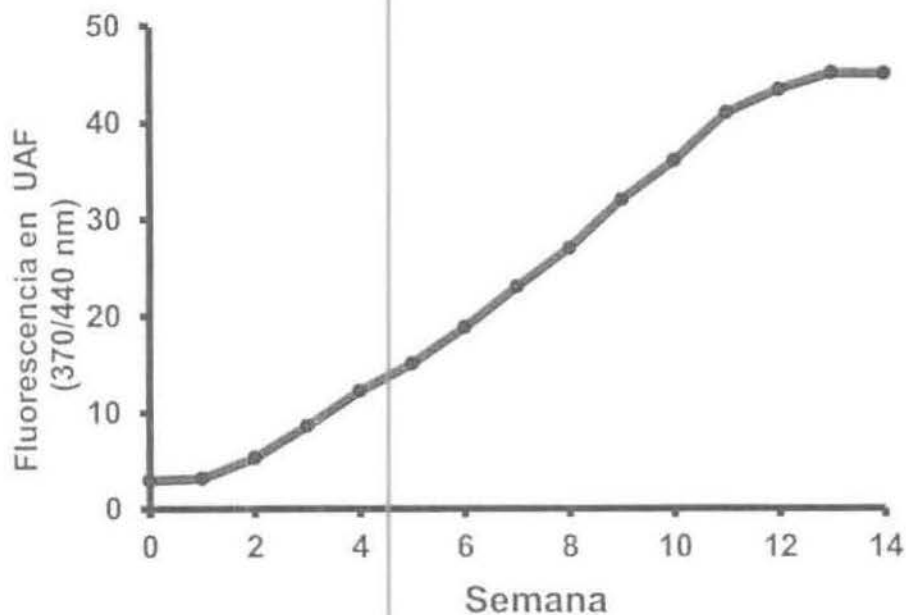
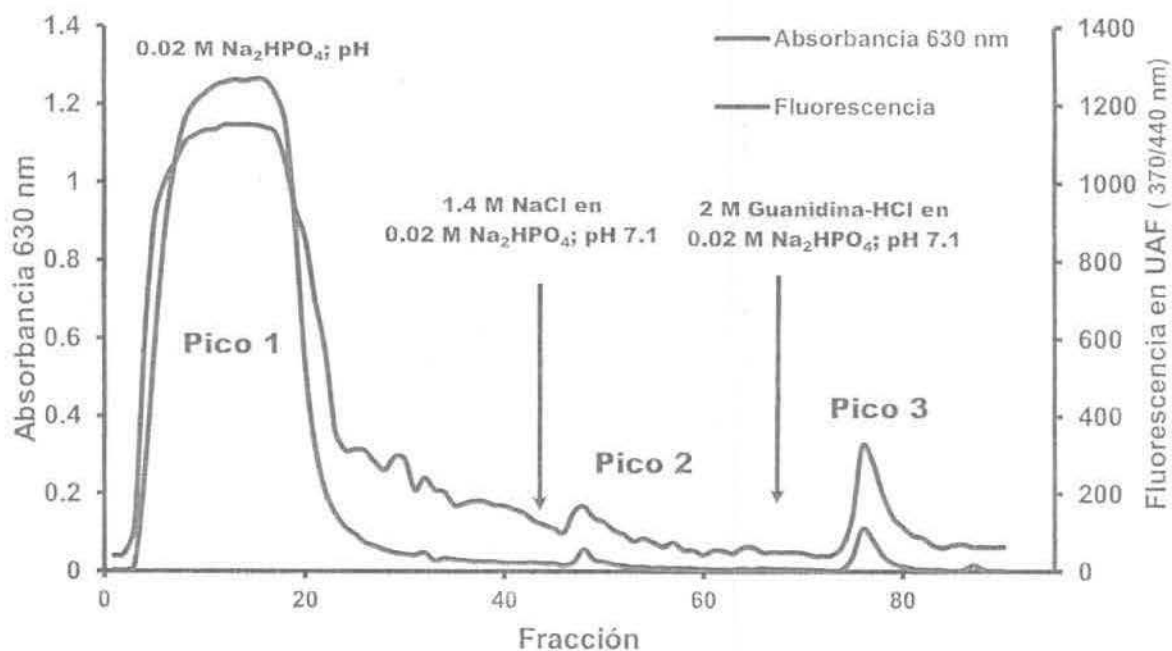


Figura 1. Cinética de formación de AGE-BSA derivado de glucosa durante las 14 semanas de incubación. Se observa que alrededor de la semana 13 se alcanza la máxima fluorescencia (UAF: unidades arbitrarias de fluorescencia) que refleja la máxima formación de AGEs relacionados estructuralmente con el imidazol, bajo las condiciones empleadas. Esto va aparejado con el incremento en la intensidad del color amarillo formado característico de la pirralina, el principal AGE formado por la incubación de glucosa con proteínas.

Para aumentar la actividad específica de los AGEs sintetizados, estos fueron purificados en Affigel-Blue para eliminar las moléculas de BSA menos glicadas y lograr una mejor respuesta inmunológica contra las estructuras AGEs formadas (Figura 2).



Proteína aplicada	Proteína en pico 1	Proteína en pico 2	Proteína en pico 3	Proteína Total
150 mg	134.2 mg	1.1 mg	13.2 mg	148.5 mg

Figura 2. Purificación por cromatografía de afinidad en affigel-Blue para eliminar las moléculas de albúmina menos glicadas que corresponden a los picos 2 y 3. El pico 1 corresponde a la BSA altamente glicada que pierde su afinidad natural por el colorante unido a la matriz cromatográfica. La línea azul refleja la presencia de proteína medido por Bradford y la roja la fluorescencia emitida por dicha proteína. Debe considerarse la diferencia en las escalas de los parámetros medidos. Se puede comprobar que casi toda la proteína adicionada a la columna fue recuperada en los tres picos analizados.

El análisis del espectro de fluorescencia mostró que los AGEs sintetizados tenían un máximo de emisión a 440 cuando eran excitados a 370 nm, no así la albúmina bovina sin glical. Esto confirma la formación de AGEs siguiendo el procedimiento antes descrito.

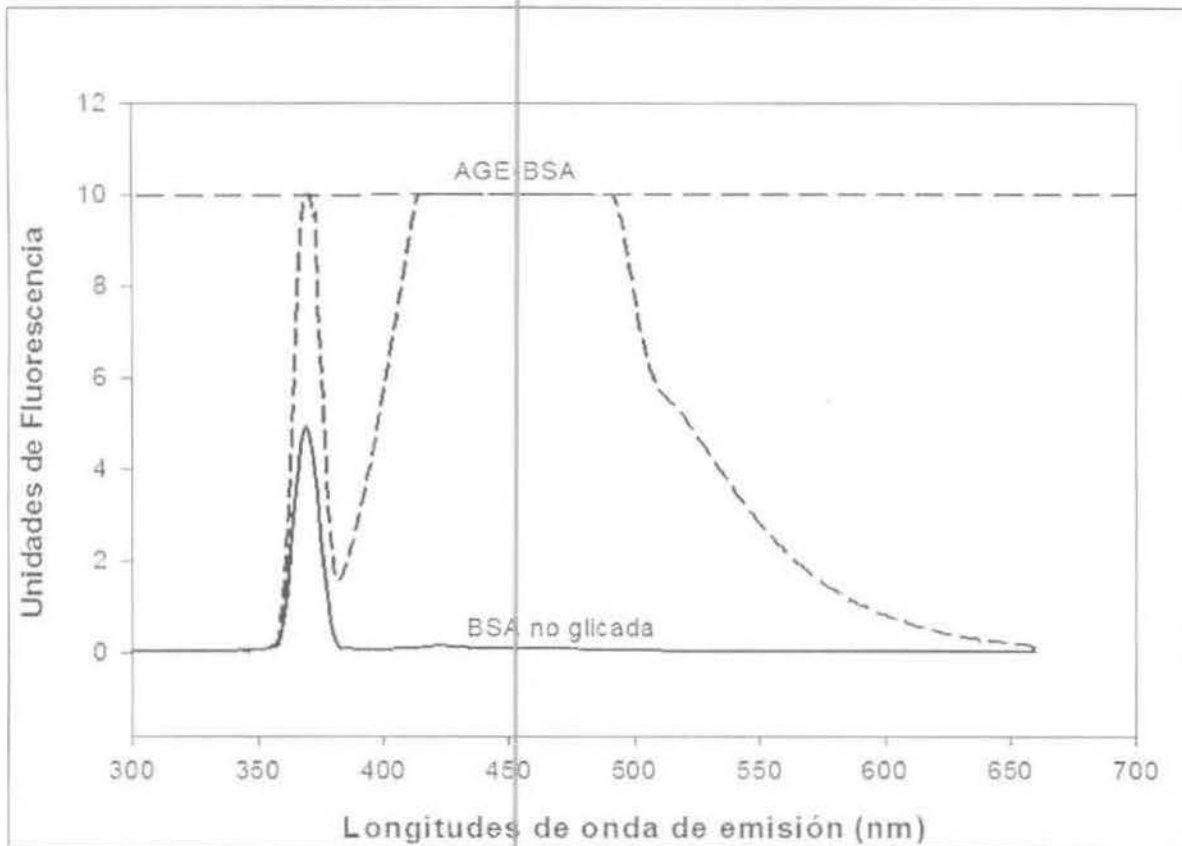


Figura 3. Espectro de fluorescencia de la BSA glicada (AGE-BSA) y comparación con el de la BSA no glicada. Se puede observar que el AGE-BSA fluoresce a 370/440nm, mientras que la BSA nativa no lo hace. Esto denota la formación de estructuras AGEs que se han formado sobre la molécula de BSA. El primer pico no es en sí fluorescencia, sino que es la propia luz de excitación (370 nm) que es detectada por el equipo cuando lee a esa longitud de onda durante el análisis espectral.

Al realizar un análisis de la composición de aminoácidos y de la estructura tridimensional utilizando el programa de modelaje de estructura, se pudo definir que la molécula de BSA tenía un máximo de 52 sitios de posible glicación.

Aminoácidos	Posición de los aminoácidos en la estructura tridimensional		
	Totalmente Expuestos	Parcialmente Expuestos	No expuestos
Lisina	4,12,20,41,51,64,76, 116,127,132,136,180, 187,211,224,261,273,275, 285,312,316,322,350,362, 375,377,388,396,465,474 ,499,504,520,523,524,53 5,537,556, 563,573.	159,413,431,533.	93,106,114,131, 204,221,232,239, 242,279,294,439, 544.
Arginina	194,196, 198.	143,185,409,412, 444.	10,81,98,144,208, 217,256,335,336, 347,427,458,483, 484.
Total	43	9	27

Figura 4. Análisis realizado con la secuencia de la BSA reportada en el GenBank con número CAA76847 (gi:3336842) y el programa: PyMOL v0.99 (DeLano Scientific LLC, CA, USA). Los aminoácidos localizados en áreas de depresiones son considerados parcialmente expuestos. El número de aminoácidos potencialmente glicables fueron 52 de los 79 presentes en la estructura primaria de la BSA.

Los incrementos en masa observados por espectrometría de masa (MALDI-TOF) sugieren que en promedio se logran glicar 48 de los 52 posibles sitios presentes en la estructura de la BSA.

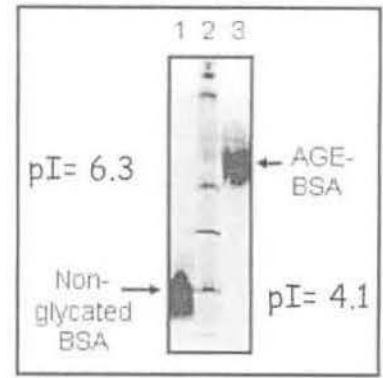
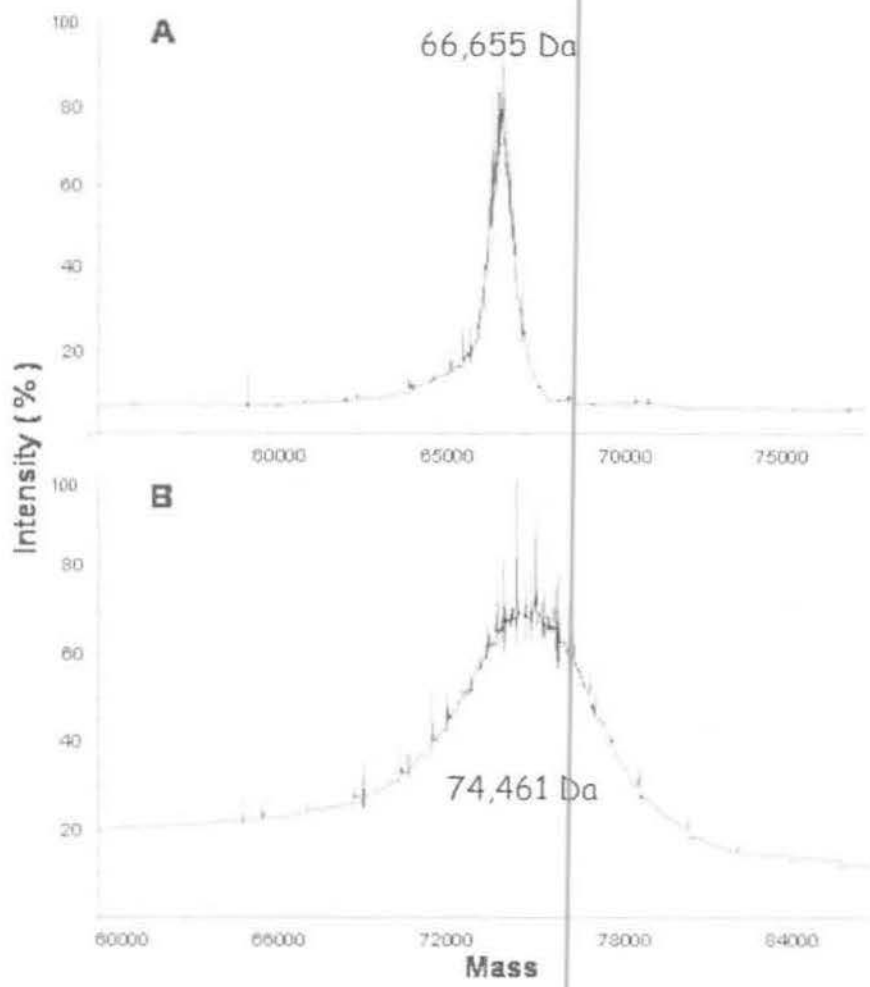


Figura 5. Análisis de masa y carga neta por espectrometría de masa y por isoelectroenfoque de la BSA no glicada y del AGE-BSA. Se observa un incremento de 7,805 Da que representa la adición de 48 moléculas de glucosa por molécula de BSA. Considerando que el peso molecular de la glucosa es de 180.2 Da y que durante cada reacción de Amadori se libera una molécula de agua (18 Da).

Así mismo los cambios en el punto isoeléctrico de la BSA demuestran los cambios significativos en sus propiedades químicas que en la circulación conducen a la pérdida de sus funciones biológicas y favorecen su deposición en la matriz extracelular de los tejidos y órganos. Este tipo de modificación molecular es la que ocurre en la membrana basal glomerular lo que conduce a la pérdida de sus cargas negativas y conllevan a la pérdida de la capacidad de filtración selectiva del glomérulo.

A través del análisis de la actividad específica (relación fluorescencia/concentración de proteína) se pudo comprobar que todos y cada uno de los procedimientos realizados contribuyeron a incrementar la calidad de los AGEs sintetizados "in vitro" (Figura 6), condición que contribuyó de forma significativa al éxito en la producción de anticuerpos específicos.

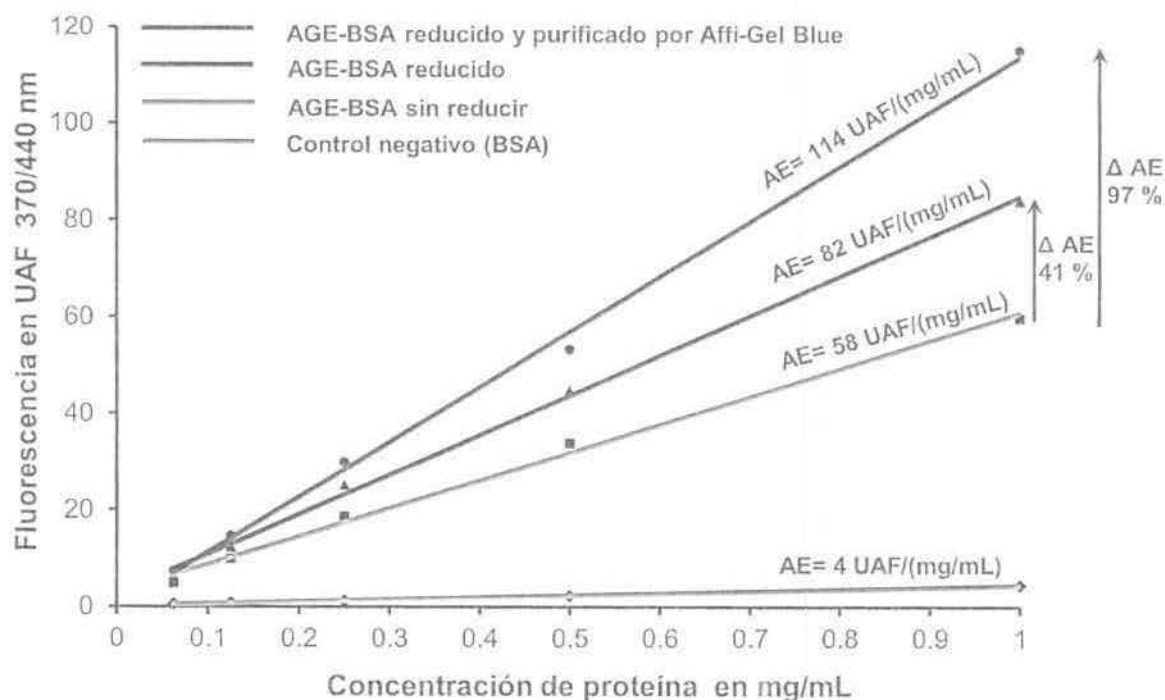


Figura 6. Incremento de la actividad específica (AE) del AGE-BSA a lo largo del proceso de síntesis y purificación. Se puede observar que con cada procedimiento empleado se logra incrementar la actividad específica del AGE sintetizado.

Se logró exitosamente la producción de anticuerpos policlonales como se muestra en la figura 7. En general después de 5 inmunizaciones los animales ya alcanzaron su máxima capacidad de respuesta inmune contra AGE, por lo que se decidió sangrarlos a blanco a fin de recuperar la máxima cantidad de antisuero posible.

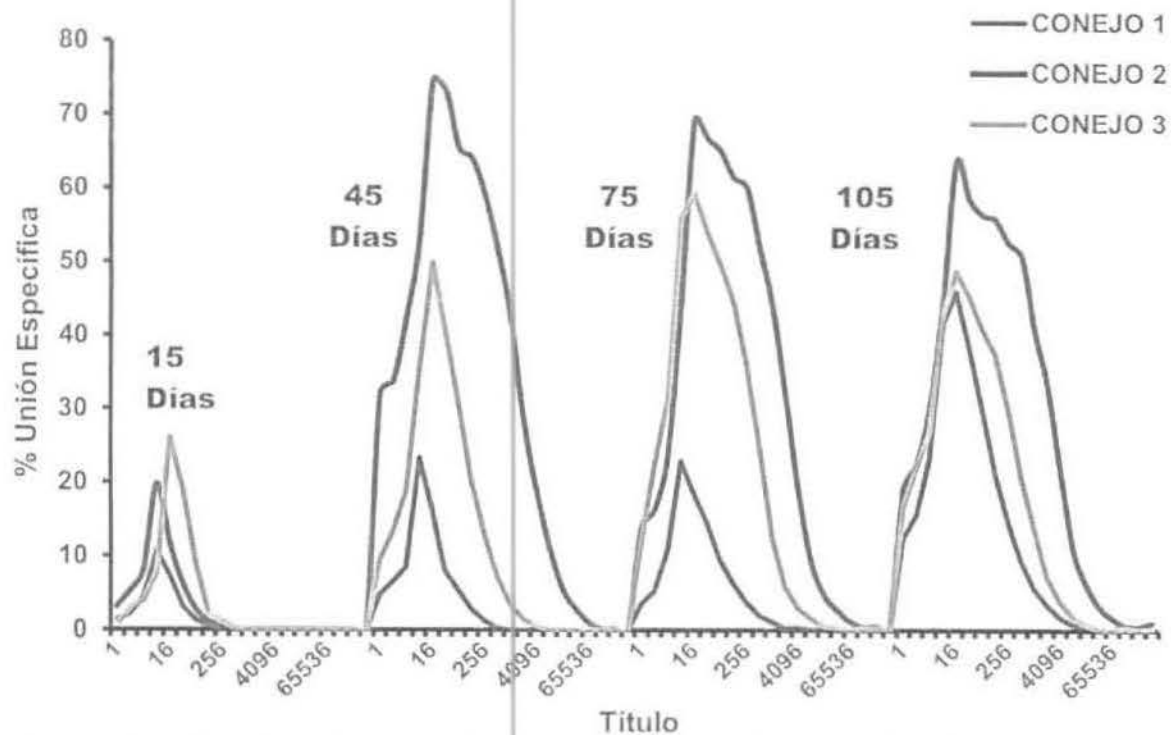
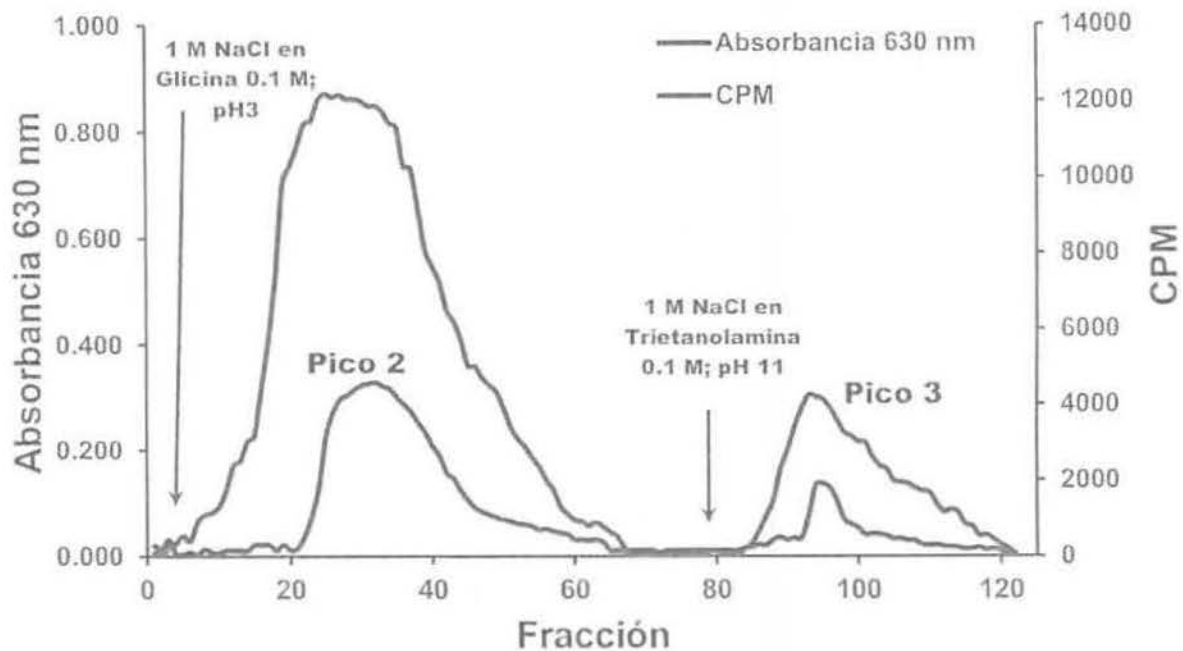


Figura 7. Seguimiento de la respuesta inmune de los animales mediante titulación por RIA. Se puede observar que a los 105 días posteriores al inicio del esquema de inmunización los animales alcanzan sus máximos títulos de anticuerpos. Se puede observar que los 3 animales respondieron adecuadamente.

A los antisueros obtenidos primeramente se les eliminaron los anticuerpos anti-BSA nativa, la proteína que se utilizó como matriz para la síntesis de AGEs por incubación con cantidades saturantes de BSA y posteriormente los anticuerpos anti-AGEs fueron recuperados exitosamente a través de una cromatografía de inmovilización (Figura 8).



Suero hiperinmune aplicado	Anticuerpos policlonales anti-AGEs obtenidos
100 mL	21.6 mg

Figura 8. Purificación de los anticuerpos anti-AGEs por cromatografía de inmunoafinidad. Se muestran los picos 2 donde eluyen los anticuerpos cuya interacciones con el AGE unido a la matriz es sensible al pH ácido y el pico 3 donde eluyen los anticuerpos cuyas interacciones son sensibles al pH básico. La línea azul es la presencia de proteína detectada por reacción con el reactivo de Bradford. La línea roja corresponde a la actividad inmunológica de reconocimiento del AGE-BSA marcado con I^{125} , lo que reafirma la especificidad de los anticuerpos producidos y purificados. La tabla mostrada brinda información sobre la eficiencia del proceso de producción y purificación de los anticuerpos.

Producto de este procedimiento se lograron recuperar 21.6 mg de anticuerpos específicos anti-AGE a partir de 100 mL de suero hiperinmune provenientes de los conejo inmunizados.

La eficiencia del proceso de purificación y la especificidad de los anticuerpos purificados fueron comprobadas a través del estudio de reactividad con BSA nativa y AGE-BSA ambas marcadas con I^{125} . De este análisis se pudo comprobar la eficacia del procedimiento para eliminar los anticuerpos anti-BSA nativa que se producen durante el proceso al ser utilizada la BSA como matriz proteica para la síntesis de los AGEs (Figura 9 superior).

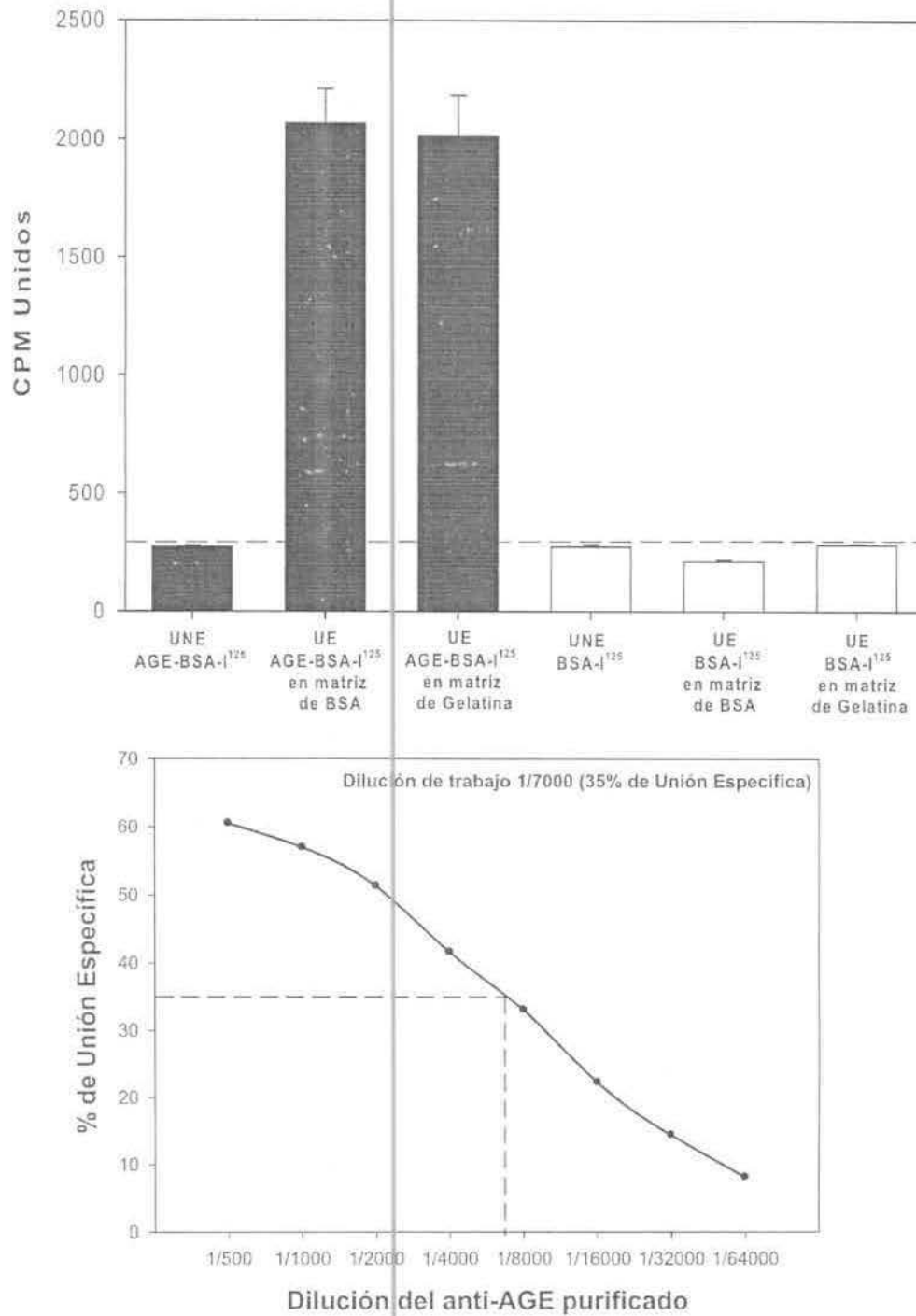


Figura 9. Especificidad de reconocimiento de los anticuerpos anti-AGEs purificados. Se puede observar que los anticuerpos solo reconocen a la BSA glicada, es decir a las estructuras AGEs formadas y no a la BSA nativa, independientemente de la matriz empleada: gelatina o BSA, (parte superior). En la parte inferior de la figura se puede observar los resultados de la titulación por RIA de los anticuerpos purificados, siendo que una dilución de 1/7000 es capaz de unir cerca del 35% del AGE-BSA marcado con I¹²⁵.

En la figura 9 inferior, se muestra la titulación de los anticuerpos específicos anti-AGEs, encontrándose que la dilución de trabajo en RIA para los anticuerpos purificados era de 1/7000.

Con este título se normalizó el ensayo que tuvo un rango dinámico de 0 a 19200 $\mu\text{U}/\text{mL}$ del estándar de AGE-BSA preparado y caracterizado por fluorescencia. Con un límite de detección de 20 $\mu\text{U}/\text{mL}$. Este rango dinámico de análisis permitió medir AGEs en sujetos sanos y con Diabetes Mellitus descontrolada (Figura 10).

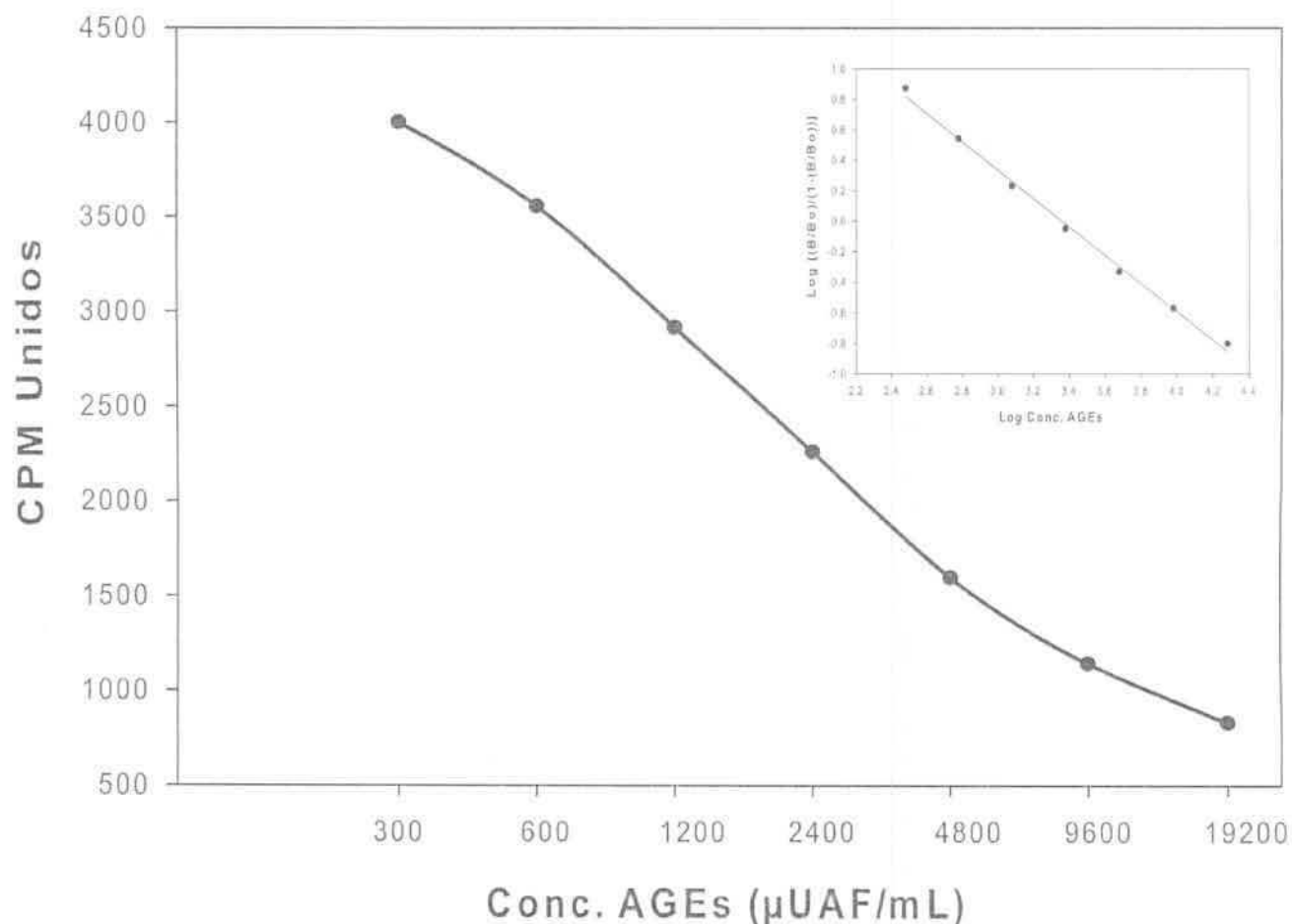


Figura 10. Se muestra la curva estándar del RIA de AGEs. El cuadro chico muestra la transformación Logit vs Log de la relación dosis-respuesta de la determinación de AGEs. El ensayo tiene una curva estándar que va desde: 300 - 19200 $\mu\text{U}/\text{mL}$, que en concentración másica del estándar es de 0.67-64 ng/mL de BSA glicada (AGE-BSA) con un límite de detección de 20 $\mu\text{U}/\text{mL}$.

La capacidad de detección de AGEs formados sobre otras proteínas se evaluó y se comprobó que los anticuerpos producidos y purificados tienen la capacidad de reconocer las estructuras AGEs independientemente de la proteína sobre la cual se produzcan. Además es altamente específico para la detección de AGEs, pues no cruza con la hemoglobina glicosilada que no es un AGE sino un producto de Amadori (una estructura intermedio en el proceso de formación de los AGEs) (Figura 11).

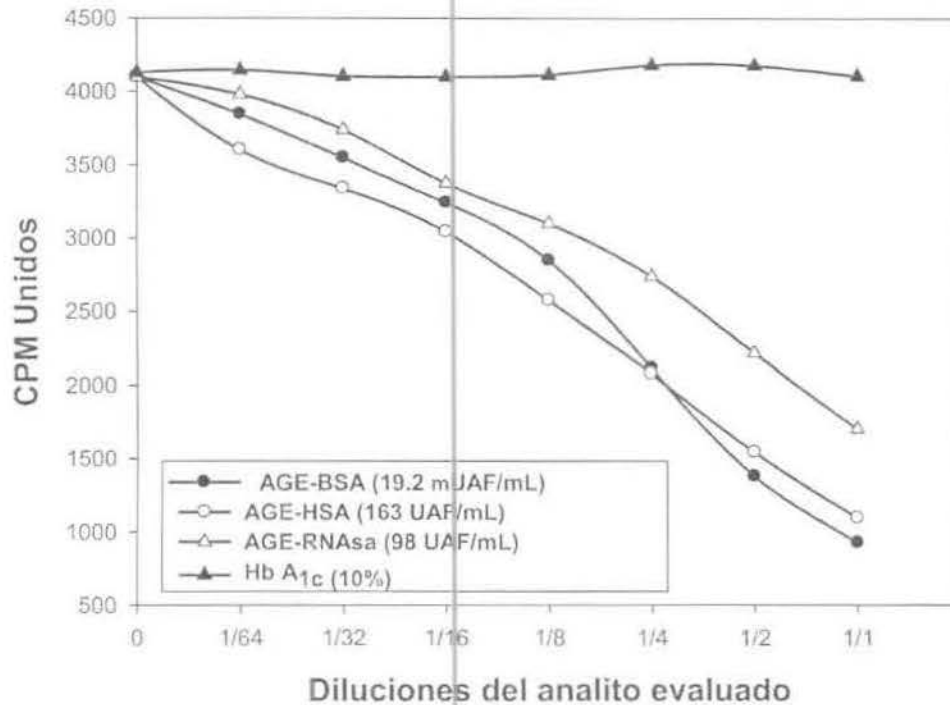


Figura 11. Se muestra que los anticuerpos producidos y purificados son capaces de reaccionar con otras preparaciones de AGEs. Esto se puede verificar por la capacidad de estas otras preparaciones de AGEs, utilizando otras matrices proteicas, para inhibir la unión al AGE-BSA marcado con 125 I. Se puede observar que la hemoglobina glicosilada, que no es un producto final de glicación avanzada, sino solo un producto de Amadori, un intermediario inicial de la formación de los AGEs, no es capaz de inhibir la unión del anticuerpo a su ligando específico, el AGE-BSA.

Cuando se analizó las posibles interferencias del inmunoensayo desarrollado con componentes del suero humano, por el método de recuperación de la dosis añadida, no se observaron interferencias significativas con hemoglobina hasta 1.85 g/dL, bilirrubinas hasta 255 mg/dL, colesterol hasta 860 mg/dL, y triglicéridos hasta 2 664 mg/dL; lo que demuestra la robustez y confiabilidad del método analítico desarrollado en nuestro laboratorio.

Una vez concluida la validación analítica del método, nos dimos a la tarea de realizar la validación clínica del método para evaluar su eficacia para detectar AGEs formados endógenamente en los humanos y establecer su asociación con el grado de control glicémico y con la función renal en pacientes diabéticos.

Para este propósito lo primero que hicimos fue establecer el valor de referencia para la concentración circulante de AGEs, utilizando los datos de la cohorte, tanto de la primera y como de la segunda medición realizada 10 años después; esto para incluir el efecto del envejecimiento y tener una muestra más representativa. Inicialmente, se seleccionaron los 1,929 valores de AGEs pertenecientes a las personas que en el momento de la toma de muestra eran normoglicémicos. Posteriormente se eliminaron algunos datos de individuos que tenían antecedentes de resistencia a la insulina, síndrome metabólico, hipertensión arterial, enfermedades endocrinológicas, cáncer, artritis reumatoide, o alteraciones en la tasa de filtración glomerular. Finalmente, debido a que las concentraciones de AGEs no tienen una distribución normal, estas fueron transformadas por diferentes ajustes matemáticos. Como se puede observar en la figura 12, la mejor transformación fue el logaritmo del valor de AGEs.

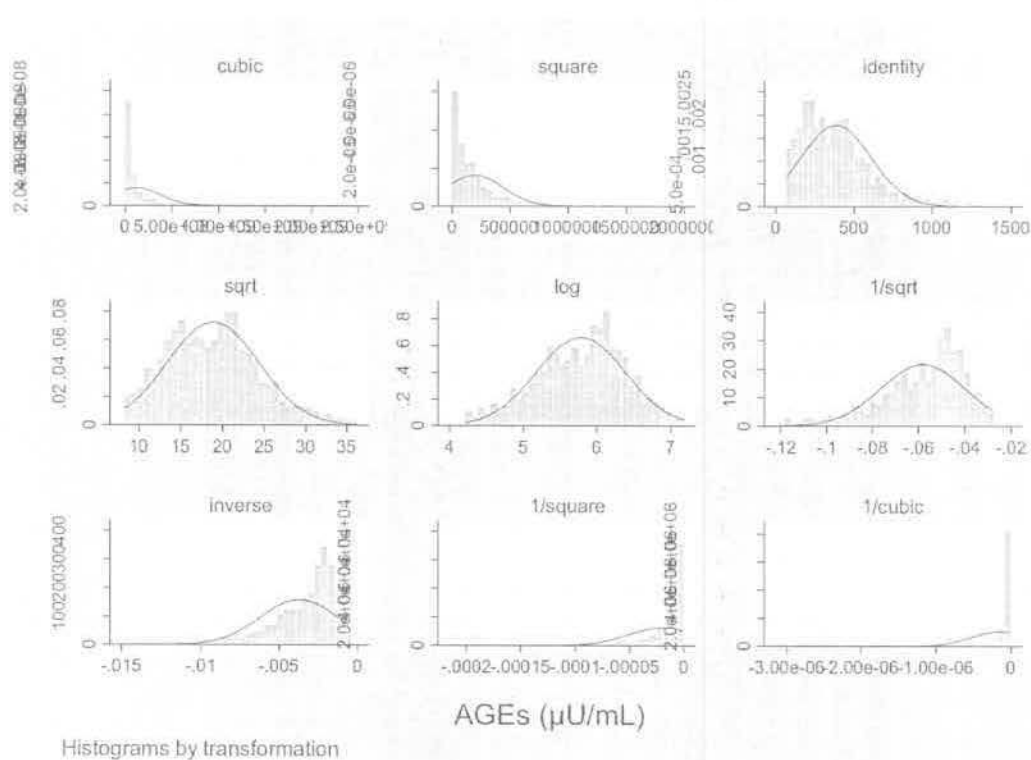


Figura 12. Normalización de las concentraciones circulantes de AGEs en sujetos controles normoglicémicos supuestamente sanos.

Finalmente, con este análisis se pudo eliminar algunos otros valores que se salían de la distribución normal (valores atípicos); quedando finalmente un total de 1,013 mediciones de individuos normoglicémicos supuestamente sanos.

La tabla 1 muestra las características antropométricas y metabólicas más importantes de los sujetos normoglucémicos supuestamente sanos seleccionados para estimar el valor de referencia de las concentraciones séricas de AGEs.

Parámetros	Sujetos Controles Supuestamente Sanos (n=1,013)
<i>Indicadores Clínicos</i>	
Edad (años)	43.3 (42.6-44.06)
Mujeres n (%)	825 (81.4)
Hombres n (%)	188 (18.6)
Peso (Kg)	60.6 (60.1-61.2)
Talla (cm)	157.4 (157.0-157.9)
Circunferencia de cintura (cm)	84.8 (84.2-85.4)
Índice de Masa Corporal (Kg/m ²)	24.4 (24.2-24.6)
Grasa corporal (%)	29.5 (29.0-30.1)
Área de superficie corporal (m ²)	1.62 (1.61-1.63)
Presión arterial sistólica (mm Hg)	112.6 (111.8-113.4)
Presión arterial diastólica (mm Hg)	69.8 (69.2-70.3)
<i>Indicadores Metabólicos</i>	
Glucosa (mg/dL)	88.1 (87.6-88.6)
Insulina (µU/mL)	4.1 (3.9-4.2)
Índice HOMA-IR	0.89 (0.86-0.93)
Triglicéridos (mg/dL)	129 (124-133)
Colesterol (mg/dL)	193 (191-195)
HDL-Colesterol (mg/dL)	43.9 (43.2-44.6)
LDL-Colesterol (mg/dL)	120 (118-122)
Ácido Úrico (mg/dL)	4.5 (4.4-4.6)
Creatinina (mg/dL)	0.68 (0.67-0.69)
TFG(mL/min/1.73m ²)	112 (111-113)
AGEs (µU/mL)	388 (372-400)

Tabla 1. Características antropométricas y metabólicas más importantes de los individuos normoglucémicos supuestamente sanos empleados para estimar el valor de referencia para la concentración sérica de AGEs. Los datos se presentan como media (IC95%).

Con esta muestra poblacional, se estableció la distribución en percentiles de las concentraciones circulantes de AGEs, que se muestra en la tabla 2.

Percentile	Centile	-Binom. Interp.- [95% Conf. Interval]
2.5	88.01	82.21 99.06
25	214.69	204.86 225.77
50	352.64	330.56 371.68
75	495.51	475.90 520.76
95	845.45	773.44 906.81
97.5	931.90	908.74 1051.51

Tabla 2. Distribución en percentiles y sus correspondientes centiles expresados como media (IC95%) de las concentraciones circulantes de AGEs en 1,013 sujetos controles supuestamente sanos.

A partir de este análisis se puede definir que una población se sujetos sanos de entre 20 y 86 años de edad, en general deben tener concentraciones séricas de AGEs menores 1000 µU/mL.

Pero como es sabido, el proceso de envejecimiento es un factor que contribuye a la formación de AGEs; para estudiar la asociación entre las concentraciones séricas de AGEs derivado de glucosa y la edad de los sujetos, se emplearon los datos de los sujetos controles normoglicémicos supuestamente sanos anteriormente descritos. Los resultados se muestran en la figura 13, donde se puede comprobar que el proceso de envejecimiento conduce a un incremento en las concentraciones séricas de AGEs, que es detectado por nuestro método desarrollado.

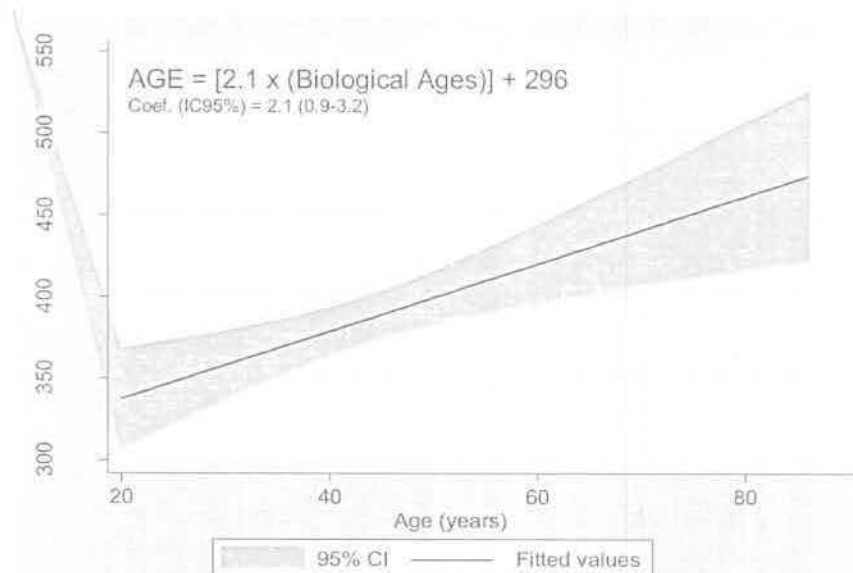


Figura 13. Asociación entre las concentraciones séricas de AGEs derivado de glucosa y la edad en individuos controles supuestamente sanos. Se muestra la recta de regresión que describe dicha asociación y sus intervalos de confianza al 95%.

De la ecuación de regresión obtenida, se pudo estimar la tabla de valores de AGEs derivados de glucosa en función de la edad para la población control. Para ello los datos fueron divididos en rangos de 5 años de edades. Los valores de edades iniciales y finales de cada rango fueron sustituidos en la ecuación de regresión para estimar la concentración de AGEs esperada para cada intervalo de edades (Tabla 3).

Edad Biológica	n	Concentración Esperada de AGEs ($\mu\text{U/mL}$); (CI95%)
20-25	54	338-348; (314-376)
26-30	84	351-359; (319-392)
31-35	151	361-370; (324-408)
36-40	158	372-380; (328-424)
41-45	184	382-391; (333-440)
46-50	158	393-401; (337-456)
51-55	109	403-412; (342-472)
56-60	85	414-422; (346-488)
61-65	61	424-432; (351-504)
66-70	25	435-443; (355-520)
71-75	14	445-454; (360-536)
76-90	10	456-485; (364-584)

Tabla 3. Concentraciones séricas de AGEs por quinquenios de edades. Los datos se expresan como el rango de concentraciones esperadas para la edad inicial y final de cada quinquenio descrito. Se muestra entre paréntesis los límites inferiores y superiores del intervalo de confianza al 95%.

Los resultados sugieren que a pesar del valor obtenido de 1000 $\mu\text{U/mL}$ de AGEs para el percentile 97.5, considerado el valor máximo esperado para la población control normoglucémica supuestamente sana total, al dividir los datos por grupos de edades y expresar las concentraciones en intervalos de confianza al 95% de la media, los individuos sanos tienen en general, concentraciones circulantes de AGEs menores a 600 $\mu\text{U/mL}$. Estos valores esperados para la concentración de AGEs en función de la edad, son una herramienta útil para detectar cualquier incremento de las concentraciones circulantes de AGEs, que pudieran reflejar una alteración crónica del estado de control glucémico de los pacientes diabéticos. Incrementos mayores a estos valores esperados pueden ser considerados un indicador temprano de la acumulación nociva de alteraciones moleculares y tisulares silenciosas; que si se presta la atención médica adecuada, se pudiera contribuir a evitar el desarrollo y progresión de las complicaciones crónicas de la diabetes mellitus.

Para estudiar la relación entre las concentraciones circulantes de AGEs y el estado metabólico de los individuos, se emplearon los datos de la cohorte de trabajadores del seguro social. La tabla 4 muestra los cambios en el estado metabólico durante los 10 años del estudio, de los 1,451 sujetos pertenecientes a la cohorte.

Medición del 2004-2006	Medición del 2010-2012			Total
	NG	IR	DM	
NG	<u>791</u>	168	41	1,000 (68.92%)
IR	138	<u>131</u>	56	325 (22.40%)
DM	0	0	<u>126</u>	126 (8.68%)
Total	929 (64.02%)	299 (20.61%)	223 (15.37%)	1,451 (100%)

Tabla 4. Cambios en el estado metabólico de los pacientes de la cohorte a lo largo de los 10 años del estudio. En negritas y subrayado se muestran la cantidad de sujetos que se mantuvieron en ambas mediciones en la misma condición metabólica: normoglucémicos (NG), insulino resistentes (IR) and diabéticos (DM).

Durante la primera medición entre los años 2004-2006, la muestra de estudio estuvo compuesta por un total de 1,000 sujetos normoglucémicos, 325 con resistencia a la insulina y 126 diabéticos. Entre 2010-2012, el estado metabólico de algunos de estos sujetos se deterioró y migró a otras condiciones metabólicas: sólo 929 de ellos eran normoglucémicos, 299 fueron resistentes a la insulina y se observó un aumento en los sujetos que desarrollaron diabetes mellitus tipo 2, que para entonces eran 223 pacientes en lugar de los 126 que habían entre los años 2004-2006. A lo largo de 10 años, el número de pacientes con diabetes mellitus casi se duplicó. Esto muestra la magnitud del aumento en la prevalencia de esta enfermedad metabólica, que sin duda se ha convertido en una epidemia mundial.

Los cambios prospectivos en las concentraciones circulantes de AGEs en función del estado metabólico de los sujetos de la cohorte se muestran en la tabla 5.

Parámetros	NG (n=791)		IR (n=131)		DM (n=126)	
	^a Medición 1	^b Medición 2	^c Medición 1	^d Medición 2	^e Medición 1	^f Medición 2
Glucosa (mg/dL)	87 ^{a,c,d,e,f} (86-88)	93 ^{a,d,e,f} (92-94)	95.6 ^{a,b,f} (94.1-97.3)	101.6 ^{a,b,c,d,f} (100.0-103.3)	156.7 ^{a,b,c,d,f} (145.8-167.6)	161.3 ^{a,b,d,e,f} (149.6-173.0)
Insulina (µU/mL)	3.9 ^{a,c,d,f} (3.7-4.1)	4.7 ^{a,c,d,f} (4.5-4.8)	19.4 ^{a,b,c,d,f} (17.4-21.5)	19.4 ^{a,b,c,d,f} (18.5-22.2)	15.4 ^{a,b,c,d,f} (12.6-18.2)	12.7 ^{a,b,c,d,f} (9.9-15.6)
HOMA-IR	0.85 ^{a,c,d,e,f} (0.80-0.89)	1.08 ^{a,c,d,e,f} (1.03-1.12)	4.61 ^{a,b,c,d,f} (4.09-5.14)	4.84 ^{a,b,c,d,f} (4.19-5.49)	6.41 ^{a,b,c,d,f} (4.75-8.07)	5.06 ^{a,b,c,d,f} (3.94-6.18)
AGEs (µU/mL)	301 ^{a,b,c,d,e,f} (284-318)	413 ^{a,b} (392-436)	338 ^a (294-387)	457 ^a (399-524)	458 ^a (396-530)	609 ^{a,b,c} (533-696)
Creatinina	0.70 ^{a,b} (0.69-0.71)	0.73 ^a (0.72-0.75)	0.74 (0.72-0.76)	0.76 ^a (0.73-0.79)	0.70 (0.68-0.73)	0.74 (0.70-0.79)
TFG (mL/min/1.73m ²)	106.4 ^{b,c,d,e,f} (105.1-107.7)	102.0 ^{a,b,c,d,e,f} (100.6-103.3)	94.1 ^{a,b} (91.4-96.7)	90.6 ^{a,b} (87.6-93.5)	93.4 ^{a,b} (90.6-96.1)	92.1 ^{a,b} (88.4-95.9)
Estadios de Daño Renal						
[n(%)]						
1-Daño renal con una TFG normal o incrementada (≥ 90 mL/min/1.73m ²)	809 (80.90)	557 (70.72)	191 (58.77)	183 (61.20)	80 (63.49)	138 (61.88)
2-Daño renal con una TFG ligeramente disminuida (60-89 mL/min/1.73m ²)	185 (18.50)	259 (27.88)	134 (41.23)	108 (36.12)	42 (33.33)	74 (33.18)
3-TFG moderadamente disminuida (30-59 mL/min/1.73m ²)	6 (0.60)	12 (1.29)	---	8 (2.68)	4 (3.17)	10 (4.48)
4-TFG gravemente disminuida (15-29 mL/min/1.73m ²)	---	---	---	---	---	1 (0.45)
5-Falla renal (< 15 mL/min/1.73m ² o diálisis)	---	1 (0.11)	---	---	---	---

Tabla 5. Cambios en los parámetros de control glucémico, de la tasa de filtración glomerular (TFG), de los diferentes estadios de daño renal según las guías K/DOQI del 2002 y de las concentraciones séricas de AGEs en los pacientes de la cohorte divididos en función de su estado metabólico. Se muestran los resultados de la primera y la segunda medición realizada 10 años después. Los resultados se presentan como media (IC95%). Las letras muestran con que grupos son diferentes cada parámetro metabólico evaluado.

Como se puede observar en la tabla 5, los resultados obtenidos al analizar los individuos cuya condición metabólica se mantuvo estable a lo largo de los 10 años del estudio, no muestran cambios significativos en las concentraciones séricas de creatininas, ni en la tasa de filtración glomerular estimada. De hecho a lo largo de todo el estudio, incluso en el grupo de pacientes diabéticos, las concentraciones séricas de creatininas nunca aumentaron por encima del valor de referencia para este parámetro metabólico. Mientras que solamente alguno pocos individuos del grupo de pacientes con resistencia a la insulina y con diabetes mellitus, mostraron una leve reducción de la tasa de filtración glomerular por debajo de 90 mL/min/1.73 m². En cambio, las concentraciones circulantes de AGEs mostraron en todos los grupos un incremento importante a lo largo de los 10 años del estudio. Se puede observar que en el grupo de individuos normoglucémicos el incremento fue de 112 µU/mL que representa un incremento del 37.2% con respecto al valor inicial, 10 años antes. En el grupo de pacientes con resistencia a la insulina, el incremento fue de 119 µU/mL que es un 35.2% mayor al valor inicial y finalmente en el grupo diabético se observó un incremento de 151 µU/mL, que representa un incremento de 33% con respecto a las concentraciones de AGEs que tenía este grupo 10 años antes.

Si bien los porcentajes de incrementos de las concentraciones circulantes de AGEs en todos los grupos estudiados a lo largo de 10 años rondaron el 35%, hay que considerar que las concentraciones iniciales y finales son diferentes en cada grupo de estudio y son mayores mientras mayor es el estado de descontrol glucémico y metabólico en general. De hecho es relevante el hecho de que las concentraciones de AGEs del grupo diabético al inicio del estudio ya eran mayores o iguales que las concentraciones finales de los grupos normoglicémico y con resistencia a la insulina 10 años después. Esto sugiere que las concentraciones circulantes de

AGEs pueden ser una herramienta de mucha utilidad ya que refleja el estado de control glucémico de los pacientes durante un muy largo periodo de tiempo.

Por otro lado, se puede observar que incluso en los sujetos pertenecientes al grupo diabético que mantuvieron la misma condición metabólica a lo largo de los 10 años, y que no mostraron reducciones significativas en la tasa de filtración glomerular, las concentraciones séricas máximas de AGEs en la segunda medición, que representa al menos 10 años de evolución de la diabetes, fueron de alrededor de 700 $\mu\text{U}/\text{mL}$, inferiores al límite de referencia estimado en el grupo control normoglucémico supuestamente sano, pero mayores al valor esperado para la edad de los sujetos. De ahí la importancia de evaluar las concentraciones circulantes de AGEs en función de la edad biológica según la tabla 3, para poder asociar los incrementos en las concentraciones circulantes de AGEs y las modificaciones silentes en las estructuras moleculares y tisulares que inducen la formación de AGEs y que contribuyen al desarrollo de las complicaciones crónicas de la diabetes mellitus.

Al realizar un análisis más detallado al subdividir los sujetos de la cohorte en función del estado de control glucémico y su condición metabólica, los resultados demuestran más claramente la validez de la medición de AGEs por el método desarrollado. La tabla 6, muestra las características clínicas y metabólicas de los sujetos pertenecientes a la cohorte divididos en función del estado metabólico y del grado de control glucémico.

Parámetros	^a NG n= 1,600	^b NG IR n= 331	^c DM BC n= 43	^d DTG n= 622	^e DM MC n= 80	^f DM NC n= 226
Indicadores Clínicos						
Edad (años)	47.6 (47.0-48.3) ^{a,d,e,f}	47.8 (46.5-49.2) ^{a,d,e,f}	55.1 (51.2-59.0) ^{a,b}	52.8 (51.8-53.7) ^{a,b,e,f}	60.8 (58.4-63.2) ^{a,b,d}	57.8 (56.4-59.2) ^{a,b,d}
Mujeres n (%)	1,321 (82.6) ^{b,d,f}	230 (69.5) ^a	33 (76.7)	410 (65.9) ^a	57 (71.2)	166 (73.4) ^a
Hombres n (%)	279 (17.4) ^{b,d,f}	101 (30.5) ^a	10 (23.3)	212 (34.1) ^a	23 (28.8)	60 (26.6) ^a
Peso (Kg)	83.2 (62.6-63.7) ^{b,c,d,e,f}	74.6 (73.0-76.2) ^{a,d}	71.9 (67.5-76.3) ^a	71.5 (70.4-72.5) ^{a,b}	70.9 (67.9-73.8) ^a	72.2 (70.2-74.3) ^a
Estatura (cm)	157.7 (157.3-158.1) ^{b,d}	159.7 (158.7-160.7) ^{a,f}	155.9 (153.6-158.2)	159.0 (158.3-159.8) ^a	157.4 (155.5-159.3)	157 (156-158)
Circunferencia de cintura (cm)	88.1 (87.6-88.6) ^{b,c,d,e,f}	97.3 (96.0-98.6) ^a	99.3 (95.4-103.2) ^a	95.6 (94.7-96.4) ^{a,b,f}	100.1 (97.7-102.5) ^{a,d}	99.3 (97.7-101.0) ^{a,b}
MC	25.4 (25.2-25.5) ^{b,c,d,e,f}	29.2 (28.7-29.7) ^{a,d}	29.6 (27.9-31.1) ^a	28.2 (27.9-28.5) ^{a,b,f}	28.5 (27.6-29.5) ^a	29.2 (28.5-29.9) ^{a,d}
Grasa corporal (%)	31.4 (31.0-31.9) ^{b,c,d,e,f}	35.9 (34.8-36.9) ^a	36.1 (33.8-38.4) ^a	35.3 (34.5-36.1) ^a	36.9 (34.4-39.4) ^a	37.4 (36.0-38.8) ^a
Área de superficie corporal (m ²)	1.66 (1.65-1.67) ^{b,c,d,e,f}	1.81 (1.79-1.84) ^{a,d}	1.76 (1.70-1.82) ^a	1.77 (1.76-1.79) ^{a,b}	1.75 (1.71-1.80) ^a	1.77 (1.74-1.80) ^a
Presión arterial sistólica (mm Hg)	115.9 (115.2-116.7) ^{b,c,d,e,f}	120.4 (118.8-122.0) ^{a,f}	127.0 (120.8-133.1) ^a	122.5 (121.2-123.8) ^a	125.3 (122.4-128.3) ^a	125.4 (123.5-127.2) ^{a,b}
Presión arterial diastólica (mm Hg)	70.9 (70.4-71.4) ^{b,c,d,e,f}	74.1 (73.0-75.2) ^a	73.2 (69.8-76.6)	75.3 (74.4-76.2) ^a	74.4 (72.5-76.4) ^a	74.6 (73.3-75.8) ^a
Indicadores Metabólicos						
Glucosa (mg/dL)	87.7 (87.3-88.0) ^{b,d,e,f}	91.5 (90.9-92.1) ^{a,d,e,f}	88.0 (85.7-90.3) ^{a,b,f}	106.6 (106.2-107.1) ^{a,b,c,d,f}	111.1 (109.5-112.7) ^{a,b,c,d,f}	182.9 (175.3-190.4) ^{a,b,c,d,e}
Insulina (µU/mL)	4.5 (4.4-4.6) ^{b,c,d,e,f}	11.7 (17.2-20.1) ^{a,c,d,e,f}	9.6 (7.1-12.1) ^{a,b,f}	11.1 (10.3-11.8) ^{a,b,f}	12.0 (9.7-14.2) ^{a,b,f}	15.8 (13.6-18.0) ^{a,b,c,d,e}
Índice HOMA-IR	0.97 (0.94-1.00) ^{b,c,d,e,f}	4.2 (3.9-4.5) ^{a,c,d,e,f}	2.1 (1.6-2.6) ^{b,f}	2.9 (2.7-3.1) ^{a,b,f}	3.3 (2.7-3.8) ^{a,f}	7.0 (5.9-8.1) ^{a,b,c,d,e}
Triglicéridos (mg/dL)	144 (141-148) ^{b,d,e,f}	222.2 (205.5-238.9) ^{a,c,d}	162 (139-185) ^{b,f}	196.5 (187.3-205.7) ^{a,b,f}	247 (152-231) ^{a,f}	247 (221-274) ^{a,b,c,d,e}
Colesterol (mg/dL)	196 (194-198) ^{d,f}	199.7 (195.5-203.9) ^a	188 (179-193) ^{b,f}	208 (205-211) ^{a,b,c}	197 (188-207)	209 (203-215) ^{a,c}
HDL-Colesterol (mg/dL)	43.0 (42.4-43.6) ^b	39.7 (37.2-42.2) ^a	41.1 (37.9-44.3)	42.0 (41.1-42.8)	42.3 (40.1-44.5)	40.5 (39.1-42.0)
LDL-Colesterol (mg/dL)	122.5 (120.7-124.3) ^a	124.9 (120.7-129.0) ^d	116.2 (105.9-126.4) ^{a,d}	122.9 (126.9-132.8) ^{a,b,c}	122.9 (115.2-130.5)	126.6 (121.8-131.3)
Ácido Úrico (mg/dL)	4.7 (4.6-4.8) ^{b,c,d,e,f}	5.6 (5.4-5.7) ^a	5.3 (4.9-5.8) ^a	5.6 (5.4-5.7) ^{a,f}	5.7 (5.4-5.9) ^a	5.2 (5.0-5.4) ^{a,f}
Creatinina (mg/dL)	0.71 (0.70-0.72) ^f	0.73 (0.72-0.75)	0.75 (0.68-0.81)	0.75 (0.74-0.76) ^{a,f}	0.74 (0.69-0.78)	0.71 (0.68-0.74) ^a
TFG (mL/min/1.73m ²)	104.5 (103.6-105.4) ^{b,c,d,e,f}	94.5 (93.7-97.2) ^a	92.4 (86.3-96.7) ^a	94.2 (92.9-95.5) ^a	90.6 (86.7-94.6) ^a	94.1 (91.7-96.5) ^a
AGEs (µU/mL)	342 (329-356) ^{a,f}	379 (346-416) ^f	379 (310-463) ^f	421 (399-444) ^f	527 (440-631) ^a	559 (507-616) ^{a,b,c,d}
Estadios de Daño Renal [n(%)]						
1- Daño renal con una TFG normal o incrementada (≥ 90 mL/min/1.73m ²)	1,252 (78.56)	211 (63.75)	29 (67.44)	372 (59.81)	49 (61.25)	140 (61.95)
2- Daño renal con una TFG ligeramente disminuida (60-89 mL/min/1.73m ²)	332 (20.75)	116 (35.65)	10 (23.26)	236 (37.94)	28 (35.00)	78 (34.51)
3- TFG moderadamente disminuida (30-59 mL/min/1.73m ²)	10 (0.63)	2 (0.60)	4 (9.30)	14 (2.25)	3 (3.75)	7 (3.10)
4- TFG gravemente disminuida (15-29 mL/min/1.73m ²)	---	---	---	---	---	1 (0.44)
5- Falta renal (< 15 mL/min/1.73m ² o diálisis)	1 (0.06)	---	---	---	---	---

Tabla 6. Características clínicas, metabólicas y de la función renal en sujetos pertenecientes a la cohorte subdivididos en función de sus estados de control glucémico: ^aNG: sujetos normogluccémico, ^bIR: sujetos con resistencia a la insulina, ^cDM BC: Sujetos diabéticos bien controlados, ^dDTG: sujetos no diabéticos con deterioro de la tolerancia a la glucosa, ^eDM MC: sujetos diabéticos con un control glucémico moderado, ^fDM NC: sujetos diabéticos con un mal control glucémico. Prueba de Bonferroni para diferencias entre medias. Las letras denotan con que grupos son diferentes con p<0.05. Resultados expresados como medias (IC95%). Los criterios para establecer los diferentes grupos están descritos en materiales y métodos. Las letras muestran con que grupos son diferentes cada parámetro metabólico evaluado.

Como se puede observar, la medición de AGEs derivado de glucosa por el método desarrollado en nuestro laboratorio reporta concentraciones circulantes de AGEs que están estrechamente asociadas con el grado de control glucémico; y son mayores a medida que aumenta el estado de descontrol glucémico de los pacientes. Este incremento en las concentraciones circulantes de AGEs es independiente de otras condiciones distintas al estado glucémico, ya que como se puede observar en la tabla 6, no existen grandes diferencias entre los indicadores clínicos y el resto de las variables metabólicas estudiadas, tales como el perfil lipídico, el ácido úrico, la creatinina y la tasa de filtración glomerular, entre los diferentes grupos de estudio. Estos resultados reafirman el concepto conocido que el adecuado control glucémico del paciente evita el desarrollo de las complicaciones crónicas, pues como se puede observar incluso los pacientes diabéticos con un estricto control glucémico mostraron concentraciones séricas de AGEs iguales a las de los sujetos controles normoglucémicos.

De la misma forma en que se deterioró el estado metabólico a lo largo de los 10 años de estudio, la función renal mostró cambios entre los sujetos estudiados. La tabla 7 muestra la división de los 1,451 sujetos en la cohorte de acuerdo con su tasa de filtración glomerular ajustado por área de superficie corporal en la primera y segunda medición, según las clasificaciones de las guías K/DOQI del 2002.

Medición del 2004-2006	Medición del 2010-2012					Total
	1	2	3	4	5	
1	885	191	4	0	0	1,080 (74.43%)
2	92	249	20	0	0	361 (24.88%)
3	1	1	6	1	1	10 (0.69%)
Total	978 (67.40%)	441 (30.39%)	30 (2.07%)	1 (0.07%)	1 (0.007)	1,451 (100%)

Tabla 7. Cambios en la tasa de filtración glomerular de los pacientes de la cohorte a lo largo de los 10 años del estudio. En negritas y subrayado se muestran la cantidad de sujetos que se mantuvieron en ambas mediciones en la misma clasificación de daño renal según las guías K/DOQI del 2002.

Se puede observar la disminución de los porcentajes de los individuos con tasa normal (≥ 90 mL/min/1.73m²) en la segunda medición y los consecuentes incrementos en las otras categorías que reflejan un leve deterioro de la función renal de estos pacientes a lo largo del estudio, propio del proceso de envejecimiento.

Para establecer una primera interrelación entre los principales parámetros de control glucémico, las concentraciones séricas de AGEs y el estado de la función renal, se emplearon los datos totales de la primera y segunda medición, un total de 2,902 mediciones. Los individuos fueron clasificados y agrupados según su magnitud de tasa de filtración glomerular al momento de la toma de la muestra, en un grupo que hiperfiltraba (TFG >120 mL/min/1.73 m²), en un grupo con TFG normal (90-120 mL/min/1.73 m²) y un grupo de individuos con una reducción de la TFG (<90 mL/min/1.73 m²) y se compararon entre los grupos sus principales parámetros de control glucémico y las concentraciones séricas de AGEs, los resultados se muestran en la tabla 8.

Parámetros	^a Hiperfiltración (TFG >120 mL/min/1.73m ²) (n=414)	^b Filtración Normal (TFG 90-120 mL/min/1.73m ²) (n=1644)	^c Disminución de la Filtración (TFG < 90 mL/min/1.73m ²) (n=844)
Glucosa (mg/dL)	93.4 (90.3-96.5) ^{b,c}	99.8 (98.3-101.2) ^{a,c}	104.4 (102.4-106.5) ^{a,b}
Insulina (μU/mL)	5.9 (5.1-6.8) ^{b,c}	8.4 (7.9-8.9) ^{a,c}	10.4 (9.8-11.1) ^{a,b}
HOMA-IR	1.6 (1.2-2.0) ^{b,c}	2.2 (2.1-2.4) ^{a,c}	2.8 (2.6-3.0) ^{a,b}
AGEs (μU/mL)	289 (267-313) ^{b,c}	364 (351-378) ^{a,c}	477 (453-502) ^{a,b}

Tabla 8. Relación entre las concentraciones circulantes de AGEs y los principales parámetros de control glucémicos con el estado de filtración glomerular en los pacientes de la cohorte estudiada. Los resultados de expresan en medias (IC95%). Las letras muestran con que grupos son diferentes cada parámetro metabólico evaluado.

Como se puede observar, tanto los parámetros de control glucémico como los AGEs son menores en el grupo que hiperfiltraba, esto puede ser explicado por el hecho que una mayor tasa de filtración glomerular, favorece la eliminación renal de glucosa y por tanto mejora el estado de control metabólico, disminuye la tasa de formación de AGEs, además de favorecer su eliminación por el riñón. No obstante, esta no es una condición normal, puede ser transitoria, pero generalmente va acompañada de daños estructurales de la membrana basal glomerular y es seguida del inicio del deterioro de la función renal. Por su parte, los individuos con TFG disminuida (<90 mL/min/1.73m²), mostraron un incremento en las concentraciones circulantes de glucosa y de AGEs, acompañado de un deterioro de los parámetros de control glucémico, como la insulinemia y el índice de resistencia a la insulina. Estos resultados confirman el hecho conocido de la estrecha interrelación entre el control glucémico y la función renal. Así mismo demuestra la capacidad del método analítico desarrollado, para detectar diferencias en las concentraciones de circulantes de AGEs en función de la condición metabólica y de la tasa de filtración glomerular de los sujetos.

La tabla 9 muestra la asociación entre los principales parámetros de control glucémico, las concentraciones circulantes de AGEs y la tasa de filtración glomerular en los sujetos de la cohorte divididos en tres categorías de filtración glomerular.

Parámetro	TFG >120 mL/min/1.73m ² (n=414) Rho (p)	TFG 90-120 mL/min/1.73m ² (n=1644) Rho (p)	TFG <90 mL/min/1.73m ² (n=844) Rho (p)
Glucosa (mg/dL)	-0.0658 (0.1816)	-0.0785 (0.0014)	-0.0214 (0.5346)
Insulina (μU/mL)	-0.0688 (0.1625)	-0.0815 (0.0009)	-0.0338 (0.3284)
HOMA-IR	-0.0179 (0.7172)	-0.0825 (0.0008)	-0.0268 (0.4388)
AGEs (μU/mL)	0.0147 (0.7660)	-0.0171 (0.4873)	-0.2925 (< 0.0001)

Tabla 9. Correlación de parámetros de control glucémico, AGEs y la tasa de filtración glomerular. Los resultados se expresan como coeficiente Rho (p).

Se puede observar que las concentraciones circulantes de AGEs correlacionan muy significativamente con la tasa de filtración glomerular, cuando existe una disminución de la función renal, aunque esta sea apenas una reducción leve. Lo que reafirma el concepto de que la reducción de capacidad de filtración glomerular favorece la acumulación de AGEs en la circulación. Esta acumulación de AGEs en la circulación a su vez puede favorecer su

deposición en la matriz extracelular de los tejidos y órganos tales como el propio riñón, lo que a su vez puede generar alteraciones en su funcionamiento contribuyendo a una mayor acumulación de AGEs.

Debido a que la frecuencia de daño renal fue muy baja y que el daño renal observado fue solo de leve a moderado entre los sujetos de la cohorte estudiada, como se puede observar en las tablas 5 y 6, decidimos reclutar otros pacientes intrahospitalarios de los servicios de diabetes y nefrología y establecer un estudio de casos y controles, que permitiera evaluar el valor diagnóstico de la medición de AGEs para predecir el daño renal crónico en el paciente diabético.

Como era de esperar, las concentraciones circulantes de creatinina y urea fueron mayores, así como las concentraciones séricas de la hormona paratiroidea (PTH), un marcador típico de la nefropatía crónica en el grupo de diabéticos con daño renal. Así mismo, las concentraciones séricas de AGEs en los pacientes diabéticos fueron significativamente mayores comparadas con las del grupo normoglucémico control. Estos incrementos en las concentraciones séricas de AGEs en los pacientes diabéticos, son aún mucho mayores en los pacientes que sufren daño renal crónico (Tabla 8).

Parámetros	^a NG (n=148)	^b DM Sin Nefropatía (n=100)	^c DM con Nefropatía (n=147)
Glucosa (mg/dL)	80 (78-82) ^{b,c}	141 (127-154) ^{a,c}	99 (92-105) ^{a,b}
Insulina (μUI/mL)	3.08 (2.60-3.55) ^{b,c}	9.59 (3.68-15.50) ^a	8.41 (6.08-10.73) ^a
HOMA-IR	0.60 (0.51-0.69) ^b	3.94 (0.93-6.94) ^a	2.06 (1.54-2.58)
AGEs (μU/mL)	406 (493-619) ^c	615 (513-718) ^c	2943 (2555-3332) ^{a,b}
Creatinina (mg/dL)	0.94 (0.92-0.96) ^c	0.77 (0.73-0.81) ^c	10.88 (9.22-12.55) ^{a,b}
Ácido Úrico (mg/dL)	5.96 (5.73-6.19) ^{b,c}	5.26 (5.02-5.51) ^{a,c}	7.04 (6.69-7.39) ^{a,b}
Urea (mg/dL)	29.2 (28.0-30.3) ^c	30.2 (27.8-32.6) ^c	131.1 (123.5-138.8) ^{a,b}
Colesterol(mg/dL)	187 (179-195)	184 (176-193)	176 (168-185)
Triglicéridos (mg/dL)	90 (79-100) ^{b,c}	163 (140-186) ^{a,c}	199 (177-222) ^{a,b}
HbA1c (%)	---	8.1 (7.6-8.6)	7.5 (6.4-8.5)
PTH (pg/mL)	---	---	638 (561-715)

Tabla 8. Parámetros metabólicos, concentraciones circulantes de AGEs y HbA1c en pacientes normoglucémicos, y diabéticos sin y con daño renal crónico. Las letras muestran con que grupos son diferentes cada parámetro metabólico evaluado.

Por otro lado, se puede observar que la progresión del deterioro de la función renal a estadios más avanzados e irreversibles, se acompaña de un incremento en las concentraciones circulantes de AGEs, no así de las de glucosa, ni de los parámetros de control glucémico estudiados, ni de las concentraciones circulantes de HbA1c. Esto puede ser explicado por el hecho de que cuando los pacientes diabéticos comienzan a filtrar menos, se sienten mal por estar su sangre llena de productos tóxicos del metabolismo; y pierden el apetito por lo que la ingesta de carbohidratos se frena y por tanto mejoran los parámetros de control glucémicos como la insulinemia y el índice HOMA y la velocidad de glicosilación de la hemoglobina disminuye; también porque estos paciente de seguro están sujetos a un control médico más estricto. Además, debido al recambio de los eritrocitos que transportan a la hemoglobina, si la reducción del filtrado y por tanto el incremento en la toxicidad sanguínea ya se ha instalado meses atrás, la reducción de la glicación de la hemoglobina es más marcada. Por otro lado, la hemoglobina glicosilada es un producto de Amadori, una estructura que es reversible; si las concentraciones séricas de glucosa disminuyen, la hemoglobina glicosilada se desglicosila espontáneamente. Es por esto que no se observan grandes diferencias en la concentración de hemoglobina glicosilada entre los pacientes diabéticos sin daño renal y con daño renal crónico.

Por el contrario, la formación de AGEs es un proceso que si bien es más lento, ocurre sobre moléculas de vida media mayor a la de hemoglobina y como su propio nombre lo sugiere: "productos finales de glicación avanzada", son estructuras molecularmente más complejas que son irreversibles, y una vez formadas no se disocian aunque las concentraciones séricas de glucosa disminuyan. Por otro lado, cuando se establece el daño renal crónico, disminuye marcadamente la tasa de filtración glomerular y por tanto la velocidad de eliminación de los AGEs y de sus subproductos de degradación por el riñón, lo que conlleva a su acumulación en el torrente sanguíneo. Estos resultados demuestran que si bien la hemoglobina glicosilada es un buen marcador para evaluar el control glucémico del paciente diabético a corto plazo (hasta 3 meses), los AGEs son mejores marcadores del descontrol prolongado (hasta 1 año) del estado glucémico y de los daños estructurales silenciosos y acumulativos que conducen a estadios más avanzados de la pérdida de la función renal.

En la tabla 9 se puede observar que ninguno de los parámetros de control glucémico estudiados, se correlacionan con las concentraciones séricas de creatinina, por lo que no son buenos para evaluar el grado de alteración de la función renal en los pacientes diabéticos. Por el contrario, se puede observar que las concentraciones circulantes de AGEs si se asocian con las concentraciones séricas de creatinina, tanto en el grupo de diabéticos donde aún no se ha manifestado la nefropatía crónica, pero más significativamente en el grupo con nefropatía diabética crónica.

Parámetro vs Creatinina	NG (n=148) Rho (p)	DM Sin Nefropatía (n=100) Rho (p)	DM con Nefropatía (n=147) Rho (p)
Glucosa (mg/dL)	0.0616 (0.4573)	-0.0747 (0.4603)	-0.0878 (0.2903)
Insulina (μ UI/mL)	-0.0425 (0.6077)	-0.0571 (0.5725)	-0.0896 (0.2835)
HOMA-IR	-0.0204 (0.857)	-0.0275 (0.7857)	-0.1088 (0.1894)
AGEs (μ UI/mL)	-0.1113 (0.1782)	0.2093 (0.0366)	0.2881 (0.0004)
PTH (pg/mL)	---	----	0.2860 (0.0004)

Tabla 9. Correlación de parámetros de control glucémico, concentración sérica de AGEs y de PTH con la creatinina sérica. Los resultados se expresan como coeficiente Rho (p).

Lo más interesante es que el grado de asociación entre las concentraciones séricas de AGEs y las de creatinina durante la nefropatía diabética crónica, es similar tanto en magnitud como en significancia estadística, a la asociación de las concentraciones circulantes de PTH, un marcador muy específico de daño renal crónico, y la creatinina sérica. Se sabe que cuando el daño renal crónico se establece, hay una pérdida renal continua de calcio, debido a la disminución de la reabsorción renal de calcio, y por la disminución de la producción renal de la forma activa de la vitamina D, por lo que disminuye significativamente la absorción intestinal de calcio; generándose una hipocalcemia que es detectada por la glándula paratiroidea la que responde con un incremento en la secreción de PTH que favorece la salida de calcio del hueso para compensar la hipocalcemia sistémica. Esta estrecha asociación tiene un realce mayor si consideramos que la PTH solo se eleva una vez que el daño renal se ha establecido, en cambio los AGEs se van acumulando progresivamente a lo largo de los años y se encuentran significativamente elevados desde antes que el daño renal tenga manifestaciones, de ahí la importancia del monitoreo sistemático de las concentraciones circulantes de AGEs para predecir cuales pacientes tendrán mayores probabilidades de desarrollar el daño renal y/u otras complicaciones crónicas asociadas a la Diabetes Mellitus.

La figura 14, muestra la curva ROC que describe la relación entre la especificidad y la sensibilidad de la medición sérica de AGEs para predecir la presencia de nefropatía diabética crónica es decir tener concentraciones séricas de creatinina mayores a 1.3 mg/dL.

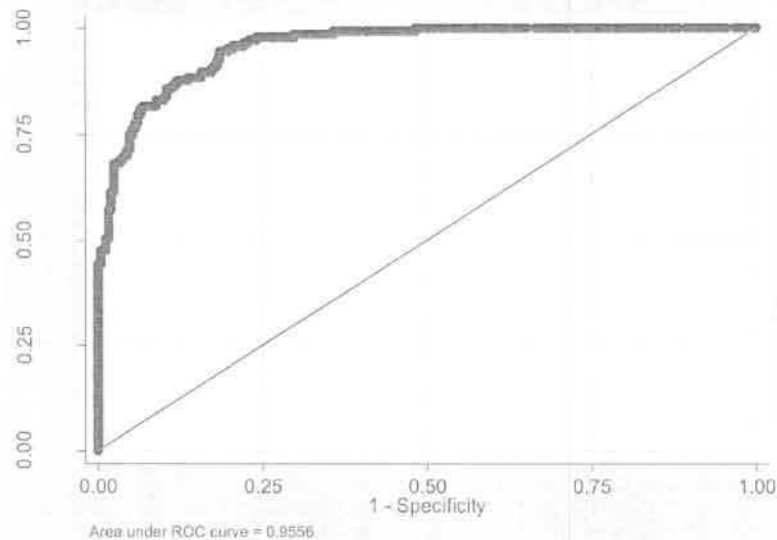


Figura 14. Curva de ROC que describe la especificidad y sensibilidad de la medición de AGEs para predecir la presencia de nefropatía crónica en sujetos con concentraciones séricas de creatininas mayores a 1.3 mg/dL.

Se puede ver que el área debajo de la curva es muy amplia y abarca cerca de 96%. Un análisis más preciso de la interrelación entre la especificidad y la sensibilidad para predecir el daño renal crónico en el paciente diabético, se muestra en la figura 15.

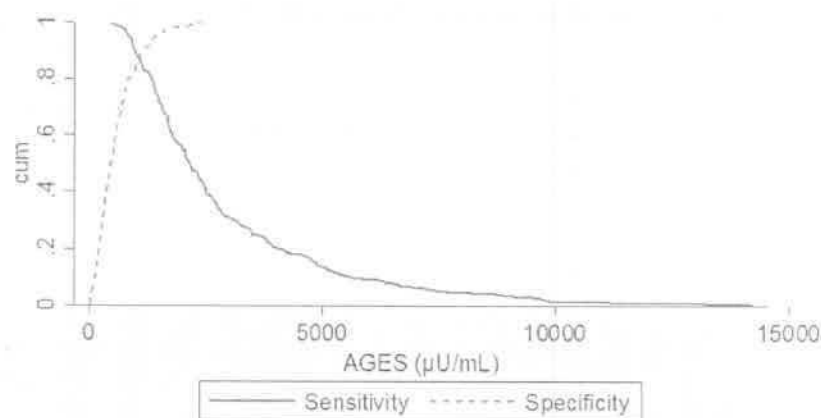


Figura 15. Relación entre la especificidad y sensibilidad de la medición de AGEs séricos para predecir el daño renal crónico en sujetos con concentraciones séricas de creatininas mayores a 1.3 mg/dL.

Se puede observar que la relación óptima entre la especificidad y sensibilidad se obtiene a una concentración de AGEs de alrededor de 1000 $\mu\text{U}/\text{mL}$ (1042), similar a la estimada para el valor de corte de la población control normoglucémica supuestamente sana. Los análisis estadísticos mostraron que el método utilizando un valor de corte de 1000 $\mu\text{U}/\text{mL}$ de AGEs tiene una sensibilidad de 82% y una especificidad de 93% (Tabla 10).

Logistic model for creatinine>1.3
 Number of observations = 395
 Area under ROC curve = 0.9556
 Lsttat
 Logistic model for creatinine>1.3

Classified	True		Total
	D	\bar{D}	
+	120	17	137
-	27	231	258
Total	147	248	395

Classified + if predicted $\text{Pr}(D) \geq .5$
 True D defined as creatinine>1.3

Sensibility	$\text{Pr}(+/D)$	81.63%
Specificity	$\text{Pr}(-/\bar{D})$	93.15%
Positive predictive value	$\text{Pr}(D/+)$	87.59%
Negative predictive value	$\text{Pr}(\bar{D}/-)$	89.53%
False + rate for true \bar{D}	$\text{Pr}(+/\bar{D})$	6.85%
False - rate for true D	$\text{Pr}(-/D)$	18.37%
False + rate for classified +	$\text{Pr}(\bar{D}/+)$	12.41%
False - rate for classified -	$\text{Pr}(D/-)$	10.47%
Correctly classified		88.86%

Tabla 10. Cálculo de la sensibilidad y la especificidad de la medición de AGEs para confirmar la presencia o no de daño renal crónico en el paciente diabético, utilizando un valor de corte de 1000 $\mu\text{U}/\text{mL}$.

Se puede constatar un alto valor diagnóstico e incluso la leve falta de concordancia entre el diagnóstico por la medición de AGEs y por el valor de creatinina, se puede deber a que cada individuo tiene un umbral distinto para soportar los daños silenciosos asociados a los estados de hiperglicemia antes de colapsar y mostrar manifestaciones clínicas de daño renal, por otro lado en este estudio se emplearon pacientes cuya última fecha de hemodiálisis no fue controlado y no está claro si la hemodiálisis pudiera o no contribuir de alguna forma a la eliminación parcial de los AGEs en los pacientes bajo tratamiento. De cualquier forma, el análisis de regresión logística realizado para estimar la probabilidad que tenían los individuos que presentaban AGEs mayores a 1000 $\mu\text{U}/\text{mL}$ (valor de corte estimado) de sufrir una reducción significativa de su tasa de filtración glomerular que conduce al incremento sérico de la creatinina por encima de 1.3 mg/dL, mostró que esos paciente tiene en promedio 46 veces más probabilidades de padecer de daño renal crónico, con un máximo que puede llegar hasta 86 veces mayor (Tabla 11).

Logistic creatinina>1.3 AGEs>1000						
Logistic regression					Number of obs =	395
					LR chi2 (1)	= 224.96
					Prob > chi2	= 0.0000
Log likelihood = -148.25465					Pseudo R2	= 0.4314
Creatinina>1.3 AGEs>1000 _const	Odds Ratio	Std. Err.	z	P > z	[95% Conf. Interval]	
	45.76	14.76071	11.85	0.0000	24.31732	86.11056
	0.721154	0.192798	-9.84	0.0000	0.0427033	0.1217851

Tabla 11. Estudio de regresión logística para estimar la probabilidad de desarrollar daño renal crónico en pacientes diabéticos con concentraciones séricas de AGEs mayores a 1000 µU/mL.

Conclusiones

Los resultados del presente estudio demuestran inequívocamente la validez de la medición de las concentraciones circulantes de los productos finales de glicación avanzada derivados de glucosa, utilizando el método analítico desarrollado por nuestro grupo de trabajo, para evaluar el control glicémico del paciente diabético a largo de plazo. Y nos dota de una herramienta importante y complementaria, para el monitoreo de la evolución metabólica y clínica de los pacientes, que nos permite predecir la aparición y/o el desarrollo de las complicaciones crónicas asociadas a la diabetes Mellitus, tales como la nefropatía diabética crónica.

Referencias

1. Alberti KG, Zimmet P. Global burden of disease--where does diabetes mellitus fit in? *Nat Rev Endocrinol*. May 2013;9(5):258-260.
2. Amato D, Alvarez-Aguilar C, Castaneda-Limones R, et al. Prevalence of chronic kidney disease in an urban Mexican population. *Kidney Int Suppl*. Aug 2005(97):S11-17.
3. Cardenas-Leon M, Diaz-Diaz E, Arguelles-Medina R, Sanchez-Canales P, Diaz-Sanchez V, Larrea F. [Glycation and protein crosslinking in the diabetes and ageing pathogenesis]. *Rev Invest Clin*. Nov-Dec 2009;61(6):505-520.
4. Goh SY, Cooper ME. Clinical review: The role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. Apr 2008;93(4):1143-1152.
5. Luis-Rodriguez D, Martinez-Castelao A, Gorriz JL, De-Alvaro F, Navarro-Gonzalez JF. Pathophysiological role and therapeutic implications of inflammation in diabetic nephropathy. *World J Diabetes*. Jan 15 2012;3(1):7-18.
6. Bucala R. Diabetes, aging, and their tissue complications. *J Clin Invest*. May 2014;124(5):1887-1888.
7. Kitada M, Zhang Z, Mima A, King GL. Molecular mechanisms of diabetic vascular complications. *J Diabetes Investig*. Jun 1 2010;1(3):77-89.
8. Makita Z, Radoff S, Rayfield EJ, et al. Advanced glycosylation end products in patients with diabetic nephropathy. *N Engl J Med*. Sep 19 1991;325(12):836-842.
9. Makita Z, Vlassara H, Cerami A, Bucala R. Immunochemical detection of advanced glycosylation end products in vivo. *J Biol Chem*. Mar 15 1992;267(8):5133-5138.
10. Nass N, Bartling B, Navarrete Santos A, et al. Advanced glycation end products, diabetes and ageing. *Z Gerontol Geriatr*. Oct 2007;40(5):349-356.
11. Stratton IM, Adler AI, Neil HA, et al. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ*. Aug 12 2000;321(7258):405-412.
12. Tanji N, Markowitz GS, Fu C, et al. Expression of advanced glycation end products and their cellular receptor RAGE in diabetic nephropathy and nondiabetic renal disease. *J Am Soc Nephrol*. Sep 2000;11(9):1656-1666.
13. Yamagishi S, Matsui T. Advanced glycation end products, oxidative stress and diabetic nephropathy. *Oxid Med Cell Longev*. Mar-Apr 2010;3(2):101-108.
14. Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM. Mechanisms of disease: advanced glycation end-products and their receptor in inflammation and diabetes complications. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. May 2008;4(5):285-293.
15. Zhang Q, Ames JM, Smith RD, Baynes JW, Metz TO. A perspective on the Maillard reaction and the analysis of protein glycation by mass spectrometry: probing the pathogenesis of chronic disease. *J Proteome Res*. Feb 2009;8(2):754-769.
16. Berg TJ, Bangstad HJ, Torjesen PA, Osterby R, Bucala R, Hanssen KF. Advanced glycation end products in serum predict changes in the kidney morphology of patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism*. Jun 1997;46(6):661-665.
17. Garay-Sevilla ME, Regalado JC, Malacara JM, et al. Advanced glycosylation end products in skin, serum, saliva and urine and its association with complications of patients with type 2 diabetes mellitus. *J Endocrinol Invest*. Mar 2005;28(3):223-230.
18. Li R, Zhang P, Barker LE, Chowdhury FM, Zhang X. Cost-effectiveness of interventions to prevent and control diabetes mellitus: a systematic review. *Diabetes Care*. Aug 2010;33(8):1872-1894.
19. Barcelo A, Aedo C, Rajpathak S, Robles S. The cost of diabetes in Latin America and the Caribbean. *Bull World Health Organ*. 2003;81(1):19-27.

- 20.Rits IA. Declaration of Helsinki. Recommendations Guidings Doctors in Clinical Research. World Med J. Sep 1964;11:281.
- 21.Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. Diabetologia. Jul 1985;28(7):412-419.
- 22.Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. Ann Intern Med. May 5 2009;150(9):604-612.
- 23.Mosteller RD. Simplified calculation of body-surface area. N Engl J Med. Oct 22 1987;317(17):1098.
- 24.Solberg HE, Lahti A. Detection of outliers in reference distributions: performance of Horn's algorithm. Clin Chem. Dec 2005;51(12):2326-2332.
- 25.Friedrichs KR, Harr KE, Freeman KP, et al. ASVCP reference interval guidelines: determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics. Vet Clin Pathol. Dec 2012;41(4):441-453.
- 26.Foundation NK. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. Am J Kidney Dis. Feb 2002;39(2 Suppl 1):S1-266.

Agradecimientos

Al Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social. SSA/IMSS/ISSSTE-CONACYT. Convocatoria: S0008-2011-1. Solicitud: 161976.



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

*Recibi
Silvia Carrera E.
10/02/2016*

Acuse

México, D.F. a 10 de Febrero de 2016

Dr. Eulises Díaz Díaz
Depto. de Biología de la Reproducción
Presente

Estimado Dr. Díaz.:

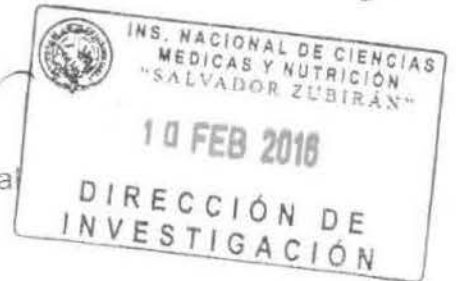
Por este conducto le informo que su proyecto: "DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN INMUNOENSAYO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PRODUCTOS FINALES DE GLICOSILACIÓN AVANZADA: EVALUACIÓN DE SU VALOR DIAGNÓSTICO PARA PREDECIR LAS COMPLICACIONES CRÓNICAS DE DIABETES MELLITUS.", con registro CINVA: BRE -557-12/15-1 finalizó en abril del 2015. En junio del 2015 le notificamos que debido a que su proyecto se encontraba vencido lo invitábamos a someter una prórroga. Hasta la fecha no hemos recibido respuesta de su parte, por lo que, esta comisión ha dado por concluido el proyecto antes mencionado.

Sin otro particular por el momento, quedo de usted.

Atentamente,

Dra. Norma A. Bobadilla Sandova
Coordinadora de la CINVA

*Ally en D de
Cerrado
10 - marzo
2016*



Av. del Dr. Vasco de Quiroga No. 13
Colonia Salto de Agua
Domingos Sector 01
Delegación Iztapalapa
Código Postal 14080
México, Distrito Federal
Tel. (52) 54870900
www.incmnsz.mx

c.c.p. Dr. Gerardo Gamba Ayala, Director de Investigación
MVZ Mariela Contreras Escamilla, Jefa del DIEB

NAB/nom



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICION

10 FEB 2016

INVESTIGACION EXPERIMENTAL

Alma



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN

deuz

"2015, Año del Generalísimo José María Morelos y Pavón"

México, D.F. a 23 de Junio del 2015

Dr. Eulises Díaz Díaz
Depto. de Biología de la Reproducción
Presente

Estimada Dr. Díaz:

Por este conducto le informo que su proyecto: "DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN INMUNOENSAYO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PRODUCTOS FINALES DE GLICOSILACIÓN AVANZADA: EVALUACIÓN DE SU VALOR DIAGNOSTICO PARA PREDECIR LAS COMPLICACIONES CRÓNICAS DE DIABETES MELLITUS", con registro CINVA: BRE-557-12/15-1 finalizó en abril de este año. Por lo que, le solicito de la manera más atenta me haga saber si el proyecto requerirá una prórroga. En caso afirmativo, favor de enviar a la CINVA el periodo de extensión que solicita y de requerir un mayor número de animales especificar y justificar como se utilizarán y los procedimientos experimentales que se llevarán a cabo con los mismos. En caso de no requerir una prórroga favor de llenar el formato de cierre del protocolo que se anexa a la presente.

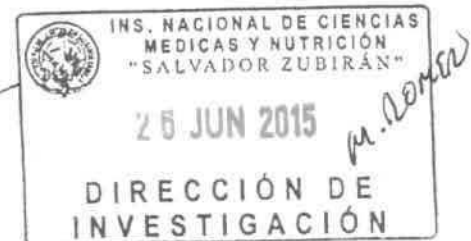
Sin otro particular por el momento, quedo de usted.

Atentamente,

[Handwritten signature]

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la CINVA

[Handwritten signature]
29-6-15



c.c.p. Dr. Gerardo Gamba Ayala, Director de Investigación.
MVZ Mariela Contreras Escamilla, Jefa del Bioterio.

Avenida Vasco de Quiroga No. 15
Colonia Belisario Domínguez Sección XVI
Delegación Tlalpan
Código Postal 14080
México, Distrito Federal
Tel. (52) 54870900
www.incmnsz.mx





INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

557

Acuse

"2014, Año de Octavio Paz"

México, D. F, a 9 de julio de 2014.

DR. EULISES DÍAZ DAZ

Investigador del Departamento de Biología
de la Reproducción.

PRESENTE.

Estimado Dr. Díaz:

En la reunión que tuvimos el día de hoy, la CINVA determinó que debido a que en el bioterio no se cuenta con las instalaciones para la reproducción y cuidado de cobayos y que tampoco sabemos si existe espacio para el alojamiento de esta especie, le sugerimos que patique con el Dr. Rafael Hernández para definir si el bioterio cuenta con el espacio físico para alojar cobayos y el material necesario para su mantenimiento. También nos permitimos solicitarle nos describa el número de conejos, borregos y cobayos que requerirá en los siguientes seis meses, así como, la justificación para cambiar de especie.

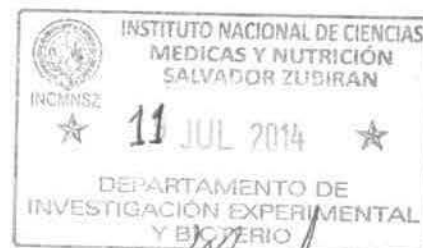
Una vez que contemos con esta información, la CINVA determinará si se otorga la prórroga solicitada y el uso de una nueva especie en el protocolo.

Sin otro particular, reciba un cordial saludo.

Atentamente,

[Handwritten signature]

Dra. Norma A. Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la Comisión de Investigación
en Animales



[Handwritten signature]

c.c.p. Dr. Gerardo Gamba - Director de Investigación
c.c.p. Dr. Rafael Hernández - Jefe del Bioterio



INSTITUTO NACIONAL DE
CIENCIAS MÉDICAS
Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

México, D.F. a 23 de Junio del 2014.

Dra. Norma Aracelis Bobadilla Sandoval
Coordinadora de la Comisión de Investigación en Animales.
CINVA
PRESENTE.

Por medio de la presente me dirijo a usted para solicitar una ampliación al proyecto titulado: "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"; proyecto de investigación CINVA-557, Clave BRE-557-12/15-1. La ampliación solicitada es para incluir además de los conejos y los borregos que teníamos contemplado desde el inicio del proyecto, cobayos que serán empleados en la producción de anticuerpos anti-insulina, mismos que empleamos rutinariamente en un RadioInmunoAnálisis (RIA) para la cuantificación de insulina de los pacientes de este y otros protocolos de investigación que estamos llevando a cabo.

La solicitud se hace en función de que los anticuerpos anti-insulina han tenido mucha demanda y se están agotando, por lo que necesitamos producir un lote nuevo. Quisiera adicionar que los animales serán correctamente manipulados y se emplearán esquemas de inmunización ya previamente probados y similares a los descritos en protocolo para la inmunización de los conejos y los borregos. Contamos con los recursos necesarios para la compra de alimento, y demás materiales para su manipulación y cuidado como sedantes, jeringas. Dichos animales estarán en el Bioterio por un período máximo de 6 meses, hasta la obtención del suero hiperinmune con alto título de trabajo.

Sin otro particular, me despido de usted, no sin antes enviarle un cordial saludo.

Dr. Eulises Díaz Díaz.
Responsable Técnico del Proyecto.
Investigador del Departamento de Biología de la Reproducción.

Ccp. Dr. Rafael Hernández González. Jefe del departamento de Investigación Experimental y Bioterio.



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN

Abril 16, 2012

Dr. Eulises Díaz Díaz
Departamento de Biología de la Reproducción
Presente.

Con referencia al proyecto de investigación: "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 Diabetes Mellitus"

Clave: BRE 557-12/15-1

Registro CINVA: 557

La Comisión de Investigación en Animales revisó la respuesta a las observaciones emitidas por el CINVA y se decidió la **APROBACIÓN** para su desarrollo.

Sin otro particular, envío a usted un cordial saludo.

Atentamente

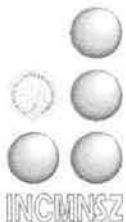
MVZ. M.Sc. Cert.LAM. Rafael Hernández González
Jefe del Departamento de Investigación Experimental y
Bioterio
Coordinador de la Comisión de Investigación en Animales

Investigación
Tradición Servicio
Asistencia Docencia

20007700

*Recibi original
Eulises
17-4-2012*

- Vasco de Quiroga 15,
- Delegación Tlalpan
- C. P. 14000 México, D. F.
- Tel. 54-87-09-00



COMITÉ INSTITUCIONAL DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN HUMANOS
FORMATO DE EVALUACIÓN DE PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Colocar cursor dentro del área blanca para llenar la información (NO utilizar áreas sombreadas)

No. de registro CIIBH: BRE-557-12/15-1.

1. Título del 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.

2. Investigadores

2a. Identificación

Nombre, firma y adscripción de cada uno de los investigadores participantes. El investigador principal deberá ser un profesional adscrito a la Institución (médico de base o investigador) y no un alumno de curso, residente, pasante, interno, etc.).

INVESTIGADOR	Posición institucional	Posición en el proyecto	Teléfono (ext.)	Correo-E
Dr. Eulises Díaz Díaz	Inv.en Cienc.Méd. "C"	Responsable Técnico	54870900 (2408)	[Redacted]
Dr. Fernando Larrea	Inv.en Cienc.Méd. "F"	Investigador Asociado	54870900 (2412)	larrea@quetzal.innsz.mx
M. en C. Mario Cárdenas León	Inv.en Cienc.Méd. "C"	Investigador Asociado	54870900 (2408)	marcar@unam.mx
Dr. Carlos Aguilar Salinas	Inv.en Cienc.Méd. "F"	Investigador Asociado	54870900 (2405)	[Redacted]
Dr. José Ricardo Correa Rotter	Inv.en cienciasMéd. "F"	Investigador Asociado	54870900 (2507)	[Redacted]

Artículo 113Fracción I de LFT
 AIT eliminado correo electrónico por tratarse de un dato personal

2b. Pertinencia del grupo de investigadores con respecto del proyecto

Brevemente describa las calificaciones del grupo investigador con respecto del proceso de investigación científica en general y con respecto del proyecto presentado (v.gr.: grado académico, experiencia laboral, miembro del sistema de investigadores de los INS, del SNI, etc).

Todos los investigadores pertenecen sistema de investigadores de la Coordinación Nacional de los Institutos Nacionales de Salud y cuentan con nombramientos vigentes. El Dr. Díaz es nivel 1 del SNI. El Dr. Larrea es jefe del departamento de Biología de la Reproducción, el Dr. Aguilar es subjefe del departamento de Endocrinología, el Dr. Correa es jefe del departamento de Nefrología del INCMNSZ y todos ellos son nivel 3 del SIN. El M.en C. Cárdenas además de investigador, es profesor de Biología Comparada de la FES Iztacala.

3. Instituciones participantes

Nombre y dirección de la o las instituciones participantes y breve descripción de en qué consistirá su participación. Para estudios multicéntricos añadir los datos del centro coordinador.

Todos los investigadores son del INCMNSZ. Vasco de Quiroga No. 15. Sección XVI. Delegación Tlalpan, C.P. 14000. México, D.F.

4. Patrocinio

4a. Organismos patrocinadores

Nombre, dirección y teléfono de la o las organizaciones, instituciones o laboratorios que aportarán recursos.

Proyecto financiado en su totalidad (721,204 pesos) por el Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social. 2011-1, del CONACYT.

4b. Especificar si los investigadores reciben pago (monetario o en especie) por su participación específica en la investigación.

En caso afirmativo, describir.

Ninguno de los investigadores recibirá pago alguno.

5. Marco teórico

Explicar detalladamente los fundamentos disponibles a la fecha en los que se basa el estudio que se propone (sentido biológico, datos de

experimentos en animales o en humanos):

- a) antecedentes,
- b) definición del problema,
- c) justificación

Antecedentes: Los Productos Finales de Glicosilación Avanzada (AGEs, por sus siglas en inglés), 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 glicosiladas 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, por lo que 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.

Definición del problema: Conocer las concentraciones séricas de AGEs en el paciente diabético, constituirá una herramienta de gran utilidad para el control de la enfermedad y la prevención de las complicaciones cardiovasculares y renales de los pacientes diabéticos; así como contribuirá a la disminución de la incidencia de muerte de estos pacientes debido a las complicaciones propias de la enfermedad. A pesar de ello, debido a complicaciones metodológicas, aún no se cuenta con un método comercial para medir de forma confiable, las concentraciones circulantes de AGEs, que permita establecer su relación con el nivel de gravedad de las complicaciones asociadas a la Diabetes Mellitus. La falta de preparaciones estándares de referencia, así como dificultades prácticas para la generación de anticuerpos específicos contra AGEs, han sido el talón de Aquiles para poder contar con una metodología confiable de uso rutinario para el monitoreo de las concentraciones circulantes de AGEs. Esto es debido a que los AGEs son mezclas complejas de estructuras moleculares diversas, con diferentes velocidades de formación y capacidad de emitir fluorescencia o realizar entrecruzamientos con otras proteínas. Por tal razón algunos AGEs sintetizados “in vitro” en grandes cantidades no han mostrado tener valor diagnóstico, mientras que otros, en los que si se ha visto una relevante asociación con el estado metabólico del paciente diabético y pudieran ser utilizados como marcadores biológicos, poseen poca capacidad inmunogénica, por lo que se hace difícil la producción de anticuerpos específicos.

Justificación: En los últimos años, después de haber probado diferentes procedimientos químicos y ensayado varios esquemas de inmunización, nuestro grupo de trabajo ha desarrollado una metodología apropiada para la síntesis química de AGEs, que reproduce a escala de laboratorio, los procesos que normalmente ocurren en la sangre de los diabéticos. También hemos logrado desarrollar una metodología efectiva para producir anticuerpos específicos contra AGEs con valor diagnóstico para el monitoreo del paciente diabético. Por ello, iniciamos la validación de un Radioinmunoanálisis específico para medir AGEs en suero. Los resultados preliminares son muy alentadores; hemos evaluado un grupo inicial de 50 individuos no diabéticos y 50 individuos diabéticos con daño renal, y observamos que en promedio los individuos controles tienen $311 \pm 165 \mu\text{UAF/mL}$ mientras que los pacientes diabéticos tienen concentraciones de $5828 \pm 3276 \mu\text{UAF/mL}$; ($p < 0.001$). Por otro lado, los valores de los individuos controles son muy cercanos entre sí, mientras que los valores de los pacientes con nefropatía diabética tienen una mayor dispersión, probablemente asociada al nivel de daño y/o al tiempo de evolución de la diabetes.

En el presente trabajo nos proponemos realizar la producción de cantidades suficientes de anticuerpos policlonales anti-AGE, que nos permita no solo terminar la validación de nuestro método analítico, sino contar con cantidades suficientes para llevar a cabo la evaluación de la relación entre las concentraciones circulantes de los AGEs y el grado de complicación de los pacientes diabéticos, con el fin de establecer valores de corte a los que se asocien las complicaciones crónicas de la diabetes tales como la retinopatía, la nefropatía, la angiopatía, etc.

Poder contar con un método como este, nos pondría a la vanguardia del diagnóstico preventivo de las complicaciones crónicas de la diabetes.

6a. Hipótesis

Definido como un enunciado comprobable acerca de la relación entre una variable dependiente y una variable independiente.

(recordar que los conceptos de "hipótesis nula", "hipótesis alterna" se relacionan al análisis estadístico por lo que NO deben incluirse en este rubro)

Los pacientes diabéticos tienen concentraciones circulantes elevadas de AGEs y se asocian con el grado de las complicaciones crónicas y/o con el tiempo de evolución de la diabetes mellitus.

6b. Objetivos.

Aquellos que se esperan obtener puntualmente en el estudio y especificados como objetivo general y objetivos específicos

Desarrollar y validar un inmunoensayo para la cuantificación de productos finales de glicosilación avanzada y evaluar su valor diagnóstico para predecir las complicaciones crónicas de la Diabetes Mellitus.

7. Metodología: Diseño general.

Describir el diseño general del estudio y, si es pertinente, especificar los siguientes puntos:

- a) Diseño del estudio: describir si es aleatorio/no aleatorio, controlado, de cohorte, tipo de cegamiento (doble-ciego, simple), tipo de controles (placebo, medicamento activo), período de lavado.
- b) Descripción de la maniobra o intervención
- c) Tamaño de muestra (# de pacientes a incluir; justificar el cálculo)
- d) Mecanismo de asignación del tratamiento (aleatorio/abierto)
- e) Grupos de tratamiento y
- f) Duración del seguimiento individual

1) Se llevara a cabo la producción de anticuerpos policlonales anti-AGEs en conejos y de anticuerpos anti-IgG de conejo en borregos, para producir cantidades suficientes de reactivos primarios para la validación del inmunoensayo y para la medición de AGEs en suero.

a) Para esto sintetizaremos AGEs sobre la molécula de albúmina sérica bovina (BSA) por incubación durante 90 días con glucosa a 37°C en condiciones de oscuridad y esterilidad. Una vez terminado el período de incubación los AGEs serán sometido a un procedimiento de reducción química, dializados 3 días contra PBS pH, 7.2 y purificados por cromatografía de afinidad para aumentar su actividad específica.

b) Una vez caracterizada la preparación de AGEs por fluorescencia, será empleada para producir anticuerpos específicos en conejo machos. Para esto, 500 ug de AGE-BSA será inoculado mezclado con adjuvante completo de Freund por una única vez y 15 días después los conejos serán restimulado con 250 ug de AGE-BSA mezclado en adjuvante incompleto de Freund una vez al mes durante 6 meses, para lograr respuestas de alta especificidad y los más altos títulos posibles. Los títulos de anticuerpos serán monitoreados 15 días después de cada inmunización, por sangrado de las venas de la oreja de los animales, teniendo en todo momento el cuidado de no estresarlos, ni lastimarlos innecesariamente. Todo el personal involucrado en el manejo de los animales está entrenado y cuenta con experiencia de más de 20 años en este tipo de manipulaciones. Debido a la baja respuesta inmunológica que se logra en los animales de experimentación contra los AGEs, se requiere un mínimo de 10 conejos para poder seleccionar los que respondan y desechar los que no lo hagan. Pudiendo contar con cantidades adecuadas de antisueros para ser empleados en la presente y las futuras investigaciones, así como para su posible empleo en el monitoreo de los pacientes diabéticos de nuestra institución.

c) Para la producción del anticuerpo secundario necesario para la precipitación del RIA, se aislarán las IgG de conejo de sueros de animales vírgenes por precipitación salina con sulfato de sodio y se dializarán contra PBS durante 3 días. Las IgG de conejo serán utilizadas para inocular un borrego y producir anticuerpos anti-IgG de conejo, siguiendo un esquema de inmunización similar al anterior pero utilizando solamente adyuvante incompleto de Freund.

d) Cada mes se realizará el marcaje de una alícuota de 10 µg de AGE-BSA con I^{125} para la preparación del trazador radioactivo necesario para el radioinmunoanálisis.

e) Una alícuota del AGE-BSA caracterizado por fluorescencia será utilizado como curva estándar, para ello el AGE-BSA será diluido hasta establecer el rango dinámico del ensayo.

2) Se completará la validación del inmunoensayo: Radioinmunoensayo de competición en fase líquida con precipitación por segundo anticuerpo (RIA), para garantizar la reproducibilidad de los resultados obtenidos.

a) Se establecerá el rango dinámico del ensayo, verificando el rango de concentraciones donde el sistema analítico es capaz de tener una relación dosis-respuesta adecuada.

b) Se establecerá la presión intra e inter- ensayo.

c) Se verificará la especificidad de los anticuerpos producidos al enfrentarlos a diferentes preparaciones de AGEs distintas a la que se utilizó para inducir su producción en los animales de experimentación. Así como su posible reactividad cruzada con estructuras que son cercanas a los AGEs pero que no lo son, como los productos de Amadoris (hemoglobina glicosilada).

d) Se verificará las posibles interferencias con los altos niveles de lípidos, hemoglobina, bilirubinas entre otros compuestos.

3) Como parte de la validación del valor diagnóstico de la medición de los AGEs para predecir las complicaciones crónicas de la diabetes:

a) Se tomará una muestra de sangre total en tubos con anticoagulante para la medición de hemoglobina glicosilada y verificar el estado hemático en general de los pacientes diabéticos. Se tomará un tubo para separar suero y realizar la medición de los parámetros bioquímicos como glucosa, insulina, perfil de lípidos, creatinina, ácido úrico, AGEs, etc. Para el caso particular de los pacientes diabéticos se evaluará la función renal a través de la medición del índice de depuración de creatinina, para lo cual se tomará una muestra de orina de 24 horas.

4) Se realizará un estudio transversal comparativo de casos y controles no aleatorizado, para ello se realizará la medición de AGEs en población supuestamente sana (individuos controles adultos no diabéticos de ambos sexos) y en pacientes diabéticos fundamentalmente de nuestra institución. Se parearán los grupos experimentales por edad y sexo. Se establecerán los valores de referencia para el grupo control y se evaluarán las concentraciones circulantes de AGEs en los pacientes diabéticos. Se establecerá una asociación entre las concentraciones circulantes de AGEs y el grado de las complicaciones crónicas en los pacientes diabéticos (fundamentalmente de la nefropatía, aunque queremos evaluar pacientes con retinopatía diabética, angiopatía diabética, diabéticos hipertensos; así como otras complicaciones propia de la diabetes como la disfunción eréctil, entre otras). Se considera evaluar al menos 1000 individuos controles y 1000 individuos con distintos tipos de complicaciones crónicas de la diabetes, fundamentalmente nefropatía diabética. Los participantes serán reclutados por invitación o captados de otros proyectos de investigación relacionados que están realizando en estos momentos los investigadores asociados a este proyecto, mismos que ya han sido aprobados por el comité de ética en humanos. Los pacientes con diabetes serán reclutados, fundamentalmente de entre los pacientes que acuden regularmente a los servicios médicos de nuestra institución.

8. Metodología: Criterios de selección

a) Criterios de inclusión (considerar que no participen en otras investigaciones y anticoncepción en caso necesario)

Criterio de inclusión para animales de laboratorio: animales adultos jóvenes machos (conejos y borregos).

Criterio de inclusión para humanos: Para el grupo control todos los individuos adultos (mayores de 25 años) de ambos sexos que no sufran de diabetes mellitus, ni de alguna otra enfermedad metabólica crónica. Individuos que voluntariamente acepten participar en el estudio; así como otros participantes de otros estudios que actualmente llevan a cabo los investigadores asociados a este proyecto.

En el grupo experimental se incluirán individuos adultos (mayores de 25 años) de ambos sexos con diabetes mellitus; con y sin complicaciones crónicas. Se tendrá en cuenta el tiempo de evolución de la diabetes, el tratamiento y el apego al mismo, así como la presencia o no de complicaciones crónicas. Estos pacientes serán reclutados fundamentalmente de los pacientes propios de los departamentos de nuestra institución cuyos responsables son investigadores asociados a este proyecto.

b) Criterios de exclusión

Criterio de exclusión para animales de laboratorio: animales con bajo peso y muestras de enfermedad o mala alimentación.

Criterio de exclusión para humanos: se excluirán del grupo control los individuos que sin saberlo, presenten diabetes al momento de la toma de la muestra.

c) Criterios de eliminación (considerar embarazo en caso necesario).

Criterio de eliminación para animales de laboratorio: animales que cuyo estado de salud se deteriore significativamente o que muestren síntomas de un estrés importante, o cuyo sistema inmunológico no responda de forma adecuada a las inmunizaciones.

Criterio de eliminación:

Los individuos del grupo control que al momento de la toma de la muestra hayan desarrollado diabetes sin ser de su conocimiento, serán eliminados del grupo control y pasado al grupo de diabéticos.

9. Metodología: Desenlaces y variables

a) Variables/desenlaces principales a medir

b) Variables/desenlaces secundarios a medir

b) Frecuencia de las mediciones,

c) Criterios de éxito y falla, en caso necesario y

d) Estrategia de análisis estadístico.

Cuando corresponda deben especificarse y fundamentarse las técnicas, aparatos y/o instrumentos que se utilizarán en la medición (esto incluye equipos mecánicos/electrónicos/cibeméticos especiales, formatos de evaluación, cuestionarios, tablas de cotejo, etc.), señalando los criterios de validez, reproducibilidad y controles de calidad que se tengan de los mismos.

Para la validación analítica del inmunoensayo:

1) Se establecerá el rango lineal del ensayo a través de transformaciones matemáticas de regresión logística de la curva dosis-repuesta.

2) El rango de los controles de calidad internos, se establecerá por el valor de la media más menos dos desviaciones estándares.

3) La precisión intra e inter-ensayo, se verificará por el coeficiente de variación de los controles internos que debe ser menor de 5% y de 10% respectivamente.

Para la validación clínica del ensayo:

1) Se evaluarán el estado metabólico de los participantes de ambos grupos experimentales. Se realizará la medición de los parámetros metabólicos entre ellos de glucosa, insulina, perfil de lípidos, creatinina, ácido úrico, entre otras, así como los valores de hemoglobina glicosilada y la función renal (en el caso de los pacientes diabéticos).

2) El grupo control (no diabéticos) se estratificará en individuos con o sin resistencia a la insulina (medido por el índice HOMA), así como con y sin alteraciones en el perfil de lípidos.

3) Para el caso del grupo experimental, se estratificará en individuos con o sin complicaciones crónicas, con valores normales o anormales de hemoglobina glicosilada (que reflejan el grado de control del estado de la glucemia en fechas cercanas a la toma de la muestra).

4) Se establecerán las concentraciones séricas de AGEs en los grupos de estudios, así como en los subgrupos, pudiendo establecerse su asociación con el grado de control metabólico y de las propias complicaciones crónicas de la diabetes.

5) Se utilizarán pruebas de comparación de medias entre grupos pareados, por edad y sexo. Se realizarán estudios de asociación entre las variables bioquímicas, el grado de las complicaciones crónicas de la diabetes y las concentraciones circulantes de AGEs, a través de análisis de correlación y modelos de regresión lineal múltiple estratificados.

10. Riesgos y beneficios del estudio

- a) Molestias generadas por el estudio (en caso de tomas de sangre, anotar el número total de punciones, la cantidad de sangre por punción y/o total y la frecuencia de las punciones.)
- b) Riesgos potenciales (presencia de complicaciones o efectos adversos, considerar interacciones medicamentosas, considerar efectos psicológicos de los métodos de evaluación, v.gr.: encuestas sobre temas sensibles),
- c) Métodos de detección de los riesgos anticipados.
- d) Medidas de seguridad para el diagnóstico oportuno y prevención de los riesgos..
- e) Procedimientos a seguir para resolver los riesgos en caso de que se presenten.
- f) Beneficios directos esperados.
- g) Beneficios indirectos esperados.
- h) Ponderación general de riesgos contra beneficios del estudio propuesto.

a) Molestias generadas por el estudio:

Para el caso de los animales de experimentación: Se manejarán con cuidado y respeto a los animales de experimentación, velando que durante su alojamiento en el bioterio de nuestra institución estén bien cuidados, alimentados, limpias sus áreas y con un adecuado control de temperatura. Solo se manejarán por personal capacitado. Se utilizarán anestésicos durante las etapas de sangrado, se velará que las afectaciones cutáneas que se producen durante los procesos de inmunización sean mínimas y que sean atendidas médicamente si fuera necesario. Para esto solo emplearemos el adyuvante completo de Freund solo una vez para potenciar la respuesta inmune, esto por ser altamente necesario debido a la baja respuesta que se produce contra los AGEs en los animales de experimentación, debido al bajo grado de inmunogenicidad de los mismos.

Para el caso de los humanos: Los participantes deberán trasladarse a nuestra institución para la toma de muestra como acostumbra a hacer en sus citas de laboratorio. La toma de muestra se realizará una única vez, por personal altamente entrenado a fin de minimizar las molestias y traumas durante la toma de muestra de sangre. El grupo control se conformará fundamentalmente de individuos no diabéticos que laboran en oficinas del gobierno. Para ello personal capacitado del departamento de diabetes de nuestra institución acudirá a las mencionadas oficinas para tomarles la única muestra de suero.

- b) Riesgos potenciales: La toma de la muestra se hará con equipamiento nuevo para evitar contagios. Se tendrá mucho cuidado en no generar daños en las venas, ni hematomas en los pacientes y en los animales de laboratorio.
- c) Métodos de detección de los riesgos anticipados: Se estará observando diariamente los animales de experimentación para detectar cualquier cambio en su conducta y estado de salud, que pudiera afectar su capacidad de responder adecuadamente a las inmunizaciones. Para el caso de los humanos, el personal pondrá toda la atención durante la toma de muestra para evitar las posibles molestias que se pudieran ocasionar.
- d) Medidas de seguridad para el diagnóstico oportuno y prevención de los riesgos: Para el caso de los animales de experimentación, una vez detectado cambios en la conducta del animal, que estuvieran muy estresados o perdiendo peso, se suspenderá temporalmente el esquema de inmunización hasta su recuperación general. Para ello los animales serán visitados diariamente por personal involucrado en el estudio. Para el caso de los humanos, se pondrá atención durante la toma de la muestra de sangre a fin de no inducir daños al paciente. Si se dificultar la toma de muestra (por un estado de estrés incrementado del paciente que dificulte acceder a sus venas), se interrumpirá si se reprogramará al paciente para otra fecha.
- e) Procedimientos a seguir para resolver los riesgos en caso de que se presenten: Para el caso de los animales, se suspenderá temporalmente el esquema de inmunización. Para el caso de los humanos, se reprogramará otra cita para un nuevo intento de toma de muestra.
- f) Beneficios directos esperados: 1) Se completará el desarrollo de una metodología propia y confiable para la

medición de los productos finales de glicosilación avanzada en los pacientes diabéticos. 2) Se establecerá los valores de referencia para individuos controles no diabéticos, y diabéticos sin y con complicaciones. 3) Se establecerá la asociación entre las concentraciones circulantes de AGEs y los diferentes grados de las complicaciones crónicas de la Diabetes.

- g) Beneficios indirectos esperados: Se podrá contar con una metodología propia confiable (no existe una comercialmente disponible) que nos permitirá estar en la vanguardia de la investigación de la participación de los AGEs en los procesos patofisiológicos de la Diabetes Mellitus.
- h) Ponderación general de riesgos contra beneficios del estudio propuesto: Los beneficios de este proyecto son por muchos, mayores a los riesgos del mismo. Con el debido cuidado y respeto en el tratamiento de los animales de laboratorio se podrán producir cantidades adecuadas de anticuerpos para ser empleados en la medición de los productos finales de glicosilación avanzada en los pacientes diabéticos. Contribuyendo a una mejor evaluación y seguimiento de las complicaciones crónicas de la Diabetes Mellitus. Solo con una muestra de sangre y de orina, se podrá evaluar el estado metabólico del paciente diabético y establecer su relación con las concentraciones circulantes de AGEs. Lo que arrojará información muy valiosa acerca de su estado de salud con un mínimo de riesgo.

11. Costos

- a) Especificar costos (directos/indirectos, monetarios, en tiempo de participación, visitas/traslados) que la investigación genere para los sujetos del estudio. Especificar si las consultas, exámenes de laboratorio/gabinete y tratamientos médicos/quirúrgicos, generados con motivo del estudio serán o no cubiertos por el paciente/sujeto de investigación. Declaración sobre quien va a cubrir dichos costos.
- b) Especificar las compensaciones que se ofrecerán (reposición de gastos incurridos por la participación en el estudio; v. gr.: pago de transporte, alimentación, estancia, etc).
- c) Especificar los incentivos que se ofrecerán en caso que corresponda (se entiende incentivo como un ofrecimiento o influencia que compele a realizar una acción sin que implique una desviación importante con nuestro plan general de vida; v. gr.: dar un libro por haber participado)
- Nota: Una compensación/incentivo fuera de proporción se considera una actitud coercitiva.

La presente investigación solo generará gastos en los sujetos del estudio en lo referido a su traslado a las instalaciones del instituto (en el caso de los pacientes diabéticos). Para el caso del grupo control se irá a sus sitios laborales a conseguir la muestra de sangre por lo que ni siquiera tendrán que movilizarse. Todos los costos de las mediciones de los parámetros metabólicos serán cubiertos por el financiamiento dado por el CONACYT. No se dará ninguna compensación o incentivo a los participantes.

12. Citas bibliográficas.

Mario Cárdenas León, Eulises Díaz-Díaz, Rabindranath Argüelles Medina, Patricia Sánchez Canales, Vicente Díaz Sánchez, Fernando Larrea. Glication and protein crosslinking in the diabetes and ageing pathogenesis. Rev Invest Clin 2009;61(6):505-20.

13. Consentimiento Informado

Se entiende el Consentimiento Informado como *todas aquellas acciones que promueven un proceso de comunicación y diálogo que le facilitan a una persona tomar decisiones respecto de una acción, práctica o producto que repercute en su cuerpo, en su intimidad o en otros espacios vitales.* Se le transfiere información al sujeto de investigación con el objeto de permitirle tomar una decisión autónoma en cuanto a la participación o no en un proyecto de investigación clínica. Este proceso se instrumenta a través del diálogo con el sujeto y se documenta mediante un escrito institucionalizado (en hoja membretada del Instituto) y tomando en cuenta los lineamientos aceptados para este:

13a. Hoja de Informe al Paciente para participar en el estudio (anexar en hoja aparte).

Deberá elaborarlo por escrito el investigador principal, utilizar lenguaje en segunda persona entendible para el sujeto en investigación (v. gr.: *Usted padece... y por este motivo le invitamos a participar... etc.*). Se recomienda el uso de lenguaje multinivel entendiendo este como frases que expliquen lo mismo un nivel arriba y un nivel abajo del nivel de comprensión esperado para el sujeto que se va a incluir. Entregarle una copia. Esta Hoja de Informe debe incluir, pero no limitarse a, lo siguiente:
La descripción clara de la justificación y objetivos de la investigación, procedimientos que vayan a usarse, aspectos del estudio que sean experimentales, molestias o riesgos esperados y beneficios que puedan obtenerse.

Los tratamientos o procedimientos alternativos.
 Las responsabilidades del paciente y del médico, incluyendo la garantía de proporcionar respuesta a cualquier pregunta y/o aclaración a cerca del protocolo de investigación.
 Las compensaciones en términos de salud, fármacos, económicas (no deberá manejarse como remuneración por la donación de algún órgano o tejido, sino como donativo por la participación como sujeto de investigación), etc., producidas por su participación en el estudio y en caso de presentarse algún efecto adverso.
 Los costos de su participación, la disponibilidad de tratamiento médico en casos de que se presenten daños que lo ameriten, directamente causados por la investigación.
 La garantía de confidencialidad, de participación voluntaria y de poder rehusar a participar o retirarse en cualquier momento, sin perder sus beneficios como paciente del Instituto o ser penalizado.
 Las razones por las que podría terminar el estudio.
 El nombre y teléfono del investigador a cargo.
 El nombre y teléfono de la persona que pueda responder preguntas o informes ulteriores a cerca de aspectos éticos.

b. Carta de Consentimiento Informado (anexar en hoja aparte).

Esta corresponde a la declaración del paciente con respecto de su participación en el proyecto por lo que se elabora en primera persona (v.gr.: yo fulano de tal estoy enterado del proyecto... etc.). Se extenderá por duplicado, en papel membretado del INCMNSZ, quedando un ejemplar en poder del sujeto de investigación o de su representante legal y otra en poder del investigador. Esta Carta debe incluir, pero no limitarse a, lo siguiente
 Que el paciente ha recibido información clara y por escrito.
 Que se han atendido todas sus dudas acerca de la participación en el protocolo (poner título, es indispensable anotar el título preciso para cada protocolo).
 Que conoce los riesgos, beneficios y responsabilidades derivadas de su participación.
 Que aceptó participar de manera voluntaria y que se garantizará la confidencialidad de la investigación.
 Que podrá retirarse en cualquier momento, sin perder sus beneficios como paciente del Instituto o ser penalizado.
 El nombre y firma del sujeto de investigación o su representante legal.
 El nombre y firma de DOS testigos y la relación que estos tengan con el sujeto de investigación.
 El nombre y firma del investigador que obtiene el consentimiento.
 Fecha en la que se obtuvo el consentimiento informado.

Abrir archivos **CIIBH 02 HOJA DE INFORME.DOC** y **CIIBH 03 CARTA DE CONSENTIMIENTO.DOC** para elaborar el consentimiento informado. Una vez elaborado, guardar anteponiendo el Número de Registro del proyecto de tal manera que el nuevo archivo quede guardado como **####CIIBH 02 HOJA DE INFORME.DOC** y **####CIIBH 03 CARTA DE CONSENTIMIENTO.DOC** (donde #### = número de registro del CIIBH); y anexar hoja aparte.

14. Declaración de los investigadores

Copiar e imprimir esta declaración en hoja con membrete del Instituto.

Abrir archivo **CIIBH 04 DECLARACION DE INVESTIGADORES** para IMPRIMIRLA y que sea firmada por todos y cada uno de los participantes en el proyecto propuesto. Anexar dicha hoja al Formato de Evaluación impreso entregado.

15. Resolución del Comité

Esta sección es únicamente para conocimiento de los investigadores. Los proyectos serán revisados por cada uno de los miembros del Comité. La evaluación formal y su resolución serán realizadas por el Comité en sesión plenaria. La discusión que se dé podrá generar Observaciones y/u Objeciones mismas que redundarán en el Dictamen el cual podrá ser Aprobatorio, No Aprobatorio o Pendiente.

15a. Observaciones

Son puntos detectados en el proyecto que generan duda o ameritan aclaración pero que se considera NO afectan la estructura científica/ética del mismo.

15b. Objeciones

Son puntos detectados en el proyecto que generan duda o ameritan aclaración y se considera que SI afectan la estructura científica/ética del mismo y ameritan explicación, contestación, aclaración, modificación y/o justificación para continuar su evaluación y llegar a una resolución

15c. Dictámen

Aprobado	Se entregará Carta de Aprobación de Proyecto el cual procederá a terminar su registro institucional y podrá ser iniciado. En caso de existir Observaciones deberán ser contestadas por el investigador	
-----------------	---	--

principal.

No aprobado

El proyecto presenta Objeciones formales de carácter científico o ético que impiden su aprobación. Podrá ser modificado y vuelto a presentar mediante una nueva Solicitud de Revisión.

Pendiente o en proceso

El Comité no llegó a un Dictamen definido ya que el proyecto presenta Observaciones/Objeciones que ameritan explicación, contestación, aclaración, modificación y/o justificación para continuar su evaluación y llegar a una resolución. Se entregará una carta con las Observaciones/Objeciones y se continuará la evaluación en cuanto sean contestadas.

[Volver al Convenio](#) |
 [Firma de Convenio](#) |
 [Firmas del Convenio](#)

e Convenio

0008

00000000161976

[Personalizar](#) |
 [Buscar](#) |
 [Primero](#) |
 1-5 de 5 |
 [Últi](#)

<u>Solicitud</u>	<u>Descripción</u>	<u>Código de Responsable</u>	<u>Firma</u>	<u>Fecha/Hora de firma</u>	<u>Requerido</u>
00000000161976	CANO JIMENEZ,RODOLFO	S. Admin.		27/10/2011 14:24:46	<input type="checkbox"/>
00000000161976	AGUILAR SAHAGUN,GUILLERMO	S. Tecnic		08/11/2011 13:25:18	<input type="checkbox"/>
00000000161976	DIAZ DIAZ,EULISES	R. Técnico		07/10/2011 13:39:26	<input type="checkbox"/>
00000000161976	ARREDONDO URZUA,MARTHA	R. Admvo.		19/10/2011 11:16:48	<input type="checkbox"/>
00000000161976	GABILONDO NAVARRO,FERNANDO	R. Legal		09/11/2011 08:45:48	<input type="checkbox"/>

[Volver a Buscar](#) |
 [Anterior en Lista](#) |
 [Notificar](#)

[Volver al Convenio](#) |
 [Firma de Convenio](#) |
 [Firmas del Convenio](#) |
 [Anexo y/o modificatorios](#)

Observaciones al Convenio | Firma de Convenio | Firmas del Convenio | **Observaciones al Convenio**

Fondo S0008
 Solicitud 000000000161976
 Status 001 Envío de Comentario

[Mostrar Convenio](#)[Enviar Observaciones](#)[Visto Bueno](#)[Imprimir en Papel](#)**CONVENIO DE ASIGNACION DE RECURSOS INSTITUCIONES Y EMPRESAS**

000000000161976

CONVENIO DE ASIGNACION DE RECURSOS INSTITUCIONES Y EMPRESAS

CONVENIO DE ASIGNACION DE RECURSOS QUE CELEBRAN, POR UNA PARTE, NACIONAL FINANCIERA, S.N.C., INSTITUCION FIDUCIARIA EN EL FIDEICOMISO PUBLICO DE ADMINISTRACION E INVERSION DENOMINADO "FONDO SECTORIAL DE INVESTIGACION EN SALUD Y SEGURIDAD SOCIAL", AL QUE EN LO SUCESIVO SE LE DENOMINARA EL "FONDO", POR CONDUCTO DEL DR. RODOLFO CANO JIMENEZ, COMO SECRETARIO ADMINISTRATIVO DEL "FONDO", A QUIEN EN LO SUCESIVO SE LE DENOMINARA "EL SECRETARIO ADMINISTRATIVO", ASISTIDO EN ESTE ACTO POR EL DR. GUILLERMO AGUILAR SAHAGUN, EN SU CALIDAD DE SECRETARIO TECNICO DEL "FONDO"; Y POR OTRA PARTE EL (LA) INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICION SALVADOR ZUBIRAN, A QUIEN EN LO SUCESIVO SE LE DENOMINARA "EL SUJETO DE APOYO", REPRESENTADO POR EL (LA) DR. FERNANDO GABILONDO NAVARRO, EN SU CALIDAD DE REPRESENTANTE LEGAL, AL TENOR DE LOS ANTECEDENTES, DECLARACIONES Y CLAUSULAS SIGUIENTES:

ANTECEDENTES

1.- Uno de los objetos primordiales de la Ley de Ciencia y Tecnología, contenido en su artículo 1º, consiste en regular los apoyos que el Gobierno Federal se encuentra obligado a otorgar, para impulsar, fortalecer y desarrollar la investigación científica y tecnológica en el país, así como para determinar los instrumentos jurídicos, financieros y administrativos, mediante los cuales cumplirá con esta obligación de apoyo.

2.- La Ley Orgánica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología dispone, en su artículo 13, que la canalización de recursos por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología "CONACYT" a programas, proyectos, estudios, investigaciones específicas, otorgamiento de becas en sus diferentes modalidades y cualquier otro apoyo o ayuda de carácter económico que convenga o proporcione, estará siempre sujeta a la celebración de un contrato o convenio, según sea el caso.

3.- El "CONACYT", con base en las atribuciones legales de que dispone y de conformidad con los lineamientos establecidos en el Plan Nacional de Desarrollo, y en el Programa Especial de Ciencia y Tecnología e Innovación como elementos de desarrollo en el país y el bienestar de la sociedad en su conjunto, tuvo a bien expedir las Reglas de Operación de los Programas del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, dentro de las cuales se incluyen las relativas a los Programas de Fomento a la Investigación Científica y de Fomento a la Innovación y al Desarrollo Tecnológico.

4.- Con fecha 20 de septiembre de 2002, la Secretaría de Salud, el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, con fundamento en los artículos 23, fracción II, 25 y 26 de la LOyT, celebraron un Convenio para establecer el "FONDO".

biológicos, poseen poca capacidad inmunogénica, por lo que se hace difícil la producción de anticuerpos específicos.

En los últimos años, después de haber probado diferentes procedimientos químicos y ensayado varios esquemas de inmunización, nuestro grupo de trabajo ha desarrollado una metodología apropiada para la síntesis química de AGEs, que reproduce a escala de laboratorio, los procesos que normalmente ocurren en la sangre de los diabéticos. También hemos logrado desarrollar una metodología efectiva para producir anticuerpos específicos contra AGEs con valor diagnóstico para el monitoreo del paciente diabético. Por ello, iniciamos la validación de un Radioinmunoanálisis específico para medir AGEs en suero. Los resultados preliminares son muy alentadores; hemos evaluado un grupo inicial de 50 individuos no diabéticos y 50 individuos diabéticos con daño renal, y observamos que en promedio los individuos controles tienen $311 \pm 165 \mu\text{UAF/mL}$ mientras que los pacientes diabéticos tienen concentraciones de $5828 \pm 3276 \mu\text{UAF/mL}$; ($p < 0.001$). Por otro lado, los valores de los individuos controles son muy cercanos entre sí, mientras que los valores de los pacientes con nefropatía diabética tienen una mayor dispersión, probablemente asociada al nivel de daño y/o al tiempo de evolución de la diabetes.

En el presente trabajo nos proponemos realizar la producción de cantidades suficientes de anticuerpos policlonales anti-AGE, que nos permita no solo terminar la validación de nuestro método analítico, sino contar con cantidades suficientes para llevar a cabo la evaluación de la relación entre las concentraciones circulantes de los AGEs y el grado de complicación de los pacientes diabéticos, con el fin de establecer valores de corte a los que se asocien las complicaciones crónicas de la diabetes tales como la retinopatía, la nefropatía, la angiopatía, etc.

Poder contar con un método como este, nos pondría a la vanguardia del diagnóstico preventivo de las complicaciones crónicas de la diabetes.

Referencia:



ARTÍCULO DE REVISIÓN

Glicación y entrecruzamiento de proteínas en la patogénesis de la diabetes y el envejecimiento

Mario Cárdenas-León,* Eulises Díaz-Díaz,* Rabindranath Argüelles-Medina,*
Patricia Sánchez-Canales,* Vicente Díaz-Sánchez,* Fernando Larrea*

* Departamento de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Glycation and protein crosslinking in the diabetes and ageing pathogenesis

ABSTRACT

Long exposition to hyperglycemia is associated with development of vascular diseases in diabetic patients. Many of these effects are mediated by non-enzymatic glycosylation (glycation) of proteins and formation of advanced glycation end-products (AGEs). This phenomenon is accelerated in conditions where glucose concentration is chronically high, as it happens in diabetes mellitus. AGE formation is associated with structure-function alterations of proteins such as collagen, and particularly in tissues where these products are accumulated. A number of studies have demonstrated that AGEs can act as mediators, not only for the development of chronic complications of diabetes, but also in those related to ageing, nephropathy, Alzheimer's disease and erectile dysfunction, among others. In this paper, information generated about formation and accumulation of AGEs, including its biological effects and their participation in the development of complications in diabetes mellitus and other processes such as ageing is revised. In addition, therapeutic strategies and a new methodology to measure glycation products are also considered.

Key words. *Advanced glycation end-products (AGEs), Glycation, Non-enzymatic glycosylation, Hyperglycemia, Diabetes, RAGE.*

INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica crónico-degenerativa, caracterizada por concentraciones persistentemente elevadas de glucosa en la sangre. Constituye un factor de riesgo para las enfermedades cardiovasculares, incluyendo, la insuficiencia cardíaca y problemas circulatorios y es

RESUMEN

Diversos estudios han establecido que la exposición prolongada a la hiperglucemia es el factor primario asociado con el desarrollo de enfermedades vasculares en pacientes diabéticos. La evidencia sugiere que muchos de estos efectos son mediados por la glicosilación no enzimática (o glicación) de proteínas que lleva a la formación de los llamados productos finales de glicosilación avanzada (AGEs por sus siglas en inglés). Este proceso se acelera en condiciones en que la concentración de glucosa se mantiene elevada por tiempos prolongados, como ocurre en la diabetes mellitus, alterando la estructura y función de proteínas como la colágena, así como de los tejidos en los cuales estos productos se acumulan. Los resultados experimentales demuestran que los AGEs pueden actuar como mediadores, de la patogénesis de las complicaciones crónicas de la diabetes y de patologías relacionadas con el envejecimiento, tales como nefropatía, Alzheimer y disfunción eréctil. En este artículo se revisa la información que a la fecha se ha generado en relación con la formación y acumulación de AGEs, sus efectos biológicos, su participación en las complicaciones asociadas a la diabetes y al envejecimiento, las estrategias terapéuticas para evitar o corregir los daños causados por estos productos y la estandarización de métodos para medir su concentración.

Palabras clave. *Productos finales de glicosilación avanzada (AGEs), Glicación, Glicosilación no enzimática, Hiperglucemia, Diabetes, RAGE.*

también causa principal de ceguera y pérdida de la función renal. La incidencia de diabetes, particularmente tipo 2, se ha incrementado de manera alarmante y se estima que para el año 2010 habrá alrededor de 221 millones de personas diabéticas en el mundo, con el consecuente impacto económico y psicosocial.¹ La diabetes es actualmente la primera causa de muerte en la población mexicana. La pato-

Objetivos y Metas:

Objetivo General.

Desarrollar y validar un inmunoensayo para la cuantificación de productos finales de glicosilación avanzada y evaluar su valor diagnóstico para predecir las complicaciones crónicas de la Diabetes Mellitus.

Resultados Esperados.

- 1) Completar el desarrollo de una metodología propia y confiable para la medición de los productos finales de glicosilación avanzada en los pacientes diabéticos.
- 2) Establecer valores de referencia para individuos controles no diabéticos, y diabéticos sin y con complicaciones.
- 3) Establecer la asociación entre las concentraciones circulantes de AGEs y los diferentes grados de las complicaciones crónicas de la Diabetes.

Los resultados esperados corresponden a las metas que se quieren obtener. Para esto, el proyecto será dividido en tres etapas con una duración de un año por cada etapa, según el siguiente cronograma de actividades.

Metodología:

Etapa 1: Desarrollo y validación del método analítico para medir AGEs (primer año).

Actividades específicas.

- 1) Producción de anticuerpos anti-AGE: Todos los procedimientos de cuidado y manipulación de los animales empleados en el protocolo, se apegarán a las recomendaciones emitidas por la Comisión de Ética en Investigaciones en Animales de nuestra institución, en este y otros protocolos en los que hemos utilizado estos procedimientos de inmunización y sangrado de animales de laboratorio.

- a) Para ello se inmunizarán al menos 10 conejos con una preparación de AGE-BSA sintetizada, purificada por cromatografía de afinidad en Affigel-Blue y caracterizada por fluorescencia en nuestro laboratorio. Se realizará un esquema de inmunización ya probado (esquema de hiperinmunización prolongada) que consiste de una inmunización inicial con 800 μg de AGE-BSA disueltos en 1 mL de adyuvante completo de Freund y a los 15 días otro estímulo con 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en adyuvante incompleto de Freund. Posteriormente, los animales se inmunizarán una vez al mes con 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de AGE-BSA en adyuvante incompleto de Freund durante 6 meses, para lograr los mejores títulos posibles de anticuerpos.
 - b) Los anticuerpos policlonales serán doblemente purificados por cromatografía de afinidad: (1ro. Se eliminarán los anticuerpos anti-BSA por cromatografía en Affigel-BSA; 2do. Se recuperarán los anticuerpos específicos anti-AGE por cromatografía en Affigel-AGE-BSA).
- 2) Preparación del reactivo de precipitación: Producción de anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo en borrego. Para ello ya contamos con borregos pre-inmunizados, que debemos estar re-inmunizando y sangrando periódicamente para obtener los anticuerpos necesarios.
 - 3) Preparación del trazador radioactivo: para ello, se marcará una alícuota de 20 μg de AGE-BSA, con 1 mCi de I^{125} por el método de Cloramina T (cada mes para tener reactivo fresco).
 - 4) Titulación de los anticuerpos específicos: Los anticuerpos específicos anti-AGE serán titulados para determinar la dilución de trabajo. Para ello se escogerá la dilución de los anticuerpos que sea capaz de unir entre el 25-35% de una cantidad de AGE-BSA-marcada con I^{125} con una actividad de 25 000 CPM/100 μL .
 - 5) Normalización del ensayo analítico: Se normalizará un radioinmunoensayo (RIA) de competición en fase líquida por precipitación por el método de segundo anticuerpo.
 - 6) Evaluación de interferencias analíticas: para ello se evaluará la capacidad de afectación del resultado esperado que pudieran ejercer altas concentraciones de colesterol, triglicéridos, bilirrubinas, hemoglobina, entre otros.

- 7) Evaluación de la especificidad de los anticuerpos anti-AGEs producidos: Se verificará la capacidad de nuestros anticuerpos de reconocer específicamente las estructuras de AGEs, independientemente de la proteína sobre la cual se hayan formado. Para esto evaluaremos su capacidad de reconocer otros AGEs sintéticos que hemos desarrollado tales como: AGE-RNAsa y AGE-HSA.
- 8) Evaluación de la precisión del ensayo: Se llevará a cabo el análisis de repetibilidad y reproducibilidad entre otros.
- 9) Simultáneamente a la validación del método analítico, comenzaremos con el reclutamiento de los pacientes controles (mínimo 2000 individuos), diabéticos sin (mínimo 1000 individuos) y con complicaciones crónicas (mínimo 1000 individuos) y se iniciará la evaluación bioquímica de las muestras de suero. Para esto se llevará a cabo la medición de la hemoglobina glucosilada, la glucemia, la insulinemia, el perfil de lípidos, los valores de creatinina, el índice de filtrado glomerular (por el método de depuración de creatinina) y las concentraciones séricas de ácido úrico, etc. de estos individuos.

Etapa 2: Establecimiento de los valores de referencia para individuos controles no diabéticos, y diabéticos sin y con complicaciones (segundo año).

Actividades específicas.

- 1) Durante esta etapa se llevará a cabo la mayor actividad de reclutamiento de los pacientes controles y diabéticos sin y con complicaciones crónicas. Para esto contamos con la colaboración activa de los departamentos de Diabetes y de Nefrología de nuestra institución.
- 2) Simultáneamente al reclutamiento de los sujetos, se continuará la evaluación bioquímica de las muestras biológicas, así como la evaluación de los expedientes clínicos de estos pacientes a fin de definir el grado de sus complicaciones metabólicas y la presencia o no de enfermedades acompañantes de la diabetes, tales como la hipertensión arterial y las alteraciones del metabolismo de los lípidos.

- 3) Se iniciará la medición de las concentraciones circulantes de AGEs en los individuos reclutados, organizándolos en tres grupos. Grupo 1: Controles; Grupo 2: Pacientes Diabéticos sin complicaciones; y Grupo 3: Pacientes Diabéticos con complicaciones crónicas.
- 4) Se podrá establecer valores de referencias para las concentraciones circulantes de AGEs para cada uno de los tres grupos estudiados.
- 5) Inicialmente el grupo de pacientes diabéticos con complicaciones crónicas estará conformado fundamentalmente por pacientes con nefropatía diabética.
- 6) Posteriormente podremos extender este grupo con pacientes que sufren otros tipos de complicaciones crónicas, como la angiopatía, la retinopatía y la neuropatía diabética, en función de futuros acuerdos con otros departamentos de nuestra institución en el marco de este macro proyecto de investigación.

Etapa 3: Establecimiento de la asociación entre las concentraciones circulantes de AGEs y los diferentes grados de las complicaciones crónicas de la Diabetes (tercer año).

Actividades específicas.

- 1) Durante esta etapa se concluirá la actividad de reclutamiento de los pacientes controles y diabéticos sin y con complicaciones crónicas.
- 2) Simultáneamente al reclutamiento de los sujetos, se continuará y terminará la evaluación bioquímica de las muestras biológicas, así como la evaluación de los expedientes clínicos de estos pacientes a fin de definir el grado de sus complicaciones metabólicas.
- 3) Se continuará y terminará la medición de las concentraciones circulantes de AGEs en los individuos reclutados para completar la evaluación de los valores de referencia para las concentraciones circulantes de AGEs en cada uno de los tres grupos estudiados.
- 4) Se realizará un análisis exhaustivo de la asociación entre las concentraciones circulantes de AGEs con el tiempo de evolución de la diabetes, los tipos de tratamientos que han recibido, el grado de complicación crónica, el daño sistémico, su asociación con otras patologías co-manifestadas con la diabetes como la hipertensión arterial, etc.
- 5) Se verificará la especificidad de la determinación de AGEs para distinguir pacientes con nefropatía diabética de otros pacientes con otros tipos de

nefropatías no diabéticas, donde se espera que las concentraciones circulantes de AGEs sean normales.

Productos entregables:

Como resultados de este proyecto de investigación:

- 1) Se podrá completar la validación de un método propio y confiable para la medición de productos finales de glicosilación avanzada (AGEs) que nos pondrá en ventaja científica, ya que nos permitirá medir los AGEs a los pacientes diabéticos y verificar el riesgo que tienen en un momento dado de desarrollar las complicaciones propias de la diabetes.
- 2) Esto nos permitirá estar en condiciones de realizar otros estudios básicos en relación a la participación de los AGEs en otros tipos de patologías como el Alzheimer, Neuropatía, y Disfunciones sexuales, lo que permitirá en un futuro cercano incrementar la cooperación con otros grupos de trabajo que no cuentan con esta importante herramienta de análisis.
- 3) Se podrá llevar a cabo la formación de recursos científicos jóvenes, a través de tutoría de tesis de Licenciatura, Maestría en Ciencias, Especialidad y/o Doctorado.
- 4) Se podrán compartir los resultados obtenidos con la comunidad científica en congresos nacionales e internacionales.
- 5) Se podrá realizar la publicación de artículos científicos en revistas de alto impacto científico.
- 6) Con un mínimo de presupuesto, una vez completada la validación de todos los procedimientos, estaríamos en posición de mantener la producción de los reactivos biológicos y por tanto la capacidad de análisis que pudiera y debiera ser incorporada a la rutina diaria de nuestra institución, contribuyendo a que siga siendo una referencia en el diagnóstico y manejo del paciente diabético.
- 7) Así mismo estaríamos en posición de maquilar a otras instituciones del sector salud o en su defecto de transferir la tecnología actualmente en desarrollo por nuestro laboratorio.
- 8) Este método analítico ayudará a predecir las complicaciones crónicas propias de la diabetes, lo que permitirá una mejor toma de decisiones de los médicos para

evitar tratamientos costosos para tratar las complicaciones, tales como los procedimientos de hemodiálisis una vez dañado el riñón.

Grupo de trabajo e infraestructura disponible:

El grupo de trabajo está integrado por:

- 1) El Doctor en Ciencias: **Eulises Díaz Díaz**. (Responsable técnico del proyecto):
 - a) Es graduado de la Licenciatura en Bioquímica de la Universidad de la Habana, Cuba.
 - b) Como recién graduado, trabajó como Especialista en Aseguramiento y Control de la Calidad de la Industria Bio-farmacéutica. Donde se especializó en el área de purificación y caracterización de anticuerpos monoclonales y policlonales.
 - c) Posteriormente se graduó de la Maestría en Inmunología Molecular en el Centro de Inmunología Molecular de la Habana, Cuba.
 - d) Fue profesor del curso práctico de Inmunología de la Facultad de Biología de la Universidad de la Habana, Cuba por tres años.
 - e) Trabajó en el Departamento de Diabetes del Instituto Nacional de Endocrinología y Enfermedades Metabólicas de la Habana, Cuba por 6 años, donde era parte del Grupo de Desarrollo de Metodologías Analíticas, por lo que ha acumulado gran experiencia en las áreas de producción de anticuerpos, de inmunoquímica y en la validación de métodos inmuno-analíticos incluidos: RIA, IRMA, DELFIA, ELISA en placas, ELISA en tubos con separación magnética, etc.
 - f) Es graduado del Doctorado en Ciencias de la Facultad de Ciencias de la UNAM.
 - g) Es Profesor Acreditado de Ciencias Básicas de la Escuela de Medicina del TEC de Monterrey.
 - h) Es Investigador en Ciencias Médicas "C" del Departamento de Biología de la Reproducción, del INCMNSZ.
 - i) Es miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel I.
 - j) Cuenta con todo el apoyo logístico y el entrenamiento en lo referido al uso del Bioterio para la producción de anticuerpos, así como los equipos para purificar los anticuerpos, y demás tecnologías necesarias para

validar el radioinmunoanálisis, tales como centrifugas y contadores de radiaciones.

- k) Está acreditado ante la Comisión Nacional de Energía Nuclear y Salvaguardias de México, como Personal Ocupacionalmente Expuesto (POE) a la Radiación, por lo que cuenta con la licencia vigente, al igual que nuestra institución para el manejo del material radioactivo necesario para la realización de la técnica de RIA.
 - l) Anteriormente, ha participado en el desarrollo y validación de varios métodos inmuno-analíticos para la cuantificación de hormonas y de otras proteínas de interés diagnóstico tales como: FSH, LH, Prolactina, HCG, GH, insulina, HSA y beta-2-microalbuminuria, entre otras. Sistemas analíticos que fueron utilizados en el diagnóstico de rutina en instituciones de salud pública de Cuba durante varios años.
- 2) El Maestro en Ciencias: **Mario Cárdenas León**.
- a) Es graduado de la Licenciatura en Biología y de Maestría en Ciencias por la UNAM.
 - b) Es profesor de Fisiología Comparada de la FES Iztacala.
 - c) Es investigador en Ciencias Médicas "C" del Departamento de Biología de la Reproducción del INCMNSZ.
 - d) Conjuntamente con el Dr. Eulises Díaz Díaz (el Responsable Técnico del Proyecto), participó durante la década de los 90 en el Programa Regional de la OMS: Cuba-México, que era una parte integral de un programa internacional conocido como *Human Reproduction Program*, que tuvo la intención de favorecer el desarrollo científico en áreas relacionadas con la producción de reactivos inmunológicos y el desarrollo y validación de métodos analíticos para ser empleados en la cuantificación de hormonas del sistema reproductivo. Por tal razón, el Maestro Mario Cárdenas cuenta con una gran experiencia en esta área de la investigación biomédica.
 - e) Participará de forma activa en la validación del método analítico, para la cuantificación de AGEs, así como en la medición de las concentraciones circulantes de insulina.
 - f) Participará activamente en el reclutamiento del grupo control de individuos supuestamente sanos entre los trabajadores del INCMNSZ y sus familiares. Para ello, recolectaremos las firmas de las correspondientes cartas de consentimiento informado, según lo reglamenta la Comisión de Ética para la Investigación Biomédica en Humanos de nuestra institución. La toma de muestra consistirá en un

solo tubo rojo para separar suero y medir los parámetros metabólicos antes mencionados y se realizará según todas las recomendaciones de esta comisión y las buenas prácticas de operaciones.

3) El Dr. **Carlos Alberto Aguilar**.

- a) Médico Especialista en Endocrinología.
- b) Subjefe del Departamento de Diabetes del INCMNSZ.
- c) Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel III.
- d) Proporcionará las muestras de suero de los pacientes diabéticos que acuden al servicio de Diabetes bajo su mando y estén de acuerdo en participar en el protocolo de investigación. Para ello, recolectaremos las firmas de las correspondientes cartas de consentimiento informado, según lo reglamenta la Comisión de Ética para la Investigación Biomédica en Humanos de nuestra institución. La toma de muestra consistirá en un solo tubo rojo para separar suero y medir los parámetros metabólicos antes mencionados y se realizará según todas las recomendaciones de esta comisión y las buenas prácticas de operaciones.
- e) El Dr. Aguilar también contribuirá a la recolección de las muestras del grupo control de individuos supuestamente sanos, a partir de un muestreo que está por iniciar en el valle de México, como parte de un protocolo epidemiológico de monitoreo del estado metabólico de la población mexiquense.
- f) Su laboratorio realizará la evaluación de algunos parámetros bioquímicos tales como la glicemia, perfil de lípidos, hemoglobina glucosilada, ácido úrico, etc, para caracterizar el estado metabólico de los pacientes. Para ello cuenta con equipos automatizados y personal altamente entrenado en esta área.
- g) Participará en el análisis estadístico para establecer valores de corte de las concentraciones AGEs entre los individuos controles y los pacientes diabéticos sin y con complicaciones.
- h) Participará en el análisis de los expedientes clínicos para evaluar el grado de las complicaciones crónicas de la diabetes y su asociación con las concentraciones séricas de AGEs.

4) El Dr. **José Ricardo Correa Rotter**.

- a) Médico Especialista en Nefrología.

"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".
Dr. Eulises Díaz Díaz. SALUD-2011-1-161976.

- b) Jefe del Departamento de Nefrología del INCMNSZ.
 - c) Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel III.
 - d) Aportará las muestras de los pacientes con nefropatía diabética y de otro origen (para comprobar la especificidad del diagnóstico de la medición de AGEs), a partir de los pacientes que acudan al servicio de nefrología bajo de mando y estén de acuerdo en participar en el protocolo de investigación. Para ello, recolectaremos las firmas de las correspondientes cartas de consentimiento informado, según lo reglamenta la Comisión de Ética para la Investigación Biomédica en Humanos de nuestra institución. La toma de muestra consistirá en un solo tubo rojo para separar suero y medir los parámetros metabólicos antes mencionados y una orina de 24 horas para evaluar el índice de filtrado glomerular de estos pacientes.
 - e) Su laboratorio realizará la evaluación de algunos parámetros bioquímicos tales como la medición de PTH, de creatinina en suero y orina, del índice de filtrado glomerular, etc, para caracterizar el estado metabólico de los pacientes. Para ello cuenta con equipos automatizados y personal altamente entrenado en esta área.
 - f) Participará en el análisis de los expedientes clínicos para evaluar la asociación entre las concentraciones circulantes de AGEs con el nivel del daño renal del paciente diabético.
 - g) Participará en el análisis estadístico y en la discusión de los resultados obtenidos.
- 5) El Dr. **Fernando Larrea Gallo**.
- a) Médico Especialista en Biología de la Reproducción.
 - b) Jefe del Departamento de Biología de la Reproducción del INCMNSZ.
 - c) Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel III.
 - d) Brindará la logística y el equipamiento necesario en el departamento bajo su mando para llevar a cabo el desarrollo y validación del método analítico para medir AGEs.
 - e) Participará en el análisis integral de los resultados.
 - f) Participará activamente en la preparación de artículos científicos.
- 6) Se contempla la incorporación de investigadores jóvenes para que realicen estudios de Licenciatura, Maestría, Especialidad y/o Doctorado, que serán escogidos en el momento en que se materialice la posible entrega de recursos y sean los tiempos administrativos adecuados en las

universidades, para llevar a cabo sus correspondientes procedimientos de inscripción.

Mecanismos de Transferencia de los resultados:

La transferencia de los resultados que se obtendrán de este proyecto puede ser abordada de varias formas:

- 1) La Transferencia Tecnológica Total (TTT): Podría llevarse a cabo siempre y cuando exista una entidad gubernamental con la función bien definida de producción y distribución de reactivos biológicos y que cuente con la infraestructura adecuada y personal altamente entrenado. En este caso luego de una asesoría científica, esta empresa podría estar en condición de ser la encargada de la producción y distribución comercial de los estuches de RIA.

Desafortunadamente, en México no existe una empresa del gobierno con la capacidad de producir y comercializar medios de diagnósticos para la cuantificación de hormonas y proteínas específicas con valor diagnóstico. Por tal motivo todos estos tipos de reactivos son importados a costos excesivos.

- 2) La transferencia Tecnológica Parcial (TTP): Podría ser el caso de que se pudiera crear un área administrativa encargada de distribuir los estuches de RIA, que nosotros podríamos seguir produciendo a muy bajos costos. Esto requeriría la creación de un área nueva en nuestra institución y un apoyo logístico en lo relacionado a un almacén refrigerado y medios de transportación y personal de contabilidad, planeación, gestión de ventas etc.

Esto pudiera ser una realidad alcanzable, si se tiene en cuenta que nuestro grupo de trabajo, ha desarrollado otros medios de diagnósticos que están siendo sometidos a evaluación de campo, tales como un RIA para medir insulina, que ha mostrado las mejores cualidades analíticas. Con estos dos métodos y otros que pudiéramos desarrollar a corto plazo para evaluar micro-albuminuria (indicador precoz de afectación en el filtrado glomerular) y beta-2-microglobulina en orina (indicador de daño en la reabsorción tubular), pudiéramos ofrecer al sector salud un conjunto de reactivos que permitan el monitoreo estricto del paciente diabético a muy bajo costo.

- 3) Asimilación de la Tecnología Desarrollada (ATD): Siendo objetivo, lo más práctico parece ser la ATD, que sería la implementación de la medición de AGEs en nuestra institución como parte de la evaluación y seguimiento rutinario del paciente diabético. En este referente hemos recibido las mejores muestras de aceptación e interés inequívoco del personal directivo de los departamentos de Diabetes y Nefrología de nuestra institución. Por lo que sin duda alguna al menos esta forma de transferencia tecnológica, será un hecho.

Algo que soporta aún más este hecho, es que en la actualidad el método de insulina que hemos desarrollado está siendo estrictamente evaluado en conjunto con el departamento de Diabetes a fin de verificar la eficacia total para el diagnóstico del paciente diabético y de los pacientes en estado metabólico pre-diabético, el cual es caracterizado por una hiperinsulinemia y una resistencia a la insulina. Existe un gran interés en nuestra institución en utilizar este método que además de todo es muchísimo más barato que los que se emplean en la actualidad y que son importados.

- 4) Empleo de la Tecnología Desarrollada (ETD): Esta forma de transferencia se refiere al empleo del desarrollo tecnológico en proyectos de investigación básicos y clínicos, no solo por grupos de investigación de nuestra institución, sino por otros grupos de trabajo de otras instituciones. Si bien sería de mucha utilidad, pues favorecería el conocimiento científico y el fortalecimiento de grupos de investigación, sería sin lugar a dudas la de menor impacto social y económico.

A pesar de su limitado impacto social, esta forma de transferencia de tecnología pudiera abrir otras puertas en el futuro cercano para otros tipos de transferencias. Un ejemplo de ello, es que nuestro RIA de insulina ya ha estado siendo empleado en la evaluación de muestras de la Encuesta Nacional de Salud Pública del año 2006, donde por falta de recursos suficientes no se había podido completar la medición de las concentraciones circulantes de insulina. Gracias a los resultados obtenidos, nuestro método, está siendo firmemente considerado por el personal científico del Centro de Investigación en Salud y Nutrición del INSP, para ser utilizado en la evaluación de la medición de insulina en la Encuesta Nacional de Salud Pública que se realizará el próximo año.

Asunto: Resultados Fondo Sectorial SALUD, 2011
De: Claudia Patricia Arce Reyes (carcer@conacyt.mx)
Para: [REDACTED] Artículo 113Fracción I de LFT
AIT eliminado correo electronico
por tratarse de un dato personal
Fecha: Miércoles, 14 de septiembre, 2011 12:54:04



Fondo Sectorial de Investigación en
Salud y Seguridad Social

"2011, Año del turismo en México"

México, D.F., septiembre 13, 2011

EULISES DIAZ DIAZ

Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"

Me es grato informarle que el Comité Técnico y de Administración del Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social, en su 20ª Sesión Ordinaria decidió apoyar su proyecto, SALUD-2011-1-161976 "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.", con un monto de \$ 721204 , presentado para financiamiento en la Convocatoria 2011

Aprovecho la ocasión para felicitarle por la aprobación de su propuesta y hago de su conocimiento que las indicaciones para llevar a cabo el ajuste presupuestal, revisión del cronograma y la firma del Convenio se le enviará en breve.

Atentamente

Dr. Guillermo Aguilar Sahagún
Secretario Técnico del Fondo

Asunto: Resultados evaluación de informes técnicos

De: María Dolores Maldonado Manjarrez (mmaldonadom@conacyt.mx)

Para: [Redacted]

Artículo 113Fracción I de LFT
AIT eliminado correo electrónico
por tratarse de un dato personal

Fecha: Lunes, 14 de septiembre, 2015 17:33:37

Apreciable Eulises Díaz Díaz,

A través de la Secretaría Técnica del Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social, la M. en C. Margarita I. Calleja y Quevedo y derivado de la evaluación a las observaciones finales del proyecto SALUD-2011-1-161976 titulado "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.", le hago llegar los comentarios y resultados de dicha evaluación.

Agradeceremos corroborar con el responsable administrativo del proyecto que se haya hecho la entrega del informe financiero final a la Secretaría Administrativa del Fondo, a fin de poder emitir el cierre del proyecto o finiquito, según sea el caso.

Resultados de la evaluación:

1. ¿Considera que se han atendido a las observaciones realizadas en evaluaciones anteriores?

Sl. En la penúltima evaluación, se recomendó adjuntar probatorios de artículos publicados, alumnos graduados y presentación de los resultados en foros nacionales/internacionales. El responsable técnico de la propuesta ha anexado los probatorios mencionados anteriormente (publicación tentativa del artículo Measurement of Advanced Glycation End Products by Radioimmunoassay: its association with glycemic control and glomerular filtration rate en la revista Archives of Medical Research; titulación de un alumno de licenciatura (Juan Carlos Auriostigue) y el ingreso al programa de maestría en ciencias bioquímicas del alumno José Alvarado y al programa de Doctorado en Ciencias Biológicas de la alumna Itzel Uribe; presentación de los resultados de la investigación en foros nacionales e internacionales), por lo que se considera que se atendieron a las recomendaciones previas.

2.- Considera que en la forma en cómo se atendieron las observaciones, el proyecto puede Finiquitarse?

Sl. Por lo descrito anteriormente, se recomienda se OTORGUE el finiquito al presente proyecto.

Saludos,

M. en A. Ma. Dolores Maldonado M.
Subdirectora de Seguimiento de Proyectos DIA
Dirección de Investigación Aplicada - DADC
Tel. +52 (55) 53.22.77.00 Ext. 6236
@: mmaldonadom@conacyt.mx

MEXICO



La selección de instituciones, programas, proyectos y personas destinatarios de los apoyos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, se realizan mediante procedimientos competitivos, eficientes, equitativos y públicos, sustentados en méritos y calidad; los apoyos que se otorgan están sujetos a procesos de evaluación, selección, formalización y seguimiento en términos del marco normativo que corresponde a cada programa, por tanto, el contenido de este mensaje no se considera oferta,

propuesta o acuerdo alguno, sino hasta que sea confirmado de manera formal por el servidor público del Consejo responsable del programa. El contenido de este mensaje de datos es confidencial y se entiende dirigido y para uso exclusivo del destinatario, por lo que no podrá distribuirse y/o difundirse por ningún medio sin la previa autorización de emisor original. Si usted no es el destinatario, se le prohíbe su utilización total o parcial para cualquier fin.

Archivos adjuntos

- image003.jpg (2,14 KB)

COMPROBANTES DE LOS RESULTADOS DEL
PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.

FONDO SECTORIAL DE INVESTIGACIÓN EN
SALUD Y SEGURIDAD SOCIAL.

SSA/IMSS/ISSSTE-CONACYT.

CONVOCATORIA: S0008-2011-1

SOLICITUD: 161976.

DR. EULISES DÍAZ DÍAZ.

INVESTIGADOR EN CIENCIAS MÉDICAS.

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA.

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y
NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRÁN".



FORMACIÓN DE RECURSOS HUMANOS