

## UNIVERSIDAD DR. JOSÉ MATÍAS DELGADO

### RED BIBLIOTECARIA MATÍAS

### DERECHOS DE PUBLICACIÓN

#### DEL REGLAMENTO DE GRADUACIÓN DE LA UNIVERSIDAD DR. JOSÉ MATÍAS DELGADO

#### Capítulo VI, Art. 46

**“Los documentos finales de investigación serán propiedad de la Universidad para fines de divulgación”**

#### PUBLICADO BAJO LA LICENCIA CREATIVE COMMONS

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Unported.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>



“No se permite un uso comercial de la obra original ni la generación de obras derivadas.”

Para cualquier otro uso se debe solicitar el permiso a la Universidad

**UNIVERSIDAD DR. JOSÉ MATÍAS DELGADO  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
“DR. LUIS EDMUNDO VÁSQUEZ”  
ESCUELA DE MEDICINA**



**UNIVERSIDAD DR. JOSÉ  
MATÍAS DELGADO**

**MEDICIÓN INDIRECTA DE PRODUCTOS FINALES DE  
GLICACIÓN AVANZADA MEDIANTE FOTOLUMINISCENCIA Y  
SU CORRELACIÓN CON EL PERFIL METABÓLICO**

**Tesis presentada para optar al título de  
DOCTOR EN MEDICINA**

**Por:**

**MÓNICA ISABEL PASTORE VÁSQUEZ  
EVELYN MERCEDES RODRÍGUEZ MOREIRA**

**Asesor:**

**DR. WILLIAM ANDRÉS HOYOS ARANGO**

**ANTIGUO CUSCATLÁN, LA LIBERTAD, 20 DE FEBRERO DE 2015**



UNIVERSIDAD DR. JOSÉ  
MATÍAS DELGADO

## **AUTORIDADES**

**Dr. David Escobar Galindo**  
**RECTOR**

**Dr. José Enrique Sorto Campbell**  
**VICERRECTOR ACADÉMICO**

**Dr. José Nicolás Astacio Soria**  
**DECANO DE LA FACULTAD DE DE CIENCIAS DE LA SALUD**  
**“DR. LUIS EDMUNDO VÁSQUEZ”**

## **COMITÉ EVALUADOR**

**Dr. Julio César Ruiz**  
**PRESIDENTE**

**Dra. Patricia del Carmen Vásquez Marías**  
**MIEMBRO DEL COMITÉ EVALUADOR**

**Dra. Eva Aida Bellegarrigue de Rodríguez**  
**MIEMBRO DEL COMITÉ EVALUADOR**

**William Andrés Hoyos Arango**  
**ASESOR**

**ANTIGUO CUSCATLÁN, LA LIBERTAD, 20 DE FEBRERO DE 2015**

## ACTA DE EVALUACIÓN DE TESIS POR EL JURADO N°

En la ESCUELA DE MEDICINA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD de la UNIVERSIDAD DR. JOSÉ MATÍAS DELGADO,  
a las 16 horas con 30 minutos del día 20 del mes de febrero de 2015  
reunidos los suscritos miembros del jurado examinador de la Tesis de Grado titulada:

TEMA:  
MEDICIÓN INDIRECTA DE PRODUCTOS FINALES DE GLICACIÓN AVANZADA MEDIANTE  
FOTOLUMINISCENCIA Y SU CORRELACIÓN CON EL PERFIL METABÓLICO

Presentada por el (los) la (s) egresados(as):

1. Mónica Isabel Pastore Vásquez	
2. Evelyn Mercedes Rodríguez Moreira	
3.	0

Para optar al Grado de:

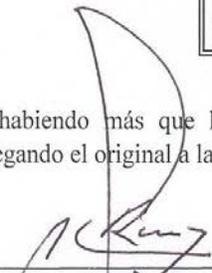
DOCTORADO EN MEDICINA

Respectivamente

**HACE CONSTAR QUE: Habiendo revisado y evaluado en forma individual su contenido escrito, de conformidad al Art. 41, 42 y 43 del Reglamento de Graduación ACORDARON DECLARARLA:**

APROBADA SIN OBSERVACIONES  
 APROBADA CON OBSERVACIONES  
 REPROBADA

No habiendo más que hacer constar, damos por terminada la presente acta que firmamos, entregando el original a la Secretaría de esta Unidad Académica.

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Julio César Ruiz Quevedo  
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Eva Áida Bellegarrigue De Rodriguez  
Primer Vocal

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Patricia del Carmen Vasquez Marias  
Segundo Vocal



## AGRADECIMIENTOS

Esta investigación, que marca el “primer final” de una carrera tan compleja, ha requerido de múltiples esfuerzos y mucha dedicación por nuestra parte, pero reconocemos que no hubiese sido posible su finalización sin la ayuda desinteresada de muchas personas, algunas de las cuales nos han sostenido especialmente en momentos de fatiga y desánimo. A todas ellas hacemos referencia a continuación, sabiendo que también hemos tenido soporte de personas que han pasado desapercibidas y, aunque por pasar ocultas no queden nombradas, les debemos un enorme agradecimiento.

Primero y antes que nada, dar gracias a Dios, por estar con nosotras cada día desde antes que decidiéramos estudiar nuestra carrera, fortalecernos cuando pensábamos que ya no podíamos más y darnos sabiduría para completar cada ciclo de aprendizaje y enfrentar desafíos; por haber puesto junto a nosotras a nuestros ángeles y tantas personas que fueron nuestro soporte y compañía durante todo el período de estudio.

Agradecer hoy y siempre a nuestros padres, para quienes el sacrificio también ha sido muy grande. Está claro que si no fuese por su gran esfuerzo y la provisión de Dios, nuestro estudio no hubiese sido posible. A toda nuestra familia, por procurar nuestro bienestar y estar siempre pendientes de aquello en que pudieran ayudar.

A todos nuestros amigos, que desde el primer momento nos brindaron y nos siguen brindando una amistad incondicional y desinteresada; por quienes hoy por hoy podemos afirmar que nos convertimos en mejores personas, pues hemos aprendido tanto y nos hemos soportado hasta en nuestros momentos más duros.

Finalmente, nuestro más sincero agradecimiento a nuestro amigo y asesor Dr. William Hoyos, por todo su sacrificio, sus horas dedicadas, por compartirnos su experiencia e incentivarnos siempre a dar lo mejor, a soñar y a no perder la fe ante las dificultades.

A todos nuestros maestros durante estos ocho años de carrera: Gracias totales.

## RESUMEN

Estudio observacional analítico transversal que establece la correlación existente entre la medición indirecta de productos finales de glicación avanzada (AGEs) y el perfil metabólico de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 mediante una técnica de fotoluminiscencia.

Se realizó con la participación de cincuenta y tres (53) pacientes divididos en tres grupos, de acuerdo a su condición de salud: pacientes no diabéticos (grupo A), pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (grupo B), pacientes diabéticos en tratamiento de hemodiálisis (grupo C).

Los pacientes fueron entrevistados para la toma de medidas antropométricas y antecedentes, consignando dichos datos en una ficha clínica. Posteriormente, fueron sometidos a toma de una muestra sanguínea para llevar a cabo el análisis químico, mediante la obtención de variables de control metabólico, y el análisis físico realizado en la parte de la muestra derivada al laboratorio de espectrofotometría de la Universidad de El Salvador. Con los datos obtenidos se llevó a cabo el análisis estadístico de las variables.

La determinación de AGEs por espectroscopia de fluorescencia en suero demostró ser sensible y guardar relación con la intensidad de fotoluminiscencia y la longitud de onda de los espectros emitidos. Los pacientes del grupo B reflejaron menor intensidad de fotoluminiscencia que el grupo A, probablemente a consecuencia del fenómeno de *quenching*. Por otra parte, las longitudes de onda permitieron establecer una correlación de significancia estadística con el estado clínico de los pacientes. Asimismo, se encontró asociación entre longitud de onda y criterios de control metabólico aplicados a los pacientes diabéticos.

# ÍNDICE

## **CAPÍTULO 1: GENERALIDADES**

Planteamiento del Problema.....	1
Justificación de la Investigación.....	4
Objetivos de la Investigación.....	7
Objetivo General.....	7
Objetivos Específicos.....	7
Hipótesis.....	8

## **CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO**

Introducción.....	9
Control Metabólico en Diabetes Mellitus.....	11
Productos Finales de Glicación Avanzada (AGEs).....	11
Formación de AGEs.....	12
Metabolismo de AGEs.....	13
Mecanismo de acción de AGEs.....	13
Rol de AGEs en Complicaciones Crónicas de la Diabetes Mellitus.....	14
AGEs y microangiopatía diabética.....	14
Nefropatía diabética.....	15
Conceptos Básicos de Espectroscopia de Fluorescencia.....	18
Fluorescencia y Espectroscopia de Fluorescencia.....	18
<i>Quenching</i> y <i>Shift</i> de Stoke.....	20

## **CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA**

Tipo de Estudio.....	22
Universo y Muestra.....	22
Criterios de Inclusión.....	23

Criterios de Exclusión.....	23
Definición de Variables.....	24
Método de Recolección de Datos.....	27
Análisis y Procesamiento de Datos.....	29
Consideraciones Éticas.....	30

## **CAPÍTULO 4: ANÁLISIS DE RESULTADOS**

Resultados.....	31
Discusión.....	43
Conclusiones.....	48
Recomendaciones.....	50

<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>51</b>
--	-----------

<b>GLOSARIO DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>58</b>
--------------------------------------	-----------

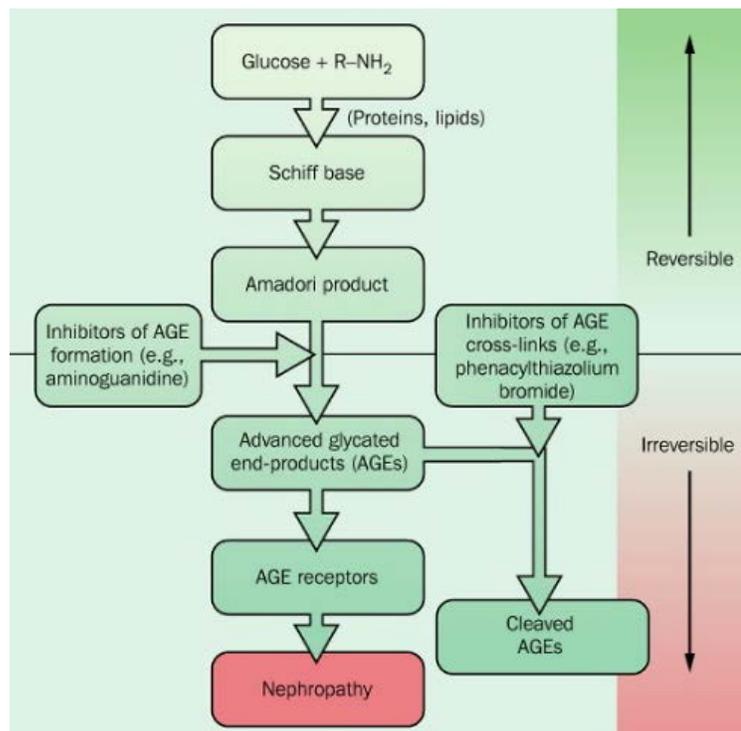
<b>ANEXOS.....</b>	<b>60</b>
--------------------	-----------

# CAPÍTULO 1. GENERALIDADES

## 1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La incidencia de la diabetes mellitus, especialmente la diabetes mellitus tipo 2, va en aumento a un nivel alarmante. Para el 2010, cerca de 285 millones de personas en el mundo padecían diabetes mellitus (6.6% en el grupo de 20 a 79 años). Las proyecciones para los próximos veinte años prevén un incremento de cerca del 50% si no se aplican programas preventivos. Esto equivale a casi 438 millones de personas afectadas, lo que indica que el 7.8% de la población adulta tendrá diabetes.<sup>1</sup>

La hiperglicemia en la diabetes mellitus es considerada la principal causa de complicaciones crónicas (enfermedad cardiovascular, retinopatía, nefropatía, neuropatía y amputación de miembros inferiores). Sus efectos deletéreos son atribuibles, entre otras cosas, a la formación de sustancias derivadas de azúcares, llamadas productos finales de glicación avanzada (AGEs).



**Figura 1.** Formación de productos finales de glicación avanzada. Fuente: Elsevier Limited, 2003.

Los AGEs (**Figura 1**) se forman a una velocidad constante, acumulándose con el tiempo. Sin embargo, su formación se acelera notablemente en la diabetes debido al estado

hiperglicémico. Los AGEs son un grupo heterogéneo de moléculas formadas a partir de la reacción no enzimática de azúcares reductores (que poseen su grupo carbonilo intacto) con grupos amino libres de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. El producto inicial de esta reacción se denomina base de Schiff, que se transforma espontáneamente a sí misma en un producto de Amadori, como es el caso de la hemoglobina glicosilada (HbA<sub>1c</sub>).

La hiperglicemia prolongada, dislipidemia y el estrés oxidativo en la diabetes mellitus dan como resultado el aumento de la producción y la acumulación de AGEs en el riñón y otros órganos. Estas modificaciones influyen significativamente en la estructura y función de las principales proteínas clave (que desempeñan un rol fundamental en la función celular), agregación plaquetaria y metabolismo de lipoproteínas. Además, la activación de los receptores de AGEs, solos o en combinación con otros ligandos, es capaz de promover el daño renal, la fibrosis y la inflamación.<sup>2</sup>

Los AGEs son atrapados por receptores celulares específicos que, en condiciones normales, promueven su degradación; sin embargo, en condiciones de extrema abundancia llevan a la formación de citoquinas en cantidad excesiva, tales como factor de crecimiento transformador (TGF1), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y factor de crecimiento insulinoide (IGF) que promueve la producción de colágena, laminina y fibronectina.<sup>3</sup>

El daño asociado a la acumulación de AGEs ha hecho de éstos un campo de estudio de gran amplitud que va presentando resultados de gran importancia para diversas áreas de la salud, no limitándose a una sola enfermedad. En el país, se ha iniciado el desarrollo de la técnica de espectroscopia de fluorescencia para detectar AGEs de forma indirecta, midiendo la intensidad de fotoluminiscencia, y dentro de las condiciones de salud se ha aplicado a pacientes con diabetes.<sup>4</sup>

Al conocerse la evolución natural de esta enfermedad, la identificación oportuna de aquellos pacientes con mayor riesgo de desarrollar complicaciones crónicas y una intervención oportuna es de vital importancia. A nivel especializado, se utilizan criterios de control metabólico para detectar estos factores. En la espectroscopia se tiene una probable herramienta para brindar datos a este respecto, lo cual se desea estudiar en

pacientes que reflejen diversas etapas de una misma enfermedad, siendo en este caso el tema de investigación la diabetes mellitus tipo 2 y una de sus principales complicaciones, como lo es la enfermedad renal.

Por lo tanto, el presente trabajo busca dar respuesta a la siguiente pregunta de investigación: *¿Existe una correlación entre la intensidad de emisión de AGEs determinada por espectroscopia de fluorescencia del suero y el perfil metabólico en pacientes con diabetes mellitus tipo 2?*

## 1.2. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

La diabetes mellitus es causa importante de morbimortalidad en Latinoamérica, donde se estima que aproximadamente 15 millones de personas la padecen.<sup>4</sup> Ha habido, en efecto, un aumento de la prevalencia de la diabetes mellitus en los últimos años y se espera un incremento aún mayor.

En Estados Unidos, el estudio NHANES (National Health and Nutrition Examination Survey) reportó que el 9.3% de las personas padecen diabetes mellitus.<sup>5</sup> Para años más recientes, utilizando los criterios de HbA<sub>1c</sub> se reportó una prevalencia de 9.6% en adultos.<sup>6</sup> En Latinoamérica diferentes prevalencias han sido reportadas variando entre 1.7% y 12.7%, dependiendo de la población estudiada.<sup>7</sup>

Cerca de un 90% o más de las personas con diabetes mellitus son del tipo 2.<sup>8</sup> Las personas con diabetes mellitus tipo 2 pueden llegar a tener una probabilidad de morir tres a cuatro veces mayor que aquellas de la misma edad que no la padecen.<sup>9</sup>

En El Salvador, la diabetes mellitus se considera un problema de salud pública por su magnitud, tendencia progresiva al aumento de la morbimortalidad y su trascendencia debido a la alta tasa de discapacidad que genera.

Según un estudio realizado en nuestro país en 2004 por Cáceres Agreda *et al.*<sup>5</sup>, que analizó simultáneamente una muestra representativa de la población urbana a nivel nacional e incluyó las catorce cabeceras departamentales de El Salvador, la prevalencia de diabetes mellitus fue de 9.7%, lo cual refleja que esta enfermedad tiene un impacto significativo en la población estudiada. Una cuarta parte de los diabéticos encontrados en el estudio no sabían que padecían de diabetes. Cifras similares y acordes han sido encontradas en otros países Latinoamericanos.<sup>10,11</sup>

Según encuestas realizadas por la Asociación Salvadoreña de Diabéticos (ASADI), en el país existen alrededor de 800,000 salvadoreños diabéticos, con una prevalencia del 9.69% localizada en San Salvador, 12.5% en San Vicente y 13.3% en San Francisco Gotera.

Por otra parte, la diabetes mellitus cobra gran importancia como factor causal de enfermedad renal crónica (ERC), pues se asocia en 43% a 50%, mientras la hipertensión arterial se implica como causa en un 20% a 30% de los casos. Ambas enfermedades con una tendencia creciente, principalmente en países en vías de desarrollo. En

Norteamérica, la nefropatía diabética constituye la causa más importante de insuficiencia renal.

La ERC se considera un serio problema de salud pública global, con la característica de una creciente incidencia y prevalencia en general, así como en los pacientes en tratamiento sustitutivo de la función renal (TSFR), diálisis y trasplante renal. Estos se asocian a discapacidad, mortalidad prematura, disminución de la calidad de vida y a un elevado y creciente costo de los servicios de salud.<sup>13</sup>

En El Salvador, el Ministerio de Salud reportó en el año 2009 que, para el ámbito hospitalario, la insuficiencia renal crónica (IRC) constituyó la primera causa de muerte en adultos; en tanto que a nivel poblacional, ocupó el quinto lugar de la mortalidad en los adultos (hombres y mujeres) y el segundo lugar para el sexo masculino.

Por otra parte, algunas investigaciones, entre ellas el Estudio Nefrolempa (2009), han reportado que la ERC es atribuible en muchos casos a diabetes mellitus y a hipertensión arterial, aunque para un 54.7% de casos la causa es desconocida.<sup>14</sup>

Analizando el conjunto de estos datos, es evidente la necesidad de llevar a cabo acciones que permitan disminuir el mayor impacto económico y social que la diabetes mellitus está teniendo a nivel mundial<sup>15</sup> y que continuará afectando a nuestro país y a Latinoamérica en los próximos años. Además de un control adecuado de la enfermedad, se hacen necesarias estrategias de detección temprana y programas de prevención de diabetes mellitus.

El desconocimiento de padecer la enfermedad y el consecuente retraso en el diagnóstico de diabetes puede estar asociado a un mayor riesgo de complicaciones crónicas. Es ahí donde radica la importancia de desarrollar estrategias de diagnóstico temprano y de tamizaje para predecir la posible aparición de complicaciones,<sup>13</sup> así como programas de prevención de diabetes mellitus.

El presente estudio se concentra en la detección indirecta de AGEs por un método innovador y factible de espectroscopia de fotoluminiscencia, tanto en pacientes sanos como en pacientes con diabetes mellitus, con el fin de profundizar en la utilidad de éste como estrategia de detección temprana del riesgo de complicaciones crónicas, enfocados en el daño renal por diabetes mellitus tipo 2.

Se ha comprobado en diversos estudios la asociación directa entre la presencia de AGEs y la patogénesis de la nefropatía diabética.<sup>16-19</sup>

A la fecha, dicha enfermedad no tiene una prueba de tamizaje en el sistema pese a su alta prevalencia. Desde ese punto de vista la prevención es secundaria y se realiza principalmente cuando el paciente ha sido diagnosticado mediante pruebas de función renal con métodos que presentan diferentes grados de complejidad y mayor o menor sensibilidad cuando se les compara con la depuración de inulina (Gold Standard), realizable únicamente bajo condiciones de laboratorio. Otras estrategias comúnmente usadas en la práctica son la búsqueda de microalbuminuria o proteinuria de 24 horas para establecer daño endotelial; todas estas constituyen pruebas que necesitan de la infraestructura de un laboratorio clínico, personal técnico y adquisición de reactivos, además del compromiso del paciente para la recolección de orina, así como la realización del examen en el lugar de obtención de la muestra. Se requiere de la toma de muestras sangre o de orina y no supone riesgo para el paciente.

Basándose en la factibilidad de un sistema espectroscópico simple y barato, que no comprometa la eficacia, el dispositivo de espectroscopia, desde el punto de vista teórico-físico, es completamente posible. Dicho equipo es portátil, no dependiente de operador y sólo requiere de una centrifugación previa para el análisis directo de suero mediante espectroscopia de fluorescencia. Si bien es cierto, requiere de la extracción de una muestra de sangre y centrifuga, sin embargo prescinde de los reactivos químicos y no es estrictamente necesario el contar con personal especializado para procesar la muestra.

El equipo médico investigador pretende usar este dispositivo en forma asincrónica (sin análisis inmediato), convencido y respaldado por no representar ningún peligro para el paciente, con la posibilidad de brindar los resultados de la prueba en forma inmediata, para garantizar el seguimiento e intervención en el paciente.

Con el fin de realizar un estudio con la aplicación de este método se desarrolla esta investigación de forma conjunta al equipo investigador experto en el área de espectroscopia, dirigido por el Dr. Carlos Rudamas, de la Universidad de El Salvador.

## **1.3. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN**

### **Objetivo General**

Demostrar la correlación existente entre la intensidad de fotoluminiscencia de productos finales de glicación avanzada en suero con el perfil metabólico en pacientes con diabetes mellitus tipo 2.

### **Objetivos Específicos**

- Determinar de forma indirecta la presencia de productos finales de glicación avanzada en el suero de pacientes no diabéticos, en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 y en pacientes diabéticos con daño renal mediante la técnica de fotoluminiscencia.
- Caracterizar las diferencias de los espectros de productos finales de glicación avanzada mostrados en personas no diabéticas, en personas con diabetes mellitus tipo 2 y en pacientes diabéticos con daño renal.
- Analizar los valores individuales de laboratorio (glicemia, perfil lipídico, hemoglobina glicosilada, creatinina sérica y depuración de creatinina) y correlacionarlos con las mediciones indirectas de AGEs.
- Analizar los valores individuales de laboratorio (glicemia, perfil lipídico, hemoglobina glicosilada, creatinina sérica y depuración de creatinina) y asociarlos con el control metabólico.
- Analizar la posibilidad de desarrollar y aplicar un método innovador y factible basado en técnicas de espectroscopia de fluorescencia para la detección indirecta de AGEs.

## **1.4. HIPOTESIS**

### **Hipótesis de trabajo**

**H<sub>1</sub>**

Existe una relación directa entre la medición de la intensidad de emisión de AGEs por espectroscopia de fluorescencia con el daño renal en el paciente diabético.

**H<sub>2</sub>**

Existe una relación directa entre la medición de la intensidad de emisión de AGEs por espectroscopia de fluorescencia con un mal control metabólico.

### **Hipótesis nula**

**H<sub>0</sub>**

No existen diferencias en la intensidad de emisión de AGEs entre los diferentes grupos de pacientes estudiados (pacientes no diabéticos, pacientes con diabetes mellitus tipo 2 y pacientes diabéticos con enfermedad renal).

**H<sub>0</sub>**

No existe relación entre la intensidad de emisión de AGEs con un mal control metabólico.

## **CAPÍTULO 2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1. INTRODUCCIÓN**

Diversos procesos patogénicos están involucrados en el desarrollo de diabetes mellitus. Estos abarcan desde la destrucción autoinmune de células  $\beta$  del páncreas (con la consecuente deficiencia de insulina) hasta anomalías en el metabolismo de azúcares, grasa y proteínas, resultantes de la resistencia a la acción de la insulina en sus órganos blanco.

Los síntomas de una marcada hiperglicemia incluyen poliuria, polidipsia, alteraciones del peso corporal y, a veces, polifagia y visión borrosa. A largo plazo, las complicaciones incluyen retinopatía con pérdida potencial de la visión, nefropatía que conduce a la insuficiencia renal, neuropatía periférica con riesgo de úlceras en los pies y amputaciones, entre otras.<sup>20</sup>

Entre los posibles mecanismos por los cuales la hiperglicemia crónica produce daño en los tejidos se encuentran la glicación de las proteínas y otras macromoléculas tisulares (lípidos, ácidos nucleicos) y el exceso de producción de compuestos de polirol a partir de la glucosa. Los pacientes con diabetes mellitus tienen una mayor incidencia de aterosclerosis cardiovascular y enfermedad cerebrovascular. Otras afecciones que se encuentran en pacientes con diabetes mellitus son hipertensión arterial y alteraciones del metabolismo de las lipoproteínas.

Vale la pena resaltar el hecho de que a una enfermedad multisistémica como es la diabetes mellitus se le suman progresivamente los no menos generalizados daños de la insuficiencia renal crónica (IRC). Los programas de diálisis cada vez están más nutridos con estos pacientes, multiplicándose además las complicaciones cardiovasculares, circulatorias periféricas, riesgos de sepsis, secuelas psicológicas, entre otros. Sin duda, esto constituye una situación muy difícil para el enfermo, su familia, el equipo de salud y la sociedad en general, tanto desde el punto de vista humano, como científico, asistencial y económico.

La prevención de la nefropatía diabética es importante porque su profilaxis y adecuado tratamiento reduce la mortalidad precoz, así como la progresión de las complicaciones

tardías de la diabetes mellitus. Los pacientes diabéticos con insuficiencia renal presentan una mortalidad 50% mayor que los pacientes no diabéticos.<sup>21</sup>

Además, numerosos estudios indican que el resultado de una intervención oportuna puede ser más eficaz cuanto más precoces sean el diagnóstico y el momento de su instauración.<sup>21</sup>

En la actualidad, la diabetes mellitus es una de las principales causas de morbimortalidad en muchos países de América. Constituye un grave problema de salud pública y de alto costo, que aqueja a muchos sin distinguir edades o niveles socioeconómicos. La pobreza perjudica al enfermo, sobre todo en estos países, porque disminuyen las probabilidades de obtener un diagnóstico acertado e influye en la aplicación de un diagnóstico apropiado, así como en el riesgo de que surjan complicaciones más graves.<sup>22</sup>

Este trabajo busca aportar un avance en el desarrollo de la espectroscopia de fluorescencia como estrategia precisa para la detección precoz del riesgo que los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 tienen de presentar daño renal como posible complicación asociada a los procesos de glicación avanzada. Esto se busca realizar mediante la lectura del suero de pacientes diabéticos y no diabéticos con un aparato de espectroscopia de fluorescencia desarrollado en la Universidad de El Salvador por expertos en el área de la física.

## **2.2. CONTROL METABÓLICO EN DIABETES MELLITUS**

La diabetes mellitus (DM) constituye una alteración metabólica que se caracteriza por hiperglicemia y complicaciones microvasculares y cardiovasculares que incrementan sustancialmente la morbimortalidad asociada y reducen la calidad de vida<sup>23</sup>. La prevalencia de este trastorno se ve incrementada debido a cambios de hábitos alimenticios y de estilo de vida, cambios en los criterios diagnósticos, envejecimiento de la población y, finalmente, un verdadero aumento de la incidencia.<sup>24</sup>

La incidencia de las complicaciones micro y macrovasculares se ve disminuida con el control metabólico adecuado en estos pacientes,<sup>25</sup> pero el control metabólico con frecuencia suele ser deficiente, aunque variable, y suele no darse la medicación necesaria para el control de los factores de riesgo cardiovascular asociados<sup>24</sup>.

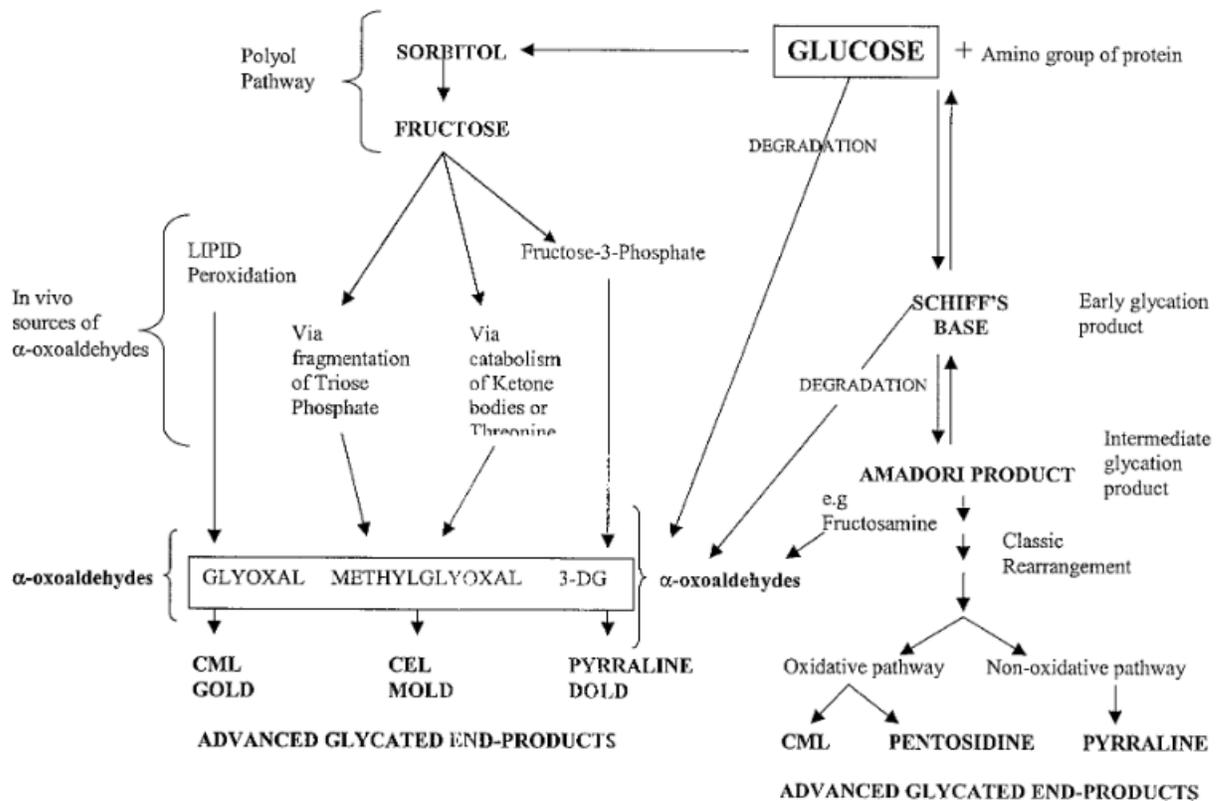
La American Diabetes Association (ADA) establece como criterios de control metabólico adecuado en pacientes con diabetes mellitus los siguientes: glicemia basal <110 mg/dl, glicemia postprandial 130-180 mg/dl, hemoglobina glicosilada <7%, presión arterial sistólica/diastólica <130/<80, colesterol total <185 mg/dl, colesterol HDL >40 mg/dl en hombres y >50 mg/dl en mujeres, colesterol LDL <100 mg/dl, triglicéridos <150 mg/dl, no fumar y realizar ejercicio físico de tipo aeróbico al menos 150 minutos/semana. Para fines de esta investigación se han considerado los criterios de glicemia basal, HbA<sub>1c</sub>, presión arterial sistólica/diastólica, triglicéridos y colesterol total, HDL y LDL.

## **2.3. PRODUCTOS FINALES DE GLICACIÓN AVANZADA**

Los productos finales de glicación avanzada (AGEs) son una clase heterogénea de moléculas que se producen a lo largo de la vida pero se incrementan en el estado de hiperglicemia de la diabetes mellitus. Estos productos son considerados importantes mediadores patogénicos de las complicaciones diabéticas y son capaces de modificar de manera irreversible las propiedades químicas y funcionales de las diversas estructuras biológicas. A través de la generación de radicales libres, la formación de enlaces cruzados con proteínas o interacciones con receptores celulares, los AGEs promueven, respectivamente, el estrés oxidativo, cambios morfofuncionales y aumento de la expresión de mediadores inflamatorios.<sup>26</sup>

### **Formación de AGEs**

Los AGEs están compuestos por una gran variedad de sustancias que se forman a partir de reacciones amino-carbonilo de naturaleza no enzimática entre azúcares reductores y proteínas, ácidos nucleicos o aminofosfolípidos. Aunque algunos de los mecanismos que conducen a la formación de AGEs permanecen aún desconocidos, la química de estas complejas reacciones puede ilustrarse como se muestra en el esquema.<sup>27</sup> **Figura 2.**



**Figura 2.** Vías de formación de glucosa y AGEs incorporando la vía de los polioles y la formación de AGEs por el α-oxoaldehído glicoxal, metilglicoxal y 3-DG. 3-DG, 3-deoxiglicosa; MGO, metilglicoxal; CML, N-ε-carboximetil lisina; CEL, N-ε (carboxietil) lisina; DOLD, dímero de deoxiglicosa lisina; MOLD, dímero de metil glicoxal lisina; GOLD, dímero de glicoxal-lisina. **Fuente:** R. Singh et al.: *Advanced glycation end products: A review.*

La reacción de Maillard comienza con la reacción de un carbonilo (aldehído o cetona) de un azúcar reductor para formar una base de Schiff reversible con un grupo amino de una biomolécula, por ejemplo, el aminoácido lisina. La base de Schiff puede sufrir rearrreglos intramoleculares para formar un producto de Amadori, el cual luego sufre una serie de rearrreglos, deshidratación y condensación para formar un producto final irreversible. Algunos pueden formar entrecruzamientos estables inter e intramoleculares.<sup>28</sup>

## Metabolismo de AGEs

Generalmente, el proceso metabólico de producción de AGEs se basa en el equilibrio de dos procesos opuestos: 1. La formación endógena y la captación de AGEs exógeno (alimentos fritos, rostizados o asados a la parrilla, hamburguesas, quesos procesados, galletas, cerveza, bebidas cola y otros); 2. La degradación y la eliminación de AGEs por los sistemas especializados (sistemas de enzimas mencionados adelante).<sup>29</sup>

La formación de AGEs se produce lentamente, en condiciones fisiológicas, y afecta principalmente a moléculas de larga vida media, como el colágeno, que ejerce una función importante en el proceso de envejecimiento.<sup>30</sup>

En condiciones de hiperglicemia o estrés oxidativo, la formación de AGEs aumenta considerablemente.<sup>31</sup> Las personas con diabetes mellitus tienen concentraciones séricas de AGEs significativamente más alto que los sujetos no-diabéticos. La evaluación de la hemoglobina glicosilada (HbA<sub>1c</sub>), variante de la hemoglobina que transporta un producto de Amadori en su cadena  $\beta$ , refleja la aparición de hiperglicemia en los últimos tres meses, e indirectamente, la glicación avanzada.<sup>32</sup>

El cuerpo tiene mecanismos de defensa contra la acumulación de AGEs. Los sistemas de enzimas como la oxalaldehído reductasa y la aldosa reductasa son capaces de influir en el pool endógeno de los AGEs y en la desintoxicación eficiente de los intermedios dicarbonílicos reactivos. Los sistemas enzimáticos glioxilasa I y II, fructosamina-3-quinasa y oxidasa fructosamina (amadoriasa) también son responsables de la interrupción de las reacciones de glicación en diferentes etapas. Sin embargo, en condiciones de exceso de AGEs, como la diabetes mellitus, hiperlipidemia, insuficiencia renal y en los individuos que consumen una dieta con alto contenido de AGEs, estos sistemas pueden no ser suficientes.<sup>26</sup>

## **Mecanismo de Acción de AGEs**

Los AGEs pueden dañar las células por tres mecanismos básicos. El primero es la modificación de las estructuras intracelulares, incluyendo aquellas que participan en la transcripción génica. El segundo mecanismo es mediante la modificación de la señalización de las moléculas de la matriz extracelular (glicadas) y la célula, causando disfunción. El tercer mecanismo se refiere a la modificación de proteínas o lípidos en la sangre. Las proteínas y los lípidos circulantes modificados por los AGEs a continuación,

pueden unirse a receptores específicos, causando la producción de citoquinas inflamatorias y factores de crecimiento, que a su vez contribuyen a la patología vascular de la diabetes mellitus.<sup>33</sup>

Por lo tanto, la eficiencia de remoción de AGEs depende, en última instancia, de la eficacia de la depuración renal. La disfunción renal que se presenta en pacientes con nefropatía resulta de la ineficiente remoción de AGEs circulantes y contribuye considerablemente a las altas concentraciones de AGEs sérico y tisular encontrados en estos individuos.<sup>34</sup>

## **2.4. ROL DE AGEs EN COMPLICACIONES CRÓNICAS DE LA DIABETES MELLITUS TIPO 2**

Los AGEs se consideran importantes mediadores patogénicos de las complicaciones de la diabetes mellitus, convencionalmente clasificadas en micro y macroangiopatías.

La microangiopatía diabética es un término general usado para describir los cambios funcionales de lechos microvasculares en los que las células del endotelio son progresivamente dañadas por la hiperglicemia, lo que resulta en la oclusión capilar, isquemia e insuficiencia orgánica.

El término macroangiopatía se refiere a las complicaciones cardiovasculares, enfermedades que constituyen la principal causa de morbilidad en pacientes con diabetes mellitus tipo 2.

### **AGEs y Microangiopatía Diabética**

Las células que se ven particularmente afectadas por la hiperglicemia son: las células endoteliales de los capilares de la retina, las células mesangiales de los glomérulos renales, las neuronas y las células de Schwann en los nervios periféricos. Esto se debe a la incapacidad de estas células de regular el transporte de glucosa al medio interno, siendo susceptibles a las altas concentraciones de glucosa durante los estados de hiperglicemia. Estas altas concentraciones intracelulares de glucosa, a su vez, estimulan vías bioquímicas responsables de los cambios fisiopatológicos de la diabetes mellitus, es decir, la vía de los polioles o vía de la hexosamina.<sup>35</sup>

## **Nefropatía Diabética**

La insuficiencia renal es una de las complicaciones crónicas más graves de la diabetes mellitus. En etapas avanzadas, esta complicación genera costos directos e indirectos muy altos tanto para el paciente como para los sistemas nacionales de salud. Ocurre con mayor frecuencia en pacientes con diabetes mellitus tipo 1, aunque el número de casos es mayor en personas con diabetes mellitus tipo 2 por la diferencia proporcional de este tipo de diabetes.

También se ha encontrado que el riesgo de nefropatía diabética se incrementa con el tiempo de evolución, en pacientes con descontrol metabólico crónico, con antecedentes familiares de nefropatía diabética o de hipertensión arterial, antecedentes personales de retinopatía diabética, dislipidemia, infección urinaria recurrente e hipertensión arterial. En años recientes se ha demostrado la eficacia del control glicémico sobre la incidencia y progresión de la nefropatía diabética. Asimismo, se ha comprobado la importancia del control de la presión arterial sobre el desarrollo de esta complicación y en la reducción de la mortalidad cardiovascular.

En etapas iniciales la nefropatía diabética se caracteriza por hiperfiltración glomerular y aumento persistente en la excreción urinaria de albúmina (EUA) en pequeñas cantidades (microalbuminuria), en determinaciones consecutivas. Si no se interviene, la excreción de albúmina aumenta en cantidad, para convertirse en proteinuria franca; la velocidad de filtración glomerular se normaliza y comienza a descender, al mismo tiempo que se incrementa la presión arterial.

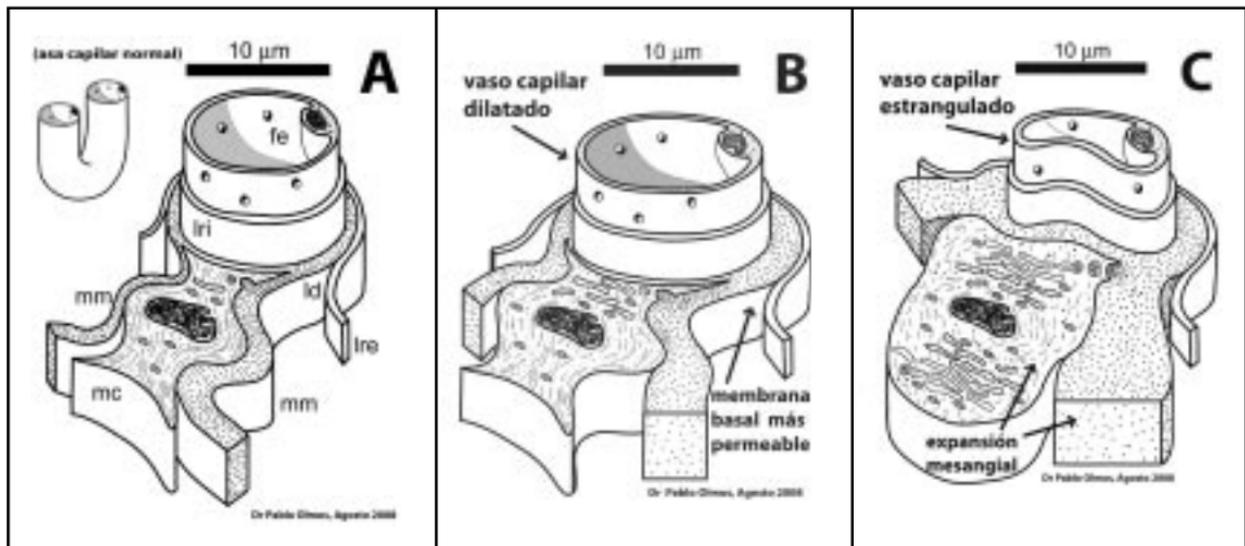
En etapas avanzadas la excreción de proteínas puede normalizarse o disminuir; hay descenso progresivo de la filtración glomerular, retención de azoados (creatinina y urea), y aparecen los síntomas y signos de insuficiencia renal terminal.<sup>36</sup>

El estudio de la historia natural de la nefropatía diabética ha demostrado que en la mayoría de los casos hay un período de varios años en los que es posible modificar la evolución del daño renal y reducir la incidencia de nefropatía diabética. Por tal motivo, la detección y el manejo de la nefropatía diabética incipiente a través de la medición de microalbuminuria forma parte de las guías clínicas para el manejo actual en personas con diabetes mellitus tipo 1 y tipo 2.

- **Patogenia de la Nefropatía Diabética**

La **Figura 3** muestra una típica asa capilar de un glomérulo renal en tres fases: normal, hiperfiltración/microalbuminuria y macroalbuminuria/insuficiencia renal.<sup>37</sup>

**Capilar normal:** Figura 3-A. La célula mesangial, entre los capilares del asa glomerular, es en realidad una célula muscular lisa modificada. En efecto, cuando ésta se contrae mediante angiotensina-II actuando en receptores AT<sub>1</sub>, tracciona la lámina densa y la lámina rara interna de la membrana basal, reduciendo así el diámetro del capilar, con lo que la resistencia intrarrenal aumenta, y la presión hidrostática disminuye, reduciendo la filtración glomerular.<sup>34</sup> Una segunda función de la célula mesangial es sintetizar la matriz mesangial, compuesta de colágeno-IV. Esta matriz es empujada entremedio de las láminas rara interna y externa, formando y renovando la lámina densa de la membrana basal glomerular. Finalmente, la célula mesangial degrada la matriz y la lámina densa envejecidas.<sup>35</sup>



**Figura 3.** Asa glomerular renal en 3 etapas: normal, hiperfiltración-microalbuminuria y macroalbuminuria-insuficiencia renal. (A) Normal: ef, endotelio fenestrado; lre, lámina rara externa; ld, lámina densa; lri, lámina rara interna; cm, célula mesangial; mm, matriz mesangial. (B) Hiperfiltración-microalbuminuria: Después de años de hiperglicemia, el vaso capilar glomerular se dilata, debido tanto a la relajación de la célula mesangial, como a la vasoconstricción de la arteria eferente. Simultáneamente, la membrana basal se hace más permeable a la albúmina. (C) Macroalbuminuria-insuficiencia renal: Después de décadas de hiperglicemia, la suma de la hipertrofia del citosuelo de la célula mesangial, más la acumulación de matriz mesangial, llevan a la “expansión mesangial”. El resultado es el progresivo estrangulamiento capilar que, si no se detiene a tiempo, lleva a la insuficiencia renal. **Fuente: Olmos P et al.: Fisiopatología de la retinopatía y nefropatía diabéticas.**

**Fase de hiperfiltración/microalbuminuria:** Figura 3-B. En condiciones de hiperglicemia, disminuye la contractilidad de la célula mesangial, debido a la

depolymerización por glicosilación de las fibras de F-actina.<sup>38</sup> El aumento consiguiente del diámetro capilar se suma a la vasoconstricción (dependiente de angiotensina-II) de la arteriola eferente, resultando en hipertensión capilar intraglomerular, la que no sólo explica la hiperfiltración que se ve frecuentemente en los primeros años de diabetes, sino que también produce daño mecánico directo en el glomérulo y un aumento de la permeabilidad de la membrana basal.<sup>39</sup>

En este contexto, en los años recientes se ha acumulado una sólida base de investigación en los mecanismos de microalbuminuria, es decir, en la excreción urinaria de albúmina entre 30 y 299 mg/24 h. Se ha usado a la microalbuminuria como un marcador de nefropatía diabética precoz desde que fue descrita en 1964 por Keen y Viberti.<sup>40</sup>

En la misma Figura 3-B ya ha comenzado la acumulación de matriz mesangial y lámina densa (ambos compuestos de colágeno-IV). A pesar de esto, la permeabilidad capilar no sólo no disminuye sino que aumenta debido a la suma de la alta presión hidrostática ya mencionada, más la glicosilación no enzimática del colágeno-IV.<sup>34</sup> Como resultado, comienza la microalbuminuria. Hasta este momento, se considera que el daño glomerular es reversible, siempre y cuando se corrijan tanto la hiperglicemia como la hipertensión arterial (si es que está presente).

**Fase de macroalbuminuria/insuficiencia renal:** Si se permite que la hiperglicemia persista por años, entonces, como se ve en la Figura 3-C, la célula mesangial expande su citosuelo mucho más de lo que cabría esperar sólo por la disminución en la contractilidad mencionada arriba.

También la matriz mesangial y la lámina densa se acumulan aún más. Tomados en su conjunto, estos cambios constituyen la “expansión mesangial”, que primero elevan la albuminuria por sobre los 300 mg/24 h (macroalbuminuria), y pasando muchas veces por una etapa de síndrome nefrótico, llevan al estrangulamiento capilar y finalmente a la insuficiencia renal. La expansión mesangial se considera como el sello característico de la nefropatía diabética avanzada.

La acumulación de AGEs implica en sí misma la posibilidad de encontrar un estrés metabólico acumulativo, un defecto en la eliminación o una glicación no enzimática,

donde algunos factores parecen favorecer la acumulación tisular, tal y como se ha documentado en valores elevados para LDL y triglicéridos.<sup>41</sup>

La acumulación de AGEs en los tejidos ha demostrado tener una correlación con eventos cardiovasculares mediante diversos mecanismos, dentro de los que se encuentran el estrés oxidativo, la inflamación y la disfunción endotelial. Los niveles elevados de AGEs medidos por autofluorescencia han demostrado, de igual forma, ser un factor de riesgo independiente.<sup>42</sup> Se ha observado asociación directa entre niveles elevados y muertes por causa coronaria de diabéticos, además de demostrar la sobrecarga metabólica y la asociación con dislipidemias.<sup>43</sup>

## **2.5. CONCEPTOS BÁSICOS DE ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA ASOCIADOS AL ESTUDIO**

El término espectroscopia atañe a la observación y el estudio del espectro o registro que se tiene de una especie (una molécula, un ión o un átomo) cuando es excitada por alguna fuente de energía que sea apropiada para el caso.

Durante los últimos veinticinco años ha habido un crecimiento notable en el uso y aplicación de la fluorescencia en muchas disciplinas. Las ciencias biofísicas y biotecnología no han sido la excepción. El principio aplicado en esta investigación se basa en los conceptos de espectroscopia y fluorescencia como se desarrollarán a continuación.

### **Fluorescencia y Espectroscopia de Fluorescencia**

La luminiscencia es la emisión de luz de cualquier sustancia y se produce a partir de estados electrónicos excitados. Dependiendo de la naturaleza del estado excitado, la luminiscencia se divide formalmente en dos categorías: fluorescencia y fosforescencia.

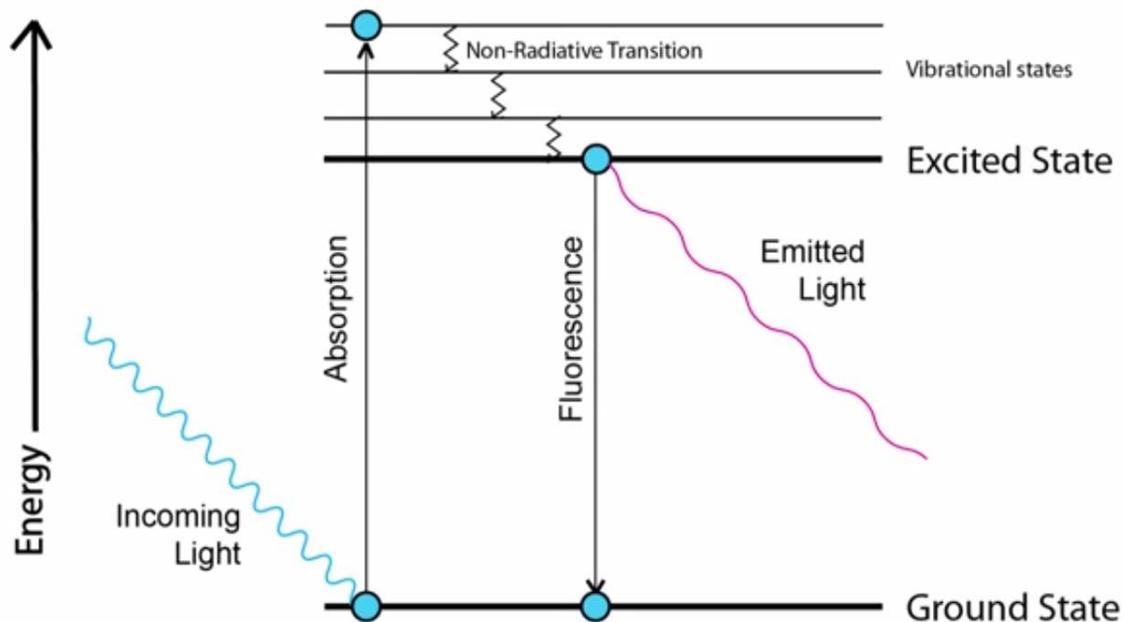
La espectroscopia de fluorescencia o fotoluminiscencia es un tipo de espectroscopia electromagnética que analiza la fluorescencia de una muestra. Se trata de utilizar un haz de luz, por lo general luz ultravioleta (UV), que excita los electrones de las moléculas de ciertos compuestos y provoca que emitan luz de una menor energía.<sup>44</sup>

El mecanismo de fluorescencia, base del método de espectroscopia óptica aplicado en esta investigación, se produce en sustancias que, en su estado basal, son capaces de

absorber energía y, posteriormente, emitir parte de ésta en forma de radiación electromagnética de una longitud de onda (expresada en nanómetros, nm) diferente.

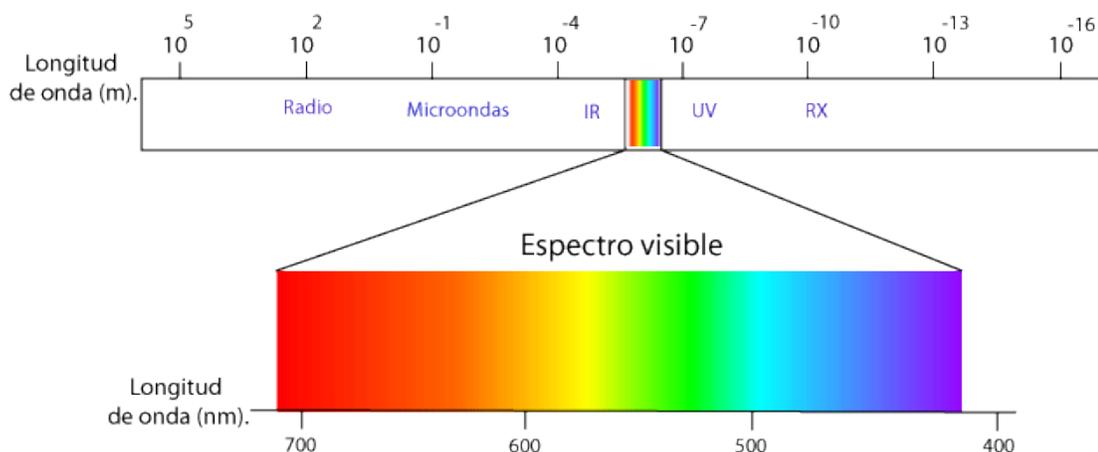
El mecanismo implica tres pasos secuenciales: absorción, disipación no radiativa y emisión. En estado basal, la molécula absorbe un total de energía; al llegar a su estado excitado, la molécula pierde parte de la energía (disipación no radiativa) y produce a continuación la emisión de luz.

Este proceso es a menudo ilustrado con el diagrama de Jablonski (**Figura 4**). La energía total emitida en forma de luz es siempre menor a la energía total absorbida y la diferencia entre ambas es disipada en forma de calor. En la mayoría de los casos la longitud de onda a la que emite es mayor (eje horizontal), presentándose dentro del espectro visible de luz, de donde radica el término de espectroscopia óptica.



**Figura 4.** Diagrama de Jablonski ilustrando el proceso de creación de un estado electrónico excitado por absorción y la subsecuente emisión de fluorescencia. El plano horizontal corresponde a la longitud de onda, que aumenta hacia la derecha. **Fuente: Internet.**

Las sustancias que son capaces de emitir luz al ser excitadas por diferentes tipos de radiación se denominan fluoróforos. Es posible obtener una amplia variedad de colores (espectro visible) por fluorescencia, dependiendo de la longitud de onda a la que emita el compuesto fluorescente. **Figura 5.**



**Figura 5.** Espectro electromagnético y longitudes de onda. **Fuente:** Internet.

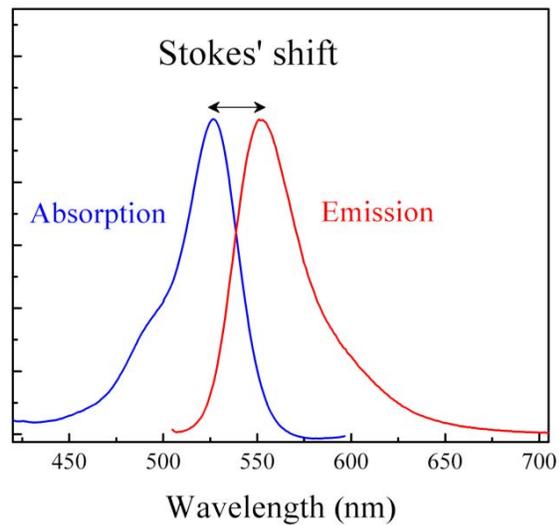
Su actividad es detectada por un instrumento denominado espectrofotómetro, que hace que la luz emitida pase por una hendidura estrecha y a través de un lente. De esta manera, se mide la cantidad de luz que es emitida por dicha muestra por medio de una fibra óptica comunicada a un dispositivo que procesa la muestra y se conecta a una computadora, permitiendo graficar el espectro.

### **Quenching y Shift de Stoke**

Las sustancias con propiedades de fluorescencia pueden sufrir alteraciones explicables con el fenómeno de *quenching*. El término *quenching* fluorescente o desactivación fluorescente hace referencia a cualquier proceso que produzca una disminución en la intensidad de la fluorescencia emitida por una determinada sustancia. Una gran variedad de procesos pueden provocar una desactivación fluorescente, tales como reacciones en estado excitado, transferencia de energía, formación de complejos con otras moléculas y *quenching* por colisiones moleculares.

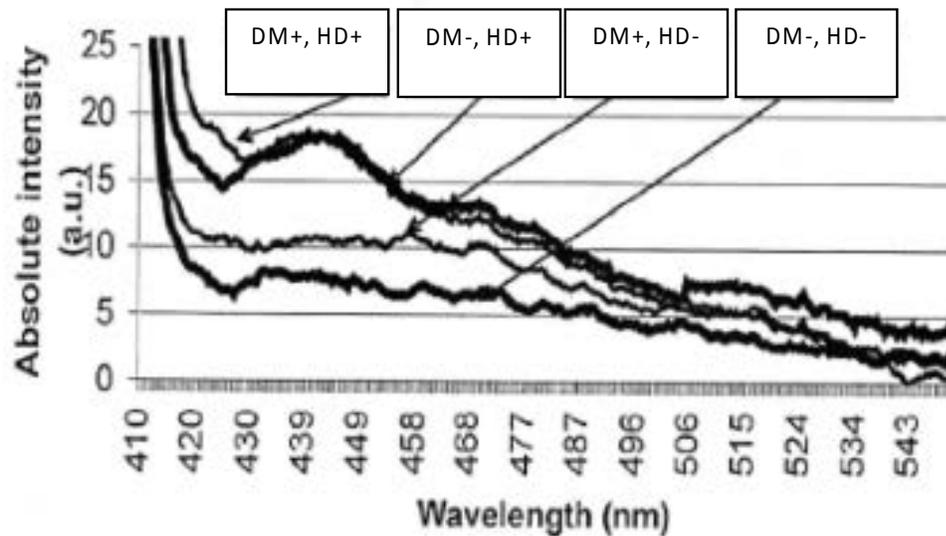
Por otra parte, la fluorescencia de las sustancias puede también presentar cambios en la emisión. Dicho fenómeno se conoce con el término de *shift* de Stoke, definido como la diferencia en nanómetros (para longitud de onda) entre las posiciones de los máximos de la banda de los espectros de emisión de la misma transición electrónica.<sup>44</sup> Puede presentarse en una molécula al encontrarse condicionada por diversos factores en su entorno, tales como temperatura, pH y otros. Dicho fenómeno puede estar asociado a

los cambios observados en este estudio, descritos hacia el final del documento. **Figura 6.**



**Figura 6.** Shift de Stoke; nm: nanómetros. Fuente: J Lakowicz: *Principles of fluorescence Spectroscopy*.

El desarrollo de la investigación ha tenido un avance enorme en el transcurso de los últimos años. Además, las concentraciones de AGEs han sido reportadas con exactitud.<sup>45</sup> La determinación de esta emisión representa específicamente el cambio observado en los espectros. **Figura 7.**



**Figura 7.** Emisión obtenida de la piel de personas que tienen diabetes mellitus y/o insuficiencia renal.<sup>45</sup> Se comparan las emisiones de pacientes con patologías asociadas a altas concentraciones de glucosa, comparados con personas que tienen niveles de glucosa normal. DM: diabetes mellitus, HD: hemodiálisis.

## **CAPITULO 3. METODOLOGÍA**

### **3.1. TIPO DE ESTUDIO**

Estudio observacional analítico transversal que evaluó la intensidad de emisión de AGEs detectables por espectroscopia de fluorescencia en el suero de pacientes no diabéticos (grupo A), diabéticos tipo 2 (grupo B) y diabéticos en diálisis (grupo C).

### **3.2. UNIVERSO Y MUESTRA**

Cincuenta y tres (53) voluntarios enrolados mediante su asentimiento al consentimiento informado fueron divididos en tres grupos, de acuerdo a su condición de salud:

- Grupo A: Pacientes no diabéticos (grupo control)
- Grupo B: Pacientes diabéticos tipo 2
- Grupo C: Pacientes diabéticos nefrópatas en tratamiento de hemodiálisis

La recolección de muestras y datos de cada grupo estuvo condicionada por la disponibilidad de exámenes y los permisos del comité de ética de cada institución.

En el caso de los grupos A y B, los pacientes fueron sometidos a una prueba de sangre con al menos 12 horas de ayuno para la evaluación de químicas sanguíneas (glucosa, hemoglobina glicosilada, perfil lipídico y creatinina). Además de esto, se realizó con ellos una entrevista estructurada para el registro de las variables a estudiar.

Todas las muestras del grupo C fueron derivadas de las jornadas masivas de hemodiálisis del Hospital Médico-Quirúrgico del Instituto Salvadoreño del Seguro Social (ISSS), con el previo consentimiento de los pacientes involucrados.

Cada muestra sanguínea se obtuvo de la fosa antecubital y, por conveniencia, de cualquiera de las tres venas presentes (cubital, cefálica o mediana) para ser centrifugadas en el lugar de la toma en centrífuga Scientific modelo 800D a 2500 RPM durante 4 minutos.

Posteriormente, se extrajo el suero en 2 tubos rotulados e independientes para el transporte: una primera alícuota para el análisis en equipo automatizado COBAS C501 HITACHI y una segunda alícuota para el análisis por fotoluminiscencia con el dispositivo de espectroscopia.

### **3.3. CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

**Pacientes que reunieron las siguientes condiciones:**

- Adulto (mayor de 18 años de edad).
- Diagnosticado con diabetes mellitus tipo 2 sin importar el tiempo de evolución (grupos B y C).
- Paciente adulto no diabético, no renal (grupo A)
- Participar en forma voluntaria, firmando la hoja de consentimiento.

### **3.4. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

**No se incluyó en el estudio a los pacientes:**

- Que no desearan voluntariamente participar.
- Fueran menor de 18 años.
- Presentaran diagnóstico de diabetes mellitus tipo 1.
- Fumadores.
- Hayan tenido cualquier complicación cardiovascular o amputación.
- Mujeres embarazadas.

### 3.5. DEFINICIÓN DE VARIABLES

Variable	Definición Conceptual	Indicador	Medición
Sexo	Característica netamente física que tiene un resultado en una de dos categorías: hombre o mujer	Sexo consignado en el expediente clínico	Femenino Masculino
Edad	Medida temporal transcurrida desde el nacimiento de un paciente hasta la entrega de la muestra para el estudio	Años de vida	Años
Tiempo de evolución de diabetes mellitus	Medida temporal desde el diagnóstico de diabetes mellitus hasta el momento de la entrevista clínica	Tiempo en meses	Meses
Índice de masa corporal	Índice del peso de una persona en relación con su altura	Peso (Kg)/ talla (m) <sup>2</sup>	Desnutrición <18.5 Normal: 18.5-24.9 Sobrepeso 25-29.9 Obesidad >30
Presión arterial	Presión ejercida sobre una pulgada cuadrada de vaso sanguíneo	Milímetros de mercurio (tensiómetro)	Normal: 120/80mmHg Pre hipertensión: 120-139/80-89 mmHg Hipertensión estadio 1: 140-159/90-99 mmHg Hipertensión estadio 2: >160/>100 mmHg
Índice cintura-cadera	Índice de medida entre el perímetro de cintura y el perímetro de caderas	Centímetros (cinta métrica)	Hombres: <1.0 Mujeres: <0.88
Nivel plasmático de AGEs	Productos finales de glicación avanzada medidos por la intensidad de luminiscencia en suero al ser excitados por un espectro de 300-420 nm	Área bajo la curva resultante del espectro captado (unidades arbitrarias)	Unidades arbitrarias (AU)

Glucosa en sangre	Concentración de glucosa en sangre con al menos 12 horas de ayuno sin suspender el consumo habitual de carbohidratos	Miligramos por decilitro	Hipoglicemia: <60 mg/ml Normal: 60-99 mg/dL Glucosa anormal en ayunas: 100-125 mg/dL Hiperglicemia: >126 mg/dL
Hemoglobina glicosilada (HbA <sub>1c</sub> )	Nivel promedio de glucosa en sangre en los tres meses previos a la prueba	Porcentaje de hemoglobina unida a A <sub>1c</sub> en suero	5-6%: 80-120mg/dL 6-7%: 120-150mg/dL 7-8%: 150-180mg/dL 8-9%: 180-210 mg/dL 9-10%: 210-240 mg/dL 10-11%: 240-270 mg/dL 11-12%: 270-300mg/dL 12-13%: 300-330 mg/dL
Colesterol total	Concentración en sangre del conjunto de colesterol HDL y LDL	Miligramos por decilitro	<b>Colesterol total</b> Deseable: <200 mg/dL Límite superior: 200-239 mg/dL Alto: ≥240 mg/dL <b>Colesterol LDL</b> Óptimo: <100 mg/dL Cercano a óptimo: 100-139 mg/dL Límite superior: 130-159 mg/dL Alto: 160-189 mg/dL Muy alto: ≥190 mg/dL <b>Colesterol HDL</b> Bajo: <40 mg/dL

			Alto: ≥60 mg/dL
Triglicéridos	Concentración en sangre de triglicéridos	Miligramos por decilitro	Normal: <150 mg/dL Límite superior: 150-199 mg/dL Alto: 200-499 mg/dL Muy alto: ≥500 mg/dL
Creatinina en sangre	Contenido sanguíneo de creatinina	Miligramos por decilitro	Mujeres: 0.5-0.9 mg/dL Hombres: 0.6-1.2 mg/dL
Control metabólico	Criterios tomados de la Asociación Americana de Diabetes y otras sociedades científicas <sup>23,24</sup> en base a los exámenes realizados en el estudio.	Buen control metabólico  Mal control metabólico	Glicemia basal: <110 mg/dl HbA <sub>1c</sub> : <7% PAS/PAD: <140/80 mmHg Colesterol total: <185 mmHg Colesterol HDL: Mujeres: >50 mg/dl Hombres: >40 mg/dl Colesterol LDL: <100 mg/dl Triglicéridos: <150 mg/dl
Depuración de creatinina	Medición indirecta de la tasa de filtrado glomerular, realizada mediante la fórmula de Cockcroft-Gault.  $FGR = \frac{140 - edad (años) \times peso (Kg)}{Creatinina (mg/dl) \times 72}$ Para mujer multiplicar por 0.85  Para el estudio se determina con una sola medición y sin tener en cuenta datos de microalbuminuria.	Mililitros por minuto	≥90 ml/min sin riesgo: 0 ≥90 ml/min con riesgo: Estadío 1 60-89 ml/min: Estadío 2 30-59 ml/min: Estadío 3 15-29 ml/min: Estadío 4 <15 ml/min o diálisis: Estadío 5



### **3.6. MÉTODO DE RECOLECCIÓN DE DATOS**

El trabajo de campo dio inicio con la autorización previa del Comité de Tesis de la Facultad de Medicina de la Universidad Dr. José Matías Delgado.

Se obtuvo el consentimiento informado de 19 pacientes del servicio de diálisis del Hospital Médico Quirúrgico del ISSS (grupo C). Debido al proceso tardío y engorroso del comité local, la autorización para la entrevista de dichos pacientes nunca fue girada, por lo que se realizó el estudio sólo con las muestras de suero.

Los participantes correspondientes al grupo de pacientes no diabéticos y diabéticos ambulatorios (grupos A y B) fueron entrevistados y evaluados según ficha clínica y sometidos a la toma de muestra sanguínea, previa autorización mediante consentimiento informado.

Las muestras sanguíneas fueron recolectadas de los pacientes de cada grupo. Una muestra sanguínea de aproximadamente 3 ml fue tomada por venopunción mediante vacutainer en vena cefálica, mediana o cubital, según conveniencia. Se aplicaron las precauciones y reglas universales de bioseguridad con respecto al manejo de líquidos biológicos y material infeccioso según las normas universales de bioseguridad.<sup>46</sup> La muestra fue centrifugada a 2500 revoluciones por 4 minutos y el suero resultante fue dividido en dos alícuotas.

Una primera alícuota se analizó en equipo automatizado Cobas C501 HITACHI para la analítica de químicas sanguíneas.

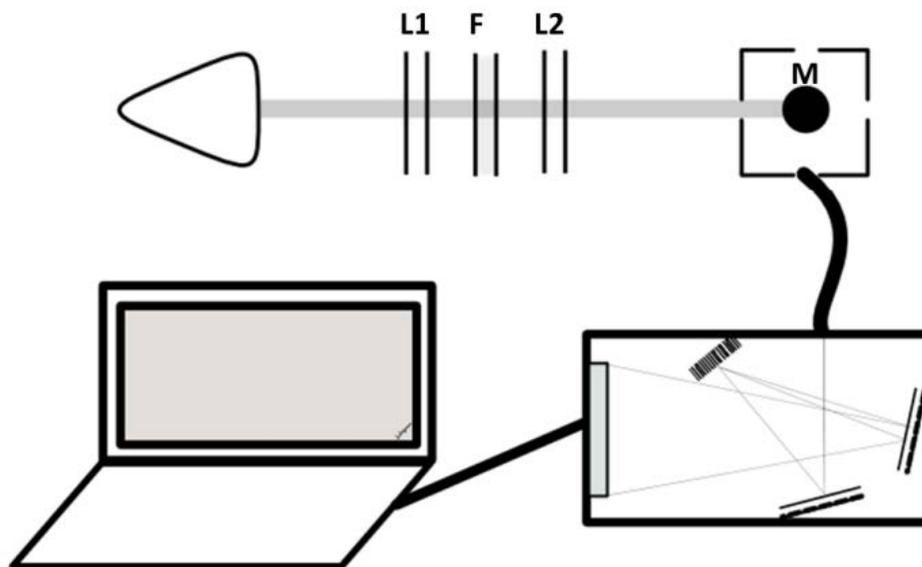
Una segunda alícuota fue destinada al análisis por dispositivo de espectroscopia operado y diseñado por Lic. Ricardo Canjura, perteneciente al equipo del laboratorio de espectroscopia de la Universidad de El Salvador, dirigido por el Dr. Carlos Rudamas, PhD.

La técnica de espectroscopia óptica requirió como equipo a utilizar:

- Fibra óptica: Diámetro de 400 micras, rango de 300-1100 nm, transmisión del 83% en el rango de 350-900 nm.
- Espectrógrafo: USD4000, resolución de 10 nm, rango de 200-1100 nm, ángulo blaze de 500 nm; para recolección de emisión de luz en forma análoga y su transformación digital como espectro.

- Fuente de excitación: Lámpara de mercurio (banda de excitación de 300 a 400 nm) con un máximo de 365 nm.
- Filtro pasa banda y paso alto: Delimitarán el espectro de excitación para la colección de la fotoluminiscencia.
- Lentes
- Computadora
- Software Spectra suite

El equipo para la medición de fluorescencia en la muestra de suero es un acople de diversos instrumentos. En primer lugar, un arreglo de filtros que delimita el área de excitación en la muestra, un dispositivo que restringe la luz de fondo del ambiente donde se realizaron las mediciones y lentes para enfocar el haz de excitación.



**Figura 8.** Esquema de montaje experimental de fotoluminiscencia. L1 y L2: Lentes; F: Filtro; M: Muestra.

La metodología para la toma consistió en excitar la muestra en cubeta a 365 nm, ocurriendo una emisión de AGEs en una banda de 420-600 (con corrección por corriente oscura para cada muestra). Posteriormente se procedió a coleccionar la fotoluminiscencia.

### **3.7. ANÁLISIS Y PROCESAMIENTO DE DATOS**

Cada uno de los pacientes contó con una ficha. Los datos allí consignados fueron vertidos en matrices de Microsoft Excel y posteriormente importados al programa GraphPad Prism.

Las comparaciones entre grupos se hicieron mediante  $X^2$ , ANOVA, prueba T, test de Kruskal-Wallis, test de Mann Whitney U y pruebas de comparación múltiple.

Para la búsqueda de asociación se realizaron tablas de contingencia y correlación de Spearman.

### **3.8. CONSIDERACIONES ÉTICAS**

El presente trabajo se realizó bajo las directrices de las buenas prácticas de investigación.

Considerando de suma importancia respetar la integridad moral de los pacientes, se les explicó detalladamente lo que se pretendía realizar con la investigación y se les dieron a conocer los resultados de la investigación. Por este motivo, se pidió su aceptación a través de un documento de consentimiento en el cual brindaron su autorización para la extracción de muestra sangre.

El presente estudio contó con la aprobación del Comité de Tesis de la Universidad Dr. José Matías Delgado.

#### **Hoja explicativa del procedimiento para el paciente:**

Mediante el presente estudio se desea explicar la importancia del control adecuado de la diabetes mellitus. Hay muchas complicaciones graves que puede causar esta enfermedad con el paso de los años y esto se acelera cuando no tenemos un buen control de la glucosa, si hay obesidad, si hay colesterol y triglicéridos altos, si no realizamos ejercicio y si no se toma la medicina según lo indica su médico.

En este estudio deseamos pedirle su colaboración para que una persona experta extraiga aproximadamente 3 mililitros de sangre para realizar una serie de exámenes de química sanguínea importantes. Con éstos vamos a obtener una serie de datos que indican que mantener un estado de glucosa elevado en sangre ocasiona la acumulación de otras sustancias que dañan muchos órganos.

De esta manera, queremos estudiar si hay un daño de los riñones mediante un método llamado espectroscopia óptica.

Los datos que sean obtenidos serán confidenciales. Por lo tanto, pedimos su autorización completando la hoja de consentimiento informado y le pedimos que en cualquier momento que usted no se encuentre de acuerdo con esta investigación nos lo haga saber inmediatamente.

Muchas Gracias.

## CAPÍTULO 4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 4.1. RESULTADOS

Un total de 53 pacientes pertenecientes a tres diferentes grupos fueron enrolados en el presente estudio; el grupo A (17 pacientes no diabéticos), derivados de unidades de atención ambulatoria; grupo B (17 pacientes diabéticos) procedentes de las mismas unidades y grupo C (19 pacientes diabéticos con daño renal – IRC estadio 5) pertenecientes al programa de hemodiálisis del Instituto Salvadoreño del Seguro Social (ISSS).

Para el análisis estadístico de cada una de las variables estudiadas se realizó el test exploratorio de normalidad D'Agostino-Pearson, con lo que se estableció su tratamiento estadístico (paramétrico o no paramétrico).

Para el análisis de la variable edad se realizó el test de ANOVA con post-test de Tukey, no mostrando diferencias estadísticamente significativas entre los grupos,  $p=0.079$ . Con respecto a la variable sexo se aplicó el test de Chi cuadrado, observando diferencias estadísticamente significativas entre grupos,  $p<0.001$ . **Tabla 1.**

**Tabla 1. Características demográficas de pacientes**

Variable	No diabéticos	Diabéticos	Renales	P
Edad ( $\bar{x} \pm SD$ )	46.18 $\pm$ 20.51	57.59 $\pm$ 8.25	44.58 $\pm$ 15.64	0.035
Sexo n (%)				<0.001
Femenino	10 (58.8%)	14 (82.4%)	3 (15.8%)	
Masculino	7 (41.2%)	3 (17.6%)	16 (84.21%)	

*53 pacientes con edades comprendidas entre 24 y 87 años.*

Las características clínicas de los pacientes (**Tabla 2**) se obtuvieron únicamente para los grupos A y B. Las variables de índice de masa corporal (IMC), tensión arterial sistólica (TAS) y tensión arterial diastólica (TAD) se analizaron mediante la prueba T, obteniendo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos para las tres variables.

Para la variable índice cintura/cadera (índice C/C) se realizó el análisis mediante el test de Mann-Whitney U, que no reflejó diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

Algunas variables influyentes con una tendencia a la diferencia entre ambos grupos fueron: presencia dislipidemia en 11.8% vs. 35.3% en los pacientes diabéticos, así como la presentación de cardiopatía en un 0% vs. 11.8% e hipertensión 35.3% vs. 52.9%. En relación a los pacientes sin antecedentes médicos se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos (Chi cuadrado),  $p=0.007$ .

**Tabla 2. Características clínicas de pacientes**

Variable	No diabéticos	Diabéticos	P
<b>IMC</b> ( $\bar{x} \pm SD$ )	25.43 $\pm$ 4.18	31.60 $\pm$ 4.72	<0.001
<b>TAS</b> ( $\bar{x} \pm SD$ )	115.9 $\pm$ 11.21	127.6 $\pm$ 6.64	0.001
<b>TAD</b> ( $\bar{x} \pm SD$ )	69.41 $\pm$ 7.48	82.35 $\pm$ 10.33	<0.001
<b>Índice C/C</b> Md (P25/P75)	0.89 (0.85/0.96)	0.89 (0.86/0.89)	0.566
<b>Medicamentos utilizados</b> n (%)			
Antihipertensivos	5 (29.4%)	12 (70.6%)	
Estatinas	1 (5.9%)	1 (5.9%)	
<b>Antecedentes médicos</b> n (%)			
Dislipidemia	2 (11.8%)	6 (35.3%)	
Cardiopatía	0	2 (11.8%)	
Hipertensión arterial	6 (35.3%)	9 (52.9%)	
Ninguno	7 (41.2%)	0	0.007

*Las variables de IMC, TAS y TAD recibieron tratamiento estadístico paramétrico, por lo que se expresan en términos de media aritmética ( $\bar{x}$ ) y desviación standard (SD). Para la variable de índice cintura/cadera, por no presentar una distribución normal, se expresa mediana (Md) y rangos intercuartílicos 25% y 75%. Para las variables nominales de mayor relevancia se obtuvo la frecuencia (n) y porcentaje.*

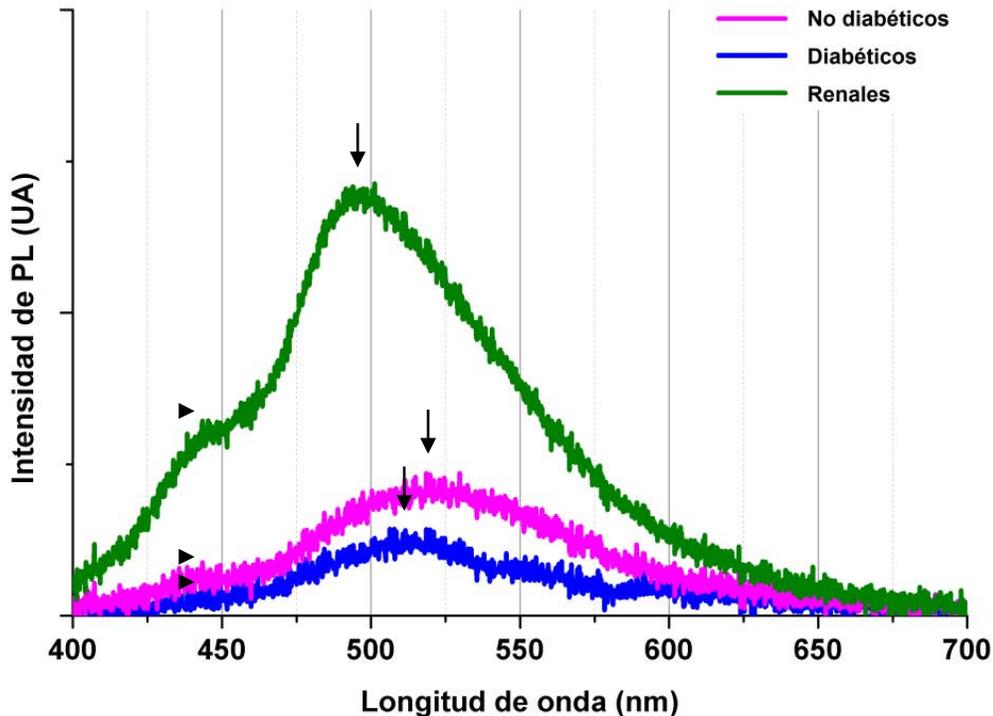
Con relación a los datos de los pacientes diabéticos (no en hemodiálisis), se tiene un promedio de 88.76 meses de enfermedad desde el diagnóstico. En cuanto a los medicamentos utilizados, de los 17 pacientes en tratamiento 2 refieren manejo con dieta y ejercicio, 1 paciente está siendo manejado con una sulfonilurea, 7 están tratados sólo con biguanidas, 4 reciben tratamiento con biguanida y sulfonilurea, 1 paciente recibe tratamiento con insulina y sulfonilurea, y 2 reciben combinación de biguanida, sulfonilurea e insulina. El número de pacientes administrando cada tipo de medicamentos (combinado o no) se resume en la **Tabla 3**.

**Tabla 3. Características de pacientes diabéticos**

Variable	( $\bar{x} \pm SD$ )	n (%)
<b>Tiempo de enfermedad (meses)</b>	88.76 $\pm$ 54.4	
<b>Medicamentos utilizados</b>		
Biguanidas		12 (70.6%)
Sulfonilureas		9 (52.9%)
Insulina		3 (7.6%)
Ninguno		2 (11.8%)

El estudio de fotoluminiscencia del suero de la totalidad de los pacientes fue realizado con la colaboración del equipo del Dr. Carlos Rudamas en el laboratorio de espectroscopia, excitando las muestras individualmente dispuestas en cubetas con una longitud de onda de 365 nm para observar emisión de AGEs en la banda entre 420 nm y 600 nm (luz visible) para la recolección de fotoluminiscencia.

**Gráfica 1. Promedio de la medición indirecta de AGEs por grupo**



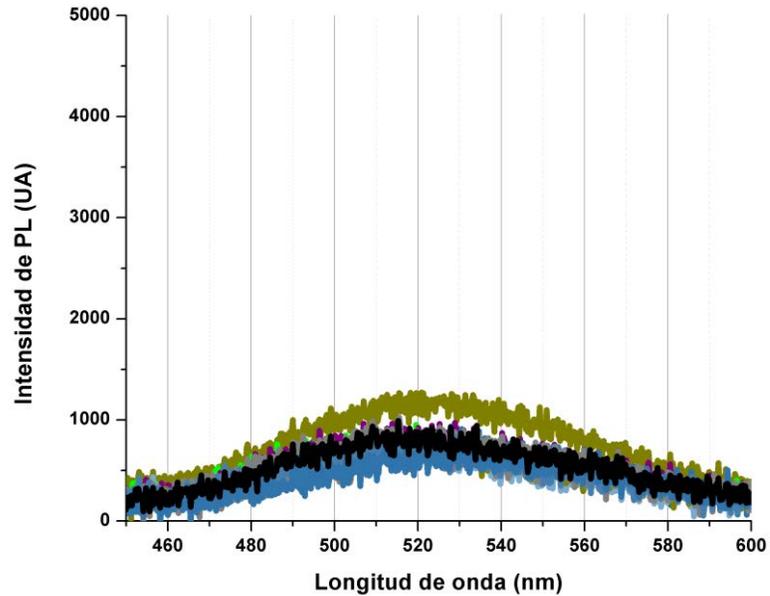
*Intensidad de PL: Intensidad de fotoluminiscencia (proporcional al área bajo la curva), UA: unidades arbitrarias, nm: nanómetros. Grupo A: No diabéticos, grupo B: diabéticos, grupo C: Renales.*

Al realizar la medición indirecta de AGEs, promediando los resultados por grupo, se obtuvieron las curvas que se muestran en la **Gráfica 1**. En base a esto, es posible observar en nuestras muestras un máximo relativo u hombro (*puntas de flecha*), de relevancia para nuestro estudio, más evidente para el grupo de pacientes renales. Asimismo, se observa un máximo absoluto que varía para cada grupo de pacientes (*flechas*), tanto en la intensidad de fotoluminiscencia (eje Y) como en la longitud de onda (eje X).

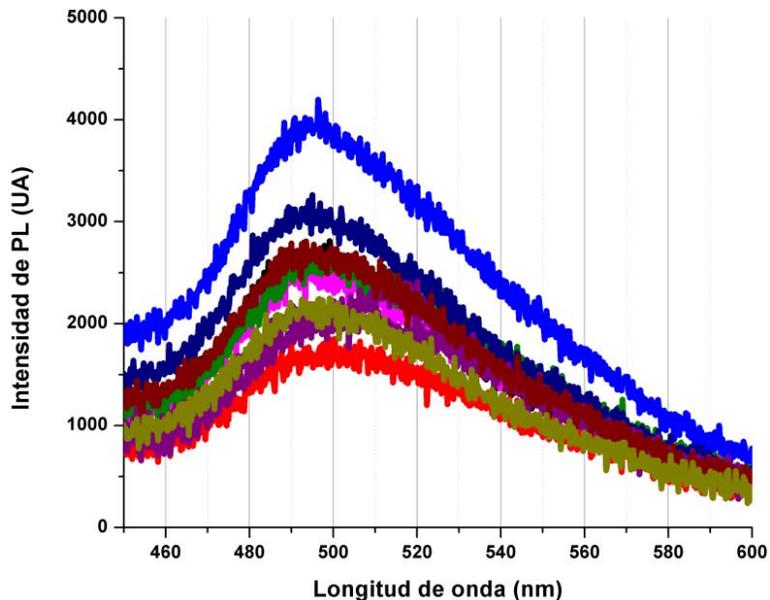
Obsérvense, a continuación, las curvas obtenidas para los pacientes de cada grupo. Se observa una morfología de onda característica de la condición clínica. Para los grupos A y C se han graficado algunos de los espectros a una misma escala para facilitar su

comparación. En las **Gráfica 2** y **Gráfica 3** es posible observar el máximo absoluto descrito anteriormente para las curvas promedio.

**Gráfica 2. Espectros de pacientes no diabéticos (Grupo A)**



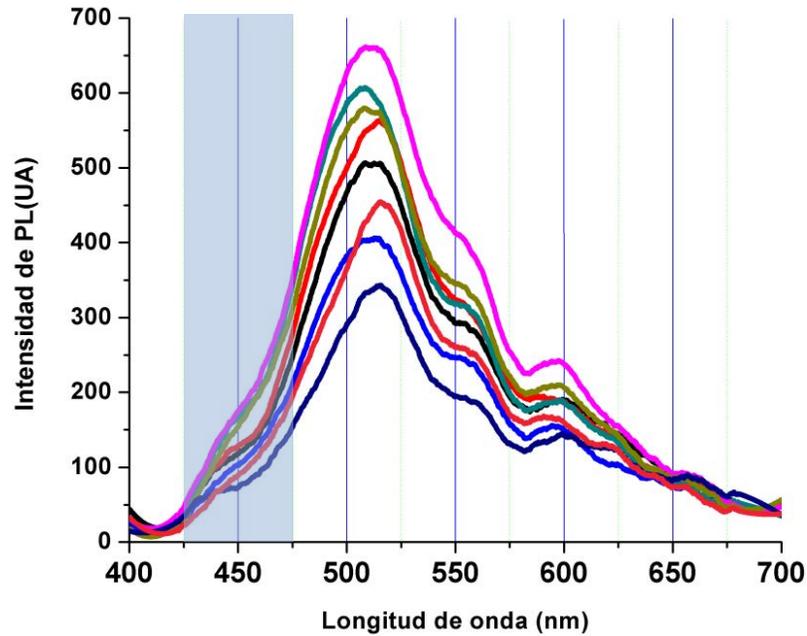
**Gráfica 3. Espectros de pacientes diabéticos en hemodiálisis (Grupo C)**



Los espectros de pacientes diabéticos (grupo B) se graficaron utilizando una diferente escala para poder visualizar la morfología de las curvas, correspondiendo a una menor intensidad de emisión que los otros grupos de pacientes (debajo de 1000 UA). Es posible distinguir un máximo absoluto y más de un máximo relativo a diferentes longitudes de

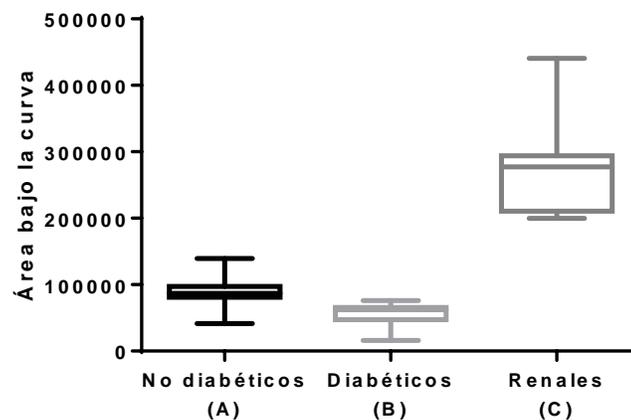
onda. Para este estudio se consideraron más relevantes el máximo absoluto y el máximo relativo ubicado en la franja entre 425 y 475 nm (sombreado celeste). **Gráfica 4.**

**Gráfica 4. Espectros de pacientes diabéticos (Grupo B)**



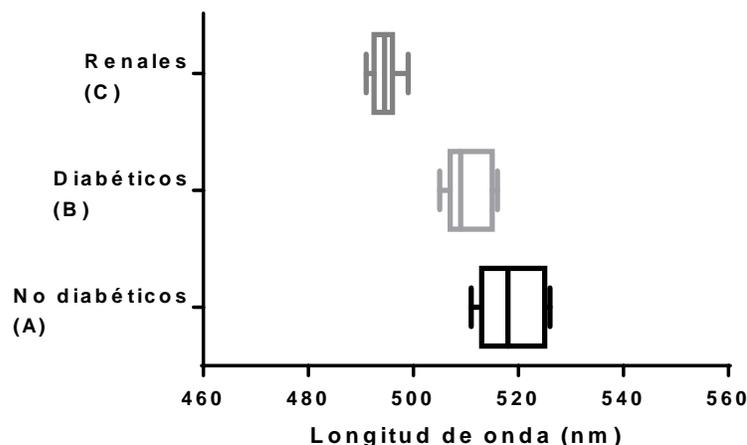
El análisis de la intensidad de fotoluminiscencia para el máximo absoluto de cada grupo se realizó mediante el test de ANOVA y test de comparación múltiple de Dunn en términos de área bajo la curva (standard de publicación en fotoluminiscencia) resultando estadísticamente significativas con una  $p < 0.001$  y los post-test con diferencia entre todos los grupos. **Gráfica 5.**

**Gráfica 5. Comparación de área bajo la curva**



Por otro lado, a la variable de longitud de onda acorde al máximo absoluto, se le aplicó el test de ANOVA, obteniendo  $p < 0.001$ , con post-test de Tukey, que refleja diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos. **Gráfica 6.**

**Gráfica 6. Comparación de longitudes de onda para máximo absoluto**



En relación a la intensidad de fotoluminiscencia a una longitud de onda de 440 nm, se realizó la comparación aplicando el test de ANOVA con post-test de Tukey, obteniendo significancia estadística con  $p < 0.001$  con diferencias entre los grupos A vs. C y B vs. C. Las pruebas de laboratorio fueron realizadas por equipo automatizado. En los casos de los grupos A y B en laboratorio particular y en el caso del grupo C en laboratorio clínico institucional del Hospital Médico-Quirúrgico (ISSS). Los resultados se resumen en la **Tabla 4.**

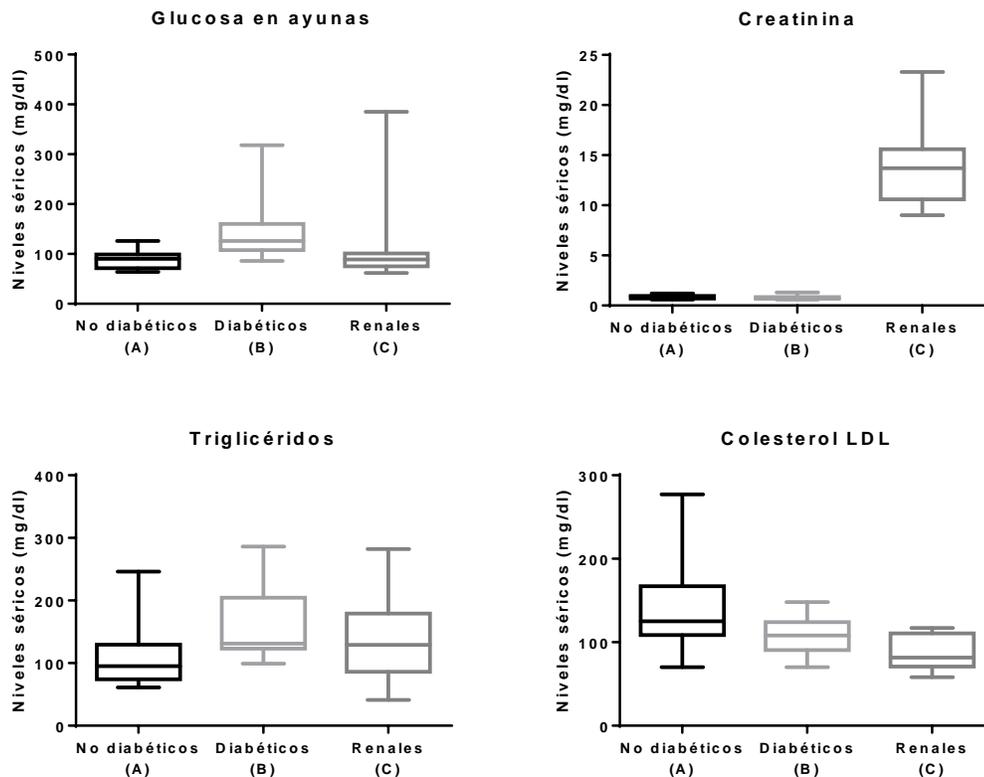
**Tabla 4. Datos de laboratorio**

Variable	No diabéticos	Diabéticos	Renales
<b>Glucosa en ayunas (mg/dl)</b> Md (P25/P75)	90 (71.5/99)	126 (107.5/160)	89 (75/101)
<b>Hemoglobina glicosilada (%)</b> Md (P25/P75)	4.5 (4.2/4.85)	6.3 (5.9/7.5)	-
<b>Triglicéridos (mg/dl)</b> Md (P25/P75)	95 (74/129.5)	131 (123/204)	129 (86/179)
<b>Colesterol total (mg/dl)</b> $\bar{x} \pm SD$	189.8 $\pm$ 30.02	250 $\pm$ 77.2	135.7 $\pm$ 26.35
<b>Colesterol HDL (mg/dl)</b> $\bar{x} \pm SD$	59.41 $\pm$ 14.59	77.41 $\pm$ 31.82	-
<b>Colesterol LDL (mg/dl)</b> Md (P25/P75)	125.0 (108.5/167)	108.0 (90.5/124)	81.50 (70.75/110.5)
<b>Colesterol VLDL (mg/dl)</b>	19.00 (15/26)	26.00 (24.5/41)	-

Md (P25/P75)			
<b>Creatinina (mg/dl)</b>	0.9 (0.7/0.95)	0.7 (0.7/0.85)	13.7 (10.6/15.6)
Md (P25/P75)			
<b>Depuración de creatinina (ml/min)</b>	98.10 ± 35.81	106.6 ± 33.48	-
$\bar{x} \pm SD$			

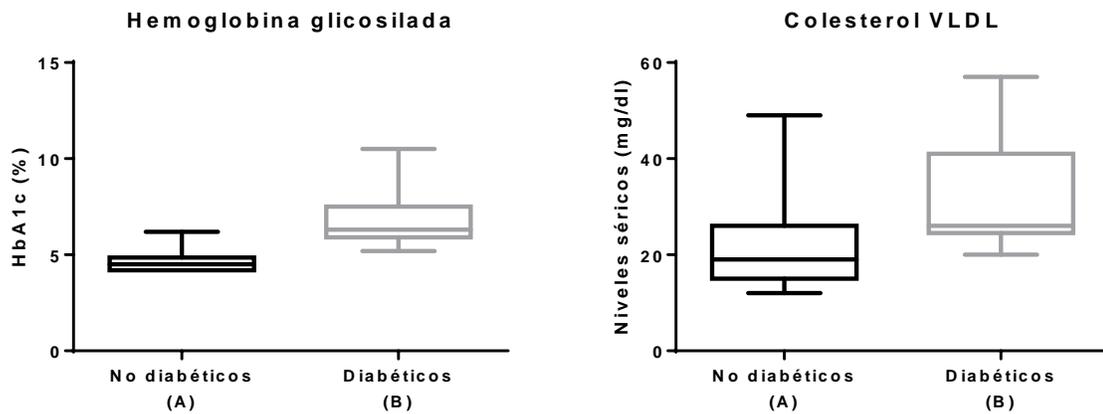
Las variables de colesterol total, colesterol HDL y depuración de creatinina describieron una distribución Gaussiana, por lo que se expresa media aritmética ( $\bar{x}$ ) y desviación standard (SD). Las variables restantes recibieron tratamiento estadístico no paramétrico, expresando mediana (Md) y rangos intercuartílicos 25% y 75%. La HbA<sub>1c</sub>, colesterol HDL, colesterol VLDL y depuración de creatinina de pacientes del grupo C (pacientes diabéticos en hemodiálisis) no fueron facilitados por el laboratorio.

Las tendencias en los valores químicos son inherentes al padecimiento de cada grupo de pacientes. Los valores de glucosa, creatinina, triglicéridos y colesterol LDL se analizaron mediante el test de Kruskal-Wallis, con post-test de Dunn, mostrando en todas las variables diferencias estadísticamente significativas con  $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ,  $p = 0.031$  y  $p = 0.001$ , respectivamente. Los post-tests mostraron las siguientes diferencias entre grupos: glucosa A vs. B y B vs. C, creatinina A vs. C y B vs. C, triglicéridos A vs. B y colesterol LDL A vs. C. **Figura 9.**



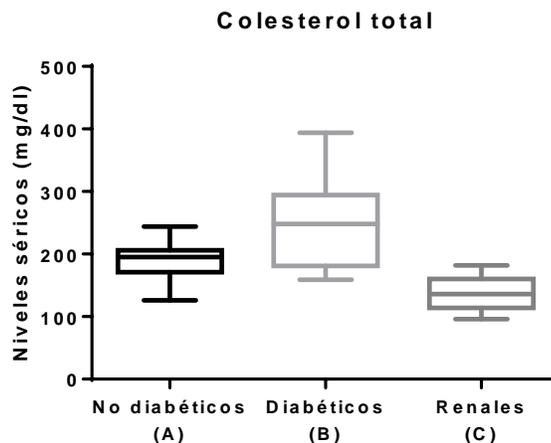
**Figura 9.** Pruebas de laboratorio analizadas por test de Kruskal-Wallis y post-test de Dunn.

Las comparaciones entre los grupos A y B de valores de HbA<sub>1c</sub> y el colesterol VLDL fueron realizadas mediante el test de Mann-Whitney U mostrando diferencias estadísticamente significativas con  $p < 0.0001$  y  $p = 0.0026$ , respectivamente. **Figura 10.**



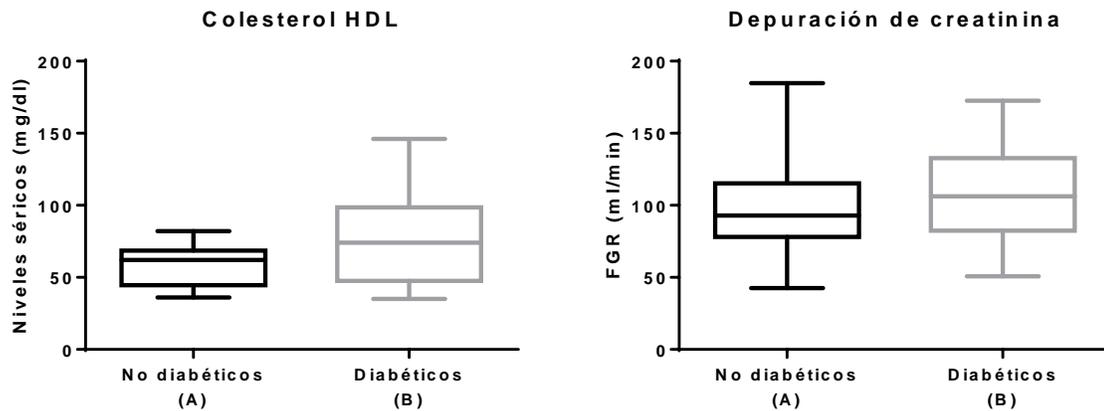
**Figura 10.** Pruebas de laboratorio analizadas por test de Mann-Whitney U.

La variable de colesterol total se analizó con test de ANOVA y post-test de Tukey, mostrando diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos con  $p < 0.0001$ . **Figura 11.**



**Figura 11.** Prueba de laboratorio analizada por test de ANOVA y post-test de Tukey.

Las variables paramétricas colesterol HDL y depuración de creatinina fueron expuestas a la prueba T,  $p = 0.0453$  y  $p = 0.4801$ , respectivamente. En cuanto a los resultados de depuración de creatinina se muestra que no hay diferencias estadísticamente significativas. **Figura 12.**



**Figura 12.** Pruebas de laboratorio analizadas por prueba T.

Se realizó una correlación de Spearman entre cada variable analizada y el área bajo la curva. **Tabla 5.**

**Tabla 5. Correlación entre variables y área bajo la curva**

Variable	R	P
Creatinina sérica	0.842	< 0.001*
Estadío de ERC	0.610	< 0.001*
Índice C/C	0.224	0.272
Tiempo de diagnóstico DM	0.078	0.822
Peso	0.052	0.802
Triglicéridos	0.036	0.831
Colesterio VLDL	0.017	0.934
Colesterol HDL	-0.084	0.683
Depuración de creatinina	-0.096	0.641
Edad	-0.154	0.355
IMC	-0.198	0.333
Colesterol LDL	-0.303	0.111
TAS	-0.385	0.052
Glucosa	-0.443	0.005*
HbA <sub>1c</sub>	-0.470	0.015*
TAD	-0.526	0.006*
Colesterol total	-0.584	< 0.001*

\* Estadísticamente significativa. Las variables se han ordenado en orden descendente con respecto al valor de r. Los valores de r entre 0 y 1 reflejan una correlación directamente proporcional. Los valores entre 0 y -1 reflejan una correlación inversamente proporcional.

Debe considerarse especialmente el valor de r, que expresa el grado de asociación entre variables (entre más cercano a uno mayor grado de relación) y el sentido de la relación de estas en términos de aumento o disminución (positiva o directa cuando al aumentar

una variable aumenta la otra; negativa o inversa cuando al crecer una variable, la otra decrece). La correlación es nula cuando no existe ninguna relación y la nube de puntos está distribuida al azar.

Las variables creatinina sérica y estadio de enfermedad renal crónica (ERC) presentaron una correlación con área bajo la curva de significancia estadística. Así ocurre con las variables de HbA<sub>1c</sub>, glucosa en ayunas, TAD y colesterol total, las cuales presentan correlaciones inversamente proporcionales, a diferencia de las correlaciones creatinina vs. área bajo la curva y estadio ERC vs. área bajo la curva.

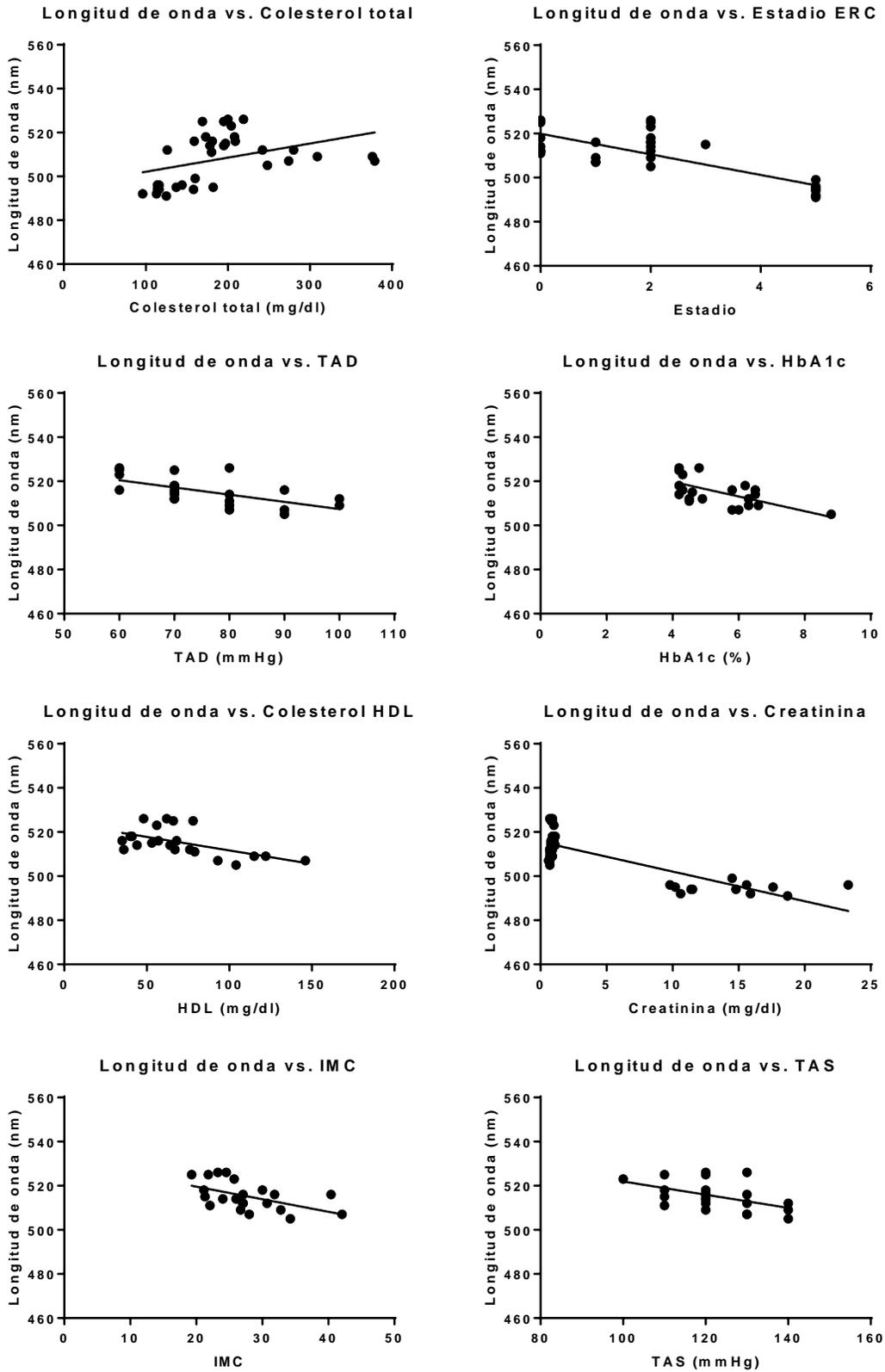
De la misma forma, se realizó una correlación de Spearman para cada variable con la longitud de onda en el máximo absoluto. **Tabla 6.**

**Tabla 6. Correlación entre variables y longitud de onda**

Variable	R	P
Colesterol total	0.523	0.002*
Glucosa	0.308	0.077
Tiempo de diagnóstico DM	0.123	0.753
Colesterol LDL	0.067	0.751
Índice cintura-cadera	0.038	0.866
Edad	-0.102	0.567
Triglicéridos	-0.159	0.369
Depuración de creatinina	-0.174	0.439
Peso	-0.253	0.255
Colesterol VLDL	-0.333	0.131
TAS	-0.480	0.024*
IMC	-0.553	0.008*
Creatinina	-0.559	< 0.001*
Colesterol HDL	-0.597	0.003*
HbA <sub>1c</sub>	-0.606	0.003*
TAD	-0.655	< 0.001*
Estadio de enfermedad renal	-0.703	< 0.001*

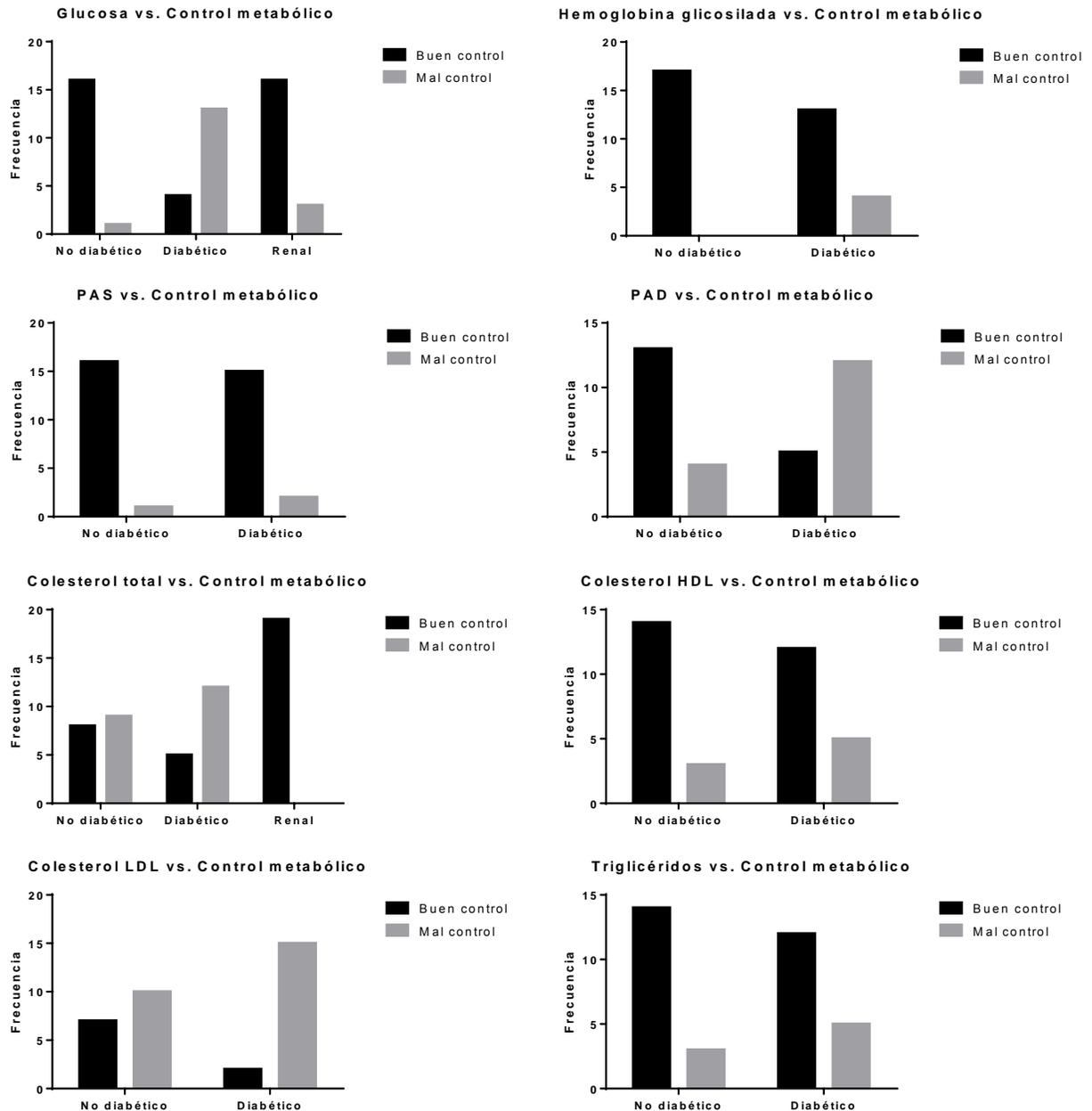
\* Estadísticamente significativa. Variables ordenadas en orden descendente con respecto al valor de  $r$ .

La variable de colesterol total presentó una correlación estadísticamente significativa con longitud de onda. Lo mismo se observa para las variables de estadio de ERC, TAD, HbA<sub>1c</sub>, colesterol HDL, creatinina sérica, IMC y TAS, pero con una correlación negativa, a diferencia de la primera. El orden en que se han mencionado las últimas corresponde a la intensidad de la correlación (a menor  $r$  mayor intensidad). **Figura 13.**



**Figura 13.** Correlaciones estadísticamente significativas con longitud de onda para máximo absoluto.

Para determinar la asociación entre los exámenes de laboratorio de los pacientes con un buen o un mal control metabólico se realizó el test de Chi cuadrado, el cual demostró asociaciones estadísticamente significativas para colesterol total, glucosa (ambas  $p < 0.001$ ) y TAD,  $p = 0.015$ . **Figura 14.**



**Figura 14.** Clasificación de pacientes según criterios de control metabólico por grupo. Se aplicaron los criterios de la Asociación Americana de Diabetes a cada paciente: glicemia basal  $< 110$  mg/dl;  $HbA_{1c} < 7\%$ ; PAS/PAD  $< 140/80$  mmHg; colesterol total  $< 185$  mmHg; colesterol HDL mujeres  $> 50$  mg/dl, hombres  $> 40$  mg/dl; colesterol LDL  $< 100$  mg/dl; triglicéridos  $< 150$  mg/dl.

## 4.2. DISCUSIÓN

El papel de los productos finales de glicación avanzada (AGEs) en el desarrollo de complicaciones crónicas de la diabetes ha sido bien estudiado. Su detección o medición podría poner en alerta tanto a médicos como a pacientes para la instauración de medidas agresivas para su control.

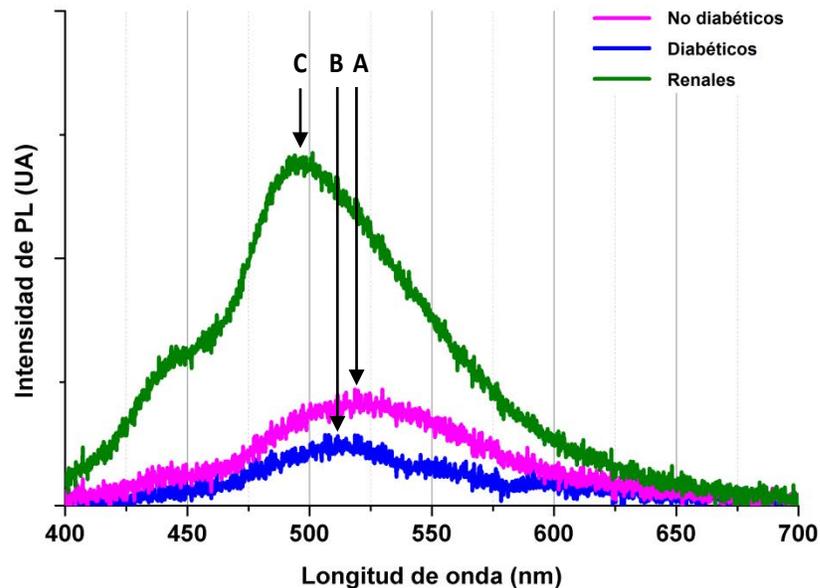
Se propone un método de fotoluminiscencia para la detección de AGEs por su emisión en el suero de pacientes asignados a tres grupos que representan diferentes estadios de la enfermedad según su evolución natural (no diabéticos, diabéticos, diabéticos con daño renal). La metodología propuesta se fundamenta en investigaciones publicadas que estudian la franja de longitud de onda comprendida entre emisiones de 400 a 600 nm con una excitación de 365 nm.<sup>47,48</sup> Los resultados obtenidos demuestran que dicha franja es la adecuada para analizar la emisión de AGEs de forma indirecta.

Los AGEs son un grupo de moléculas heterogéneas y no existe a la fecha un método universalmente aceptado para su medición con fines clínicos.<sup>49,50</sup> La técnica propuesta capta la emisión de fluorescencia en respuesta a una excitación específica de los llamados fluoróforos, los cuales se encuentran dispuestos sobre alguna de las proteínas existentes en plasma. En el caso de los mamíferos se ha demostrado que la mayor parte de la fluorescencia del plasma se debe predominantemente a la albúmina,<sup>51</sup> con una longitud de onda atribuible a la franja entre 425 nm y 475 nm,<sup>47,48</sup> lo que la convierte en foco de estudio y análisis para este trabajo.

El análisis de los sueros se reflejó en gráficas que permitieron encontrar un máximo absoluto reproducible y con la misma morfología para todas las muestras. Este máximo absoluto no ha sido aún caracterizado o asignado en publicaciones anteriores, probablemente debido a la complejidad de la composición del suero.<sup>52</sup> En torno a esto, Galler *et al.* afirma que la propiedad de fluorescencia de las proteínas no es únicamente debida a AGEs, sino también a productos de peroxidación lipídica, tales como los compuestos malondialdehído-proteína (atribuibles a stress metabólico y daño celular), que también emiten a una excitación en rangos de longitud de onda similares a los de los AGEs<sup>51</sup> y adicionalmente pueden ocasionar alteraciones en su emisión, como se describirá más adelante.<sup>53</sup>

Las diferencias observadas en la medición indirecta de AGEs en suero dentro del laboratorio y consecuente representación gráfica, exhiben significancia estadística al comparar el área bajo la curva de cada uno de los tres grupos. Se presenta, de esta forma, una mayor área en los pacientes con daño renal, seguidos por los pacientes no diabéticos y, finalmente, los pacientes diabéticos con las cifras más bajas de intensidad de fotoluminiscencia (**Gráfica 7**). Estos hallazgos no concuerdan con los de investigaciones similares en las que se utiliza el mismo principio de fotoluminiscencia en la piel de pacientes pertenecientes a grupos análogamente dispuestos, en donde el orden guarda una relación directa con el grado de la enfermedad.<sup>45,48,54-57</sup> Esta discordancia puede atribuirse, entre otras causas, al fenómeno conocido como *quenching*, según el cual existen factores que pueden interferir en la fluorescencia de una molécula, disminuyendo su intensidad o haciendo que la energía liberada por su excitación ya no sea emitida como fluorescencia.<sup>53,58</sup>

**Gráfica 7. Diferencias en longitud de onda por grupo**



El *quenching* observado es un fenómeno común estudiado por la farmacología, por la que se conoce que los medicamentos se fijan a las proteínas plasmáticas para ser transportados. Dicha unión, en este caso, constituye un *quenching*, sobre el que se han publicado resultados para múltiples medicamentos. Se conocen, en efecto, investigaciones sobre este fenómeno para los hipoglicemiantes,<sup>59</sup> como la glibenclamida y la metformina, que tienen la capacidad de unirse a la albúmina sérica glicosilada y no

glicosilada. En el montaje de este estudio, ese es el factor que ocasiona una menor emisión, con efectos sobre las gráficas resultantes para el grupo de pacientes diabéticos<sup>51</sup>. Los resultados se atribuyen a ese *quenching*, pues en el grupo en mención, 15 de 17 pacientes (88.2%) son tratados con metformina y glibenclamida (solos o en combinación).

El mismo análisis se realizó para el máximo relativo de fotoluminiscencia (hombro), con emisión a 440 nm. En este caso la diferencia estadística no resultó relevante, consideradas las causas de *quenching* anteriormente descritas.<sup>53,58,59</sup>

El análisis de la longitud de onda para el máximo absoluto por grupo (**Gráfica 7**), mostró diferencias estadísticamente significativas entre las tres poblaciones, con longitudes de onda más cortas para los pacientes diabéticos en hemodiálisis (grupo C), seguidos de los pacientes diabéticos (grupo B) y, finalmente, correspondiendo longitudes de onda más largas a los pacientes no diabéticos (grupo A). Esta diferencia en la longitud de onda guarda una relación con el estadio de la enfermedad y es posible describirla como desplazamiento o *shifting*, que constituye un fenómeno ocasionado por cambios de la polaridad alrededor de las moléculas.

Dicha gráfica, muestra diferencias inherentes a las características clínicas de cada uno de los grupos, para los cuales el análisis comparativo de las variables de control metabólico y longitud de onda determinó que se trataba de poblaciones distintas entre sí. Los parámetros químicos estudiados reflejan coherencia con los resultados obtenidos (glucosa, creatinina y colesterol total ( $p < 0.001$ ), colesterol LDL  $p = 0.001$  y triglicéridos  $p = 0.031$  para los tres grupos; HbA<sub>1c</sub>  $p < 0.001$ , colesterol VLDL  $p = 0.002$ , colesterol HDL  $p = 0.04$  y depuración de creatinina  $p = 0.48$  para los grupos A y B).

La mayoría de datos favorece a los pacientes no diabéticos y pareciera afectar más a los pacientes diabéticos. No obstante, en relación a los pacientes diabéticos en hemodiálisis, se presenta una paradoja, que sin embargo, es sólo aparente. Académicamente, es conocido que los cambios asociados a lípidos en el paciente renal pueden deberse a dos factores: el estricto control metabólico al estar inscritos en programas de diálisis donde son monitorizados continuamente o a las alteraciones asociadas a las lipoproteínas en estos pacientes. De acuerdo con Lorenzo *et al.*<sup>60</sup>, los pacientes con fallo renal crónico en tratamiento con hemodiálisis pueden presentar anomalías lipoproteicas incluso con

niveles séricos de colesterol total y triglicéridos dentro de los parámetros normales. Asimismo, un estudio realizado por Liu *et al.*<sup>61</sup>, permitió determinar que los pacientes en hemodiálisis pueden reportar valores normales de colesterol total cuando se encuentran en un estado de inflamación y/o malnutrición, pues dicho estado disminuye los niveles de colesterol, enmascarando la hipercolesterolemia, y aumenta el riesgo de muerte. Para los pacientes diabéticos en hemodiálisis de esta investigación (grupo C), no fue posible determinar más datos con el fin de establecer su estado clínico y nutricional con más precisión, pero los pacientes con niveles elevados de AGEs pueden considerarse en mayor riesgo de estados inflamatorios, siendo posible explicar con lo anterior la correlación inversa que se obtuvo para la longitud de onda y niveles de colesterol en dicho grupo.

En otro estudio ya mencionado, los niveles séricos de los AGEs fluorescentes se correlacionaron positivamente con el tiempo de duración de diabetes y niveles de HbA<sub>1c</sub>, triglicéridos, colesterol total, HDL y LDL, con los que se analizó la relación de AGEs y el control metabólico de la diabetes.<sup>51</sup> Con el análisis de fotoluminiscencia del suero y los datos clínicos de los pacientes, se obtuvo una importante correlación inversa entre la longitud de onda y el estadio o riesgo de enfermedad renal para los tres grupos de pacientes, así como la longitud de onda y los niveles de HbA<sub>1c</sub>, creatinina sérica, tensión arterial sistólica y diastólica e índice de masa corporal, acorde a la condición de salud de los pacientes de los grupos A y B.

La correlación entre longitud de onda y colesterol HDL, que presenta una proporción inversa, es explicable a partir de los datos que se obtuvieron sólo de los grupos A y B, pues mostraban una diferencia estadística significativa, con HDL más elevados para los pacientes diabéticos. De esta forma, se convirtieron en datos no comparables (por un acoplamiento matemático).

Para los pacientes diabéticos fue posible obtener mayor cantidad de datos con el fin de asociar su condición a un buen o mal control metabólico, considerando algunos de estos criterios<sup>23,24</sup>. De esta forma, se obtuvo que el 29.4% posee entre 1 y 3 criterios de incumplimiento, 52.9% entre 4 y 5 criterios y el 17.7% restante fallan en 6 criterios de los 8 considerados. Es innegable, ciertamente, la importancia de evaluar a los pacientes en base a los criterios de control metabólico. Esta investigación, sin embargo, amplía la

posibilidad de llevar a cabo el desarrollo de un método que, a diferencia de las pruebas de laboratorio convencionales y dependiendo de su aplicación (en piel o en suero) es menos dependiente de personal especializado y consumibles, puede ser mínimamente invasiva o no serlo en absoluto, está siendo ampliamente estudiado y ha dado ya importantes aportaciones al estudio de diversas enfermedades<sup>20,29,62,63</sup>. Se precisa, sin embargo, de un estudio más profundo en relación a su aplicación.

### 4.3. CONCLUSIONES

- La determinación de AGEs por espectroscopia de fluorescencia en suero es sensible y guarda relación con la intensidad de fotoluminiscencia. Se pudieron observar diferencias estadísticas entre los pacientes que la literatura caracteriza como mayores poseedores de AGEs (diabéticos en fase de diálisis y los pacientes no diabéticos, a quienes se les atribuyen menores valores). No obstante, la emisión mostrada por los pacientes diabéticos, de quienes se esperaba que fuera mayor que la de los no diabéticos, es explicable teóricamente por el fenómeno de *quenching*.
- Las diferencias observadas en la intensidad de emisión (eje vertical) en los máximos relativos ( $\approx 440$  nm) y absolutos (490-520 nm), no son concluyentes por el fenómeno de *quenching*. Sin embargo, las longitudes de onda en que se presentan los máximos de emisión, muestran un desplazamiento horizontal, llamado *shift*, que físicamente es explicado por cambios conformacionales y de carga circundante a los fluoróforos en rangos de longitud que según la literatura responden a AGEs. De esta forma, siendo tan heterogéneos, permiten identificar longitudes de onda cortas para los pacientes renales, longitudes intermedias para los pacientes diabéticos y mayores longitudes para los pacientes no diabéticos.
- Correlacionando los exámenes y el control metabólico con los niveles de AGEs, la intensidad de emisión de AGEs, analizada mediante el área bajo la curva, tuvo una correlación directa significativa con la creatinina sérica y estadio o riesgo de enfermedad renal crónica. Por otro lado, el *shifting* de longitud de onda presentó una correlación inversa de significancia con tensión arterial sistólica y diastólica, índice de masa corporal, HbA<sub>1c</sub> y creatinina sérica, que concuerdan con la condición clínica de cada grupo de pacientes.
- Pese a la heterogeneidad de las edades, los sujetos en cada grupo muestran un comportamiento acorde al estadio de la enfermedad: no diabéticos → diabéticos → diabéticos en diálisis. Los principales hallazgos permiten identificar la presencia de hipertensión (35.3%), dislipidemia (11.8%) e índices de masa corporal por encima del

límite superior (47.1%) en los pacientes no diabéticos, mientras que en el grupo de diabéticos es común observar las comorbilidades antes mencionadas y otros factores de riesgo cardiovascular. Los pacientes renales reflejan un “mejor” control metabólico en sus análisis químicos. Es importante recalcar que la entrevista clínica y el examen físico de este grupo no fueron posibles pues nunca hubo autorización por el comité de ética para realizarlos. El control metabólico de estos pacientes es estricto e interpretar sus valores a la ligera podría hacer pensar que tienen un buen control. Sin embargo, es conocido que las alteraciones lipídicas en ellos son enmascaradas por los fenómenos de malnutrición e inflamación crónica sistémica con alto catabolismo lipídico, características comprobadas indirectamente por la marcada emisión de AGEs evidenciada en estos pacientes.

- El concepto de control metabólico se refiere a un control personalizado, en el que se busca suprimir todos los factores de riesgo posibles<sup>25,64</sup>. Esta investigación refleja que entre los pacientes no diabéticos algunos presentan un síndrome metabólico, el cual de no ser oportunamente tratado, podría evolucionar a patologías diversas, incluyendo diabetes mellitus tipo 2. El estudio, en efecto, muestra que el paciente diabético comúnmente presenta comorbilidades, siendo posible recalcar que el 70.6% presentan incumplimiento de al menos 4 criterios de los 8 considerados. Estos y otros hallazgos, demuestran el pobre control metabólico y predicen el avance definitivo hacia complicaciones crónicas micro y macrovasculares.
- Los resultados preliminares derivados de esta investigación, permiten analizar puntos a favor de esta metodología. En primer lugar, pudiera tratarse de un dispositivo portátil, no dependiente de operador y con resultados inmediatos. Además, los resultados obtenidos con la aplicación de este método presentaron validez estadística en la diferenciación de la condición de salud para los tres grupos y su utilización no se limita a mediciones en suero. Estas características lo convierten en ideal para la detección temprana de complicaciones crónicas en atención primaria.

#### 4.4. RECOMENDACIONES

En orden de importancia se recomienda:

- La implementación y juramentación de un comité local de ética en investigación dentro de la Universidad, inscrito y autorizado por el Comité Nacional.
- Fomentar la realización de investigaciones que involucren equipos interdisciplinarios para enriquecimiento de la investigación.
- Desarrollar un estudio con el que se busque esclarecer la interrogante con respecto al fenómeno de *quenching* por los hipoglicemiantes, con grupos de pacientes diabéticos en diferentes esquemas de tratamiento.
- Combinar la técnica de fotoluminiscencia en suero y la espectroscopia de fluorescencia en piel, que con base a los avances que ha tenido en la Universidad de Gröningen, se ha aplicado preliminarmente en nuestro país.
- Intensificar la aplicación y continuidad de medidas de educación de la población, consejería médica, control dietético y control metabólico estricto con el fin de evitar el desarrollo o avance de las complicaciones crónicas de la diabetes.
- Iniciar investigación de campo con el fin de incrementar la población de estudio, aumentar las variables analizadas, brindando el seguimiento a los pacientes en un período de tiempo suficiente y menos limitado, que permita obtener datos clínicos y de laboratorio más amplios que reflejen su condición de salud con mayor precisión y así profundizar en aspectos que aún quedan por dilucidar.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Camejo, M., García, A., Rodríguez, E., Carrizales, M. E. & Chique, J. Visión epidemiológica de la diabetes mellitus: Situación en Venezuela. Registro epidemiológico y propuesta de registro. Programas de detección precoz. *Rev. Venez. Endocrinol. Metab.* **10**, 2–6 (2012).
2. Mima, A. Inflammation and Oxidative Stress in Diabetic Nephropathy: New Insights on Its Inhibition as New Therapeutic Targets. *J. Diabetes Res.* **2013**, 1–8 (2013).
3. Rosas Guzmán, J., García Rubí, E., Gómez Pérez, F. J. & Calles, D. Prevención, diagnóstico y tratamiento temprano de la Nefropatía Diabética. Recomendaciones de la Asociación Latinoamericana de Diabetes (ALAD) Avalado por la Sociedad Latinoamericana de Nefrología e Hipertensión (SLANH). *Rev. Asoc. Latinoam. Diabetes* **17**, 106–114 (2009).
4. Canjura, R. Determinación de compuestos de glicación avanzada (AGEs) en tejido humano por método no invasivo de espectroscopia óptica. (Universidad de El Salvador, 2014).
5. Cáceres Agreda, N., Benítez, A. & de Maza, M. Características de Prediabetes y Diabetes Mellitus en El Salvador, Centro América. *Rev. Asoc. Latinoam. Diabetes* **18**, 56–64 (2010).
6. Cowie, C. C. *et al.* Prevalence of Diabetes and Impaired Fasting Glucose in Adults in the U.S. Population National Health and Nutrition Examination Survey 1999–2002. *Diabetes Care* **29**, 1263–1268 (2006).
7. Cowie, C. C. *et al.* Prevalence of Diabetes and High Risk for Diabetes Using A1C Criteria in the U.S. Population in 1988-2006. *Diabetes Care* **33**, 562–568 (2010).
8. Gruber de Bustos, E., Hernández Ruano, M., Hernández, T., Hernández Yero, A. & Jadzinski, M. Guías ALAD de diagnóstico y control de la Diabetes Mellitus Tipo 2. Capítulo 1: Epidemiología de la diabetes mellitus tipo 2 en Latinoamérica. *Rev. Asoc. Latinoam. Diabetes* **14**, 101–103 (2006).
9. Stumvoll, M., Goldstein, B. J. & van Haeften, T. W. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *The Lancet* **365**, 1333–1346 (2005).

10. Organización Panamericana de la Salud. *La salud en las Américas*. **1**, (Publicación Científica y Técnica, 2002).
11. Aguilar-Salinas, C. A. *et al.* Characteristics of Patients With Type 2 Diabetes in México Results from a large population-based nationwide survey. *Diabetes Care* **26**, 2021–2026 (2003).
12. Hossain, P., Kawar, B. & El Nahas, M. Obesity and Diabetes in the Developing World — A Growing Challenge. *N. Engl. J. Med.* **356**, 213–215 (2007).
13. Orantes Navarro, C. M. Enfermedad renal crónica: Estrategias para su abordaje integral. *Instituto Nacional de Salud - Ministerio de Salud - El Salvador - Investigación en Salud Renal* at <<http://ins.salud.gob.sv/index.php/temas/investigacion/investigacionensaludrenal>>
14. Orantes Navarro, C. M. *et al.* Chronic Kidney Disease and Associated Risk Factors in the Bajo Lempa Region of El Salvador: Nefrolempa Study, 2009. *MEDDIC Rev.* **13**, 14–22 (10/11).
15. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas*. (International Diabetes Federation, 2013). at <<http://www.idf.org/diabetesatlas/5e/es/la-carga-mundial?language=es>>
16. Fukami, K., Yamagishi, S.-I., Ueda, S. & Okuda, S. Role of AGEs in diabetic nephropathy. *Curr. Pharm. Des.* **14**, 946–952 (2008).
17. Coughlan, M. T., Mibus, A. L. & Forbes, J. M. Oxidative stress and advanced glycation in diabetic nephropathy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1126**, 190–193 (2008).
18. Sourris, K. C. & Forbes, J. M. Interactions between advanced glycation end-products (AGE) and their receptors in the development and progression of diabetic nephropathy - are these receptors valid therapeutic targets. *Curr. Drug Targets* **10**, 42–50 (2009).
19. Tan, A. L. Y., Forbes, J. M. & Cooper, M. E. AGE, RAGE, and ROS in diabetic nephropathy. *Semin. Nephrol.* **27**, 130–143 (2007).
20. Gangoiti, M. V. Efecto de AGEs (productos de glicación avanzada) y drogas anti-resortivas sobre células de hueso en cultivo. (Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Exactas, 2011).

at

<[http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2688/Documento\\_completo.pdf?sequence=1](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2688/Documento_completo.pdf?sequence=1)>

21. Martínez Castelao, A. Documento de consenso 2002 sobre pautas de detección, prevención y tratamiento de la nefropatía diabética en España. *Rev. SEMERGEN* **28**, 631–638 (2002).
22. Mahía Vilas, M. & Pérez Pérez, L. La diabetes mellitus y sus complicaciones vasculares: Un problema social de salud. *Rev. Cuba. Angiol. Cir. Vasc.* **1**, 68–73 (2000).
23. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes--2014. *Diabetes Care* **37**, S14–S80 (2014).
24. Domínguez Sánchez-Migallón, P. Control Metabólico en Pacientes Diabéticos Tipo 2: grado de Control y nivel de Conocimientos (Estudio AZUER). *Rev. Clínica Med. Fam.* **4**, 32–41 (2011).
25. Murray, P., Chune, G. W. & Raghavan, V. A. Legacy effects from DCCT and UKPDS: what they mean and implications for future diabetes trials. *Curr. Atheroscler. Rep.* **12**, 432–439 (2010).
26. Barbosa, J. H. P., Oliveira, S. L. & Seara, L. T. e. O papel dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes. *Arq. Bras. Endocrinol. Amp Metabol.* **52**, 940–950 (2008).
27. Singh, R., Barden, A., Mori, T. & Beilin, L. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* **44**, 129–146 (2001).
28. Ulrich, P. & Cerami, A. Protein glycation, diabetes, and aging. *Recent Prog. Horm. Res.* **56**, 1–21 (2001).
29. Jakus, V. & Rietbrock, N. Advanced glycation end-products and the progress of diabetic vascular complications. *Physiol. Res. Acad. Sci. Bohemoslov.* **53**, 131–142 (2004).
30. Forbes, J. M., Soldatos, G. & Thomas, M. C. Below the Radar: Advanced Glycation End Products that Detour 'around the side'. *Clin. Biochem. Rev. Aust. Assoc. Clin. Biochem.* **26**, 123–134 (2005).

31. Lapolla, A., Fedele, D. & Traldi, P. Glyco-oxidation in diabetes and related diseases. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* **357**, 236–250 (2005).
32. Rahbar, S. The discovery of glycated hemoglobin: a major event in the study of nonenzymatic chemistry in biological systems. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1043**, 9–19 (2005).
33. Brownlee, M. The Pathobiology of Diabetic Complications A Unifying Mechanism. *Diabetes* **54**, 1615–1625 (2005).
34. Schlondorff, D. The glomerular mesangial cell: an expanding role for a specialized pericyte. *FASEB J.* **1**, 272–281 (1987).
35. Mason, R. M. & Wahab, N. A. Extracellular Matrix Metabolism in Diabetic Nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* **14**, 1358–1373 (2003).
36. Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología. Complicaciones microvasculares en la diabetes mellitus tipo 2. *Rev. Endocrinol. Nutr.* **12**, 31–44 (2004).
37. Olmos, P. *et al.* Fisiopatología de la retinopatía y nefropatía diabéticas. *Rev. Médica Chile* **137**, 1375–1384 (2009).
38. Cortes, P. *et al.* F-actin fiber distribution in glomerular cells: Structural and functional implications. *Kidney Int.* **58**, 2452–2461 (2000).
39. Fliser, D., Wagner, K.-K., Loos, A., Tsikas, D. & Haller, H. Chronic Angiotensin II Receptor Blockade Reduces (Intra)Renal Vascular Resistance in Patients with Type 2 Diabetes. *J. Am. Soc. Nephrol.* **16**, 1135–1140 (2005).
40. Mogensen, C. E. Microalbuminuria and hypertension with focus on type 1 and type 2 diabetes. *J. Intern. Med.* **254**, 45–66 (2003).
41. Baynes, J. W. & Thorpe, S. R. Glycooxidation and lipoxidation in atherogenesis. *Free Radic. Biol. Med.* **28**, 1708–1716 (2000).

42. Meerwaldt, R. *et al.* Skin Autofluorescence, a Measure of Cumulative Metabolic Stress and Advanced Glycation End Products, Predicts Mortality in Hemodialysis Patients. *J. Am. Soc. Nephrol.* **16**, 3687–3693 (2005).
43. Meerwaldt, R. *et al.* Skin Autofluorescence Is a Strong Predictor of Cardiac Mortality in Diabetes. *Diabetes Care* **30**, 107–112 (2007).
44. Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. (Springer Science+Business Media, 2006). at <<http://www.springer.com/chemistry/analytical+chemistry/book/978-0-387-31278-1>>
45. Meerwaldt, R. *et al.* Simple noninvasive measurement of skin autofluorescence. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1043**, 290–298 (2005).
46. World Health Organization. *WHO guidelines on drawing blood: best practices in phlebotomy*. (2010). at <[http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241599221\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241599221_eng.pdf)>
47. Münch, G. *et al.* Determination of advanced glycation end products in serum by fluorescence spectroscopy and competitive ELISA. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. J. Forum Eur. Clin. Chem. Soc.* **35**, 669–677 (1997).
48. Nomoto, K., Yagi, M., Hamada, U., Naito, J. & Yonei, Y. Identification of Advanced Glycation Endproducts derived fluorescence spectrum in vitro and human skin. *Anti-Aging Med.* **10**, 92–100 (2013).
49. Pia de la Maza, M. Fluorescent advanced glycation end-products (ages) detected by spectro-photofluorimetry, as a screening tool to detect diabetic microvascular complications. *J. Diabetes Mellit.* **02**, 221–226 (2012).
50. Dorrian, C. A., Cathcart, S., Clausen, J., Shapiro, D. & Dominiczak, M. H. Factors in human serum interfere with the measurement of advanced glycation endproducts. *Cell. Mol. Biol. Noisy--Gd. Fr.* **44**, 1069–1079 (1998).

51. Galler, A. *et al.* Impact of metabolic control and serum lipids on the concentration of advanced glycation end products in the serum of children and adolescents with type 1 diabetes, as determined by fluorescence spectroscopy and nepsilon-(carboxymethyl)lysine ELISA. *Diabetes Care* **26**, 2609–2615 (2003).
52. Wolfbeis, O. S. & Leiner, M. Mapping of the total fluorescence of human blood serum as a new method for its characterization. *Anal. Chim. Acta* **167**, 203–215 (1985).
53. Traverso, N. *et al.* Malondialdehyde, a lipoperoxidation-derived aldehyde, can bring about secondary oxidative damage to proteins. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* **59**, B890–895 (2004).
54. Increased accumulation of skin advanced glycation end-products precedes and correlates with clinical manifestation of diabetic neuropathy - Springer. doi:10.1007/s00125-005-1828-x
55. Hull, E. *et al.* Noninvasive, optical detection of diabetes: model studies with porcine skin. *Opt. Express* **12**, 4496–4510 (2004).
56. Mulder, D. J. *et al.* Skin autofluorescence, a novel marker for glycemic and oxidative stress-derived advanced glycation endproducts: an overview of current clinical studies, evidence, and limitations. *Diabetes Technol. Ther.* **8**, 523–535 (2006).
57. Gerrits, E. G. *et al.* Skin Autofluorescence A tool to identify type 2 diabetic patients at risk for developing microvascular complications. *Diabetes Care* **31**, 517–521 (2008).
58. Williams, R. T. & Bridges, J. W. Fluorescence of solutions: A review. *J. Clin. Pathol.* **17**, 371–394 (1964).
59. Koyama, H., Sugioka, N., Uno, A., Mori, S. & Nakajima, K. Effects of glycosylation of hypoglycaemic drug binding to serum albumin. *Biopharm. Drug Dispos.* **18**, 791–801 (1997).
60. Lorenzo, M., Betancor, P., Vega, N. & Guindeo, M. C. Alteraciones lipoproteicas en pacientes con insuficiencia renal crónica sometidos a hemodiálisis. *Rev. Nefrol.* **17**, 36–42 (1997).

61. Liu, Y. *et al.* Association between cholesterol level and mortality in dialysis patients: role of inflammation and malnutrition. *JAMA* **291**, 451–459 (2004).
62. Masilamani, V. *et al.* Fluorescence spectra of blood and urine for cervical cancer detection. *J. Biomed. Opt.* **17**, 0980011–0980016 (2012).
63. Tan, K. C. B. *et al.* Advanced Glycation End Products and Endothelial Dysfunction in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* **25**, 1055–1059 (2002).
64. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) Final Report. *Circulation* **106**, 3143–3143 (2002).

## GLOSARIO DE ABREVIATURAS

### A

**ADA:** Asociación Americana de Diabetes.

**AGEs:** Productos finales de glicación avanzada (por sus siglas en inglés, *Advanced glycation end-products*).

**ASADI:** Asociación Salvadoreña de Diabéticos.

### D

**DM:** Diabetes mellitus.

### E

**ERC:** Enfermedad renal crónica. Presencia de daño estructural y/o funcional al riñón o una tasa de filtración glomerular (TFG) de  $<60$  mL/min/1.73 m<sup>2</sup>, durante tres meses o más, independientemente de la causa.

**EUA:** Excreción urinaria de albúmina.

### H

**HbA1c:** Hemoglobina glicosilada.

### I

**IGF:** Factor de crecimiento insulinoide (por sus siglas en inglés, *Insulin-like growth factor*).

**IMC:** Índice de masa corporal.

**IRC:** Insuficiencia renal crónica.

### N

**NHANES:** National Health and Nutrition Examination Survey.

## **P**

**PDGF:** Factor de crecimiento derivado de plaquetas (por sus siglas en inglés, *Platelet-derived growth factor*).

## **S**

**SD:** Desviación standard (por sus siglas en inglés, *Standard deviation*).

## **T**

**TAD:** Tensión arterial diastólica.

**TAS:** Tensión arterial sistólica.

**TFG:** Tasa de filtrado glomerular.

**TSFR:** Tratamiento sustitutivo de la función renal.

**TGF1:** Factor de crecimiento transformador 1 (por sus siglas en inglés, *Transforming growth factor type 1*).

## **U**

**UA:** Unidades arbitrarias (para el estudio, expresan la intensidad de fluorescencia emitida por la muestra analizada en el espectrofotómetro).

# **ANEXOS**

## CONSENTIMIENTO INFORMADO

Mediante el presente estudio se desea explicar la importancia del control adecuado de la diabetes mellitus. Hay muchas complicaciones graves que puede causar esta enfermedad con el paso de los años y esto se acelera cuando no tenemos un buen control de la glucosa, si hay obesidad, si hay colesterol y triglicéridos altos, si no realizamos ejercicio y si no se toma la medicina según lo indica su médico.

En este estudio deseamos pedirle su colaboración para que una persona experta extraiga aproximadamente 3 mililitros de sangre para realizar una serie de exámenes de química sanguínea importantes. Con estos vamos a medir una serie de datos que indican que mantener un estado de glucosa elevado en sangre ocasiona la acumulación de otras sustancias que dañan muchos órganos. En este caso queremos estudiar si hay un daño de los riñones mediante un método llamado espectroscopia óptica.

Los datos que sean obtenidos serán confidenciales. Por lo tanto, pedimos su autorización completando la hoja de consentimiento informado y le pedimos que en cualquier momento que usted no se encuentre de acuerdo con esta investigación nos lo haga saber inmediatamente.

Muchas Gracias.

### A. DATOS DE IDENTIFICACIÓN

Nombre del paciente \_\_\_\_\_

Número de expediente o documento de identificación \_\_\_\_\_

Nombre técnico del procedimiento que se va a realizar \_\_\_\_\_

### B. DECLARACIÓN DEL PACIENTE

1. Me han explicado y he comprendido satisfactoriamente la naturaleza y propósito de este procedimiento. También me han aclarado todas las dudas y me han dicho posibles riesgos y complicaciones. Comprendo perfectamente que el procedimiento va a consistir en:

\_\_\_\_\_

2. Doy mi consentimiento para que me efectúen el procedimiento descrito arriba y los procedimientos complementarios que sean necesarios o convenientes durante la realización de éste a juicio de los profesionales que lo lleven a cabo.
3. En cualquier caso, deseo que me respeten las siguientes condiciones:

\_\_\_\_\_

Si no hay condiciones, escríbase ninguna.

\_\_\_\_\_  
Firma de Paciente

\_\_\_\_\_  
Firma de Testigo

### C. DECLARACIONES Y FIRMAS

1. Médico(s) responsable(s): \_\_\_\_\_ . He informado al paciente del propósito y naturaleza del procedimiento descrito arriba, de los posibles riesgos y resultados.

Firma del profesional: \_\_\_\_\_ DUI: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_

2. Tutor legal o familiar: \_\_\_\_\_

El médico me ha explicado de forma satisfactoria qué es, cómo se hace y para qué sirve ese procedimiento. También se me han explicado sus riesgos y complicaciones. He comprendido todo lo anterior perfectamente y por ello YO

\_\_\_\_\_, con documento de identidad \_\_\_\_\_, doy mi consentimiento para que el (los) doctor(es)

\_\_\_\_\_ y el personal auxiliar que él (ellos) precise(n) para realizarle este procedimiento.

Firma de familiar o testigo \_\_\_\_\_ Parentesco \_\_\_\_\_

3. Lugar y fecha \_\_\_\_\_

## HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Nombre: \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_ años

Sexo \_\_\_\_\_

Antecedentes médicos: (Responder "sí", "no" o "?")

HTA \_\_\_ Cardiopatía \_\_\_ Alergias \_\_\_ Nefropatía \_\_\_ Obesidad \_\_\_ Dislipidemia \_\_\_

Otro \_\_\_\_\_

Especificar: \_\_\_\_\_

Antecedentes quirúrgicos:

Especificar: \_\_\_\_\_

Tiempo de diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2: \_\_\_\_\_ meses

Medicamentos utilizados y dosis: \_\_\_\_\_

IMC: \_\_\_\_\_ Circunferencia abdominal: \_\_\_\_\_ Presión arterial: \_\_\_\_\_

Variable	Resultados de laboratorio
Glucosa	
Hemoglobina glicosilada	
Triglicéridos	
Creatinina	
Colesterol total	
Colesterol LDL	

## PRESUPUESTO

Concepto	Cantidad	Precio unitario	Total
Exámenes de laboratorio	60	Precio por cotización	\$600
Insumos de laboratorio (jeringas, catéteres, vacutainer, tubos EDTA)	X	X	\$100
Horas investigador trabajo en campo x3	300	5	\$1500
Horas de trabajo, planeación y recolección bibliográfica	90	5	\$450
Papel bond tamaño carta	2 resmas	\$5	\$10
Tinta para impresión canon MG2410 color negra y color	1	\$23.00	\$23.00
Anillado de trabajo	6	\$3.25	\$19.50
CD	2	\$0.50	\$1.00
Total	-	-	\$2703.50

# CRONOGRAMA

ACTIVIDAD	ENERO/14	FEBR/14	MAR/14	ABRIL/14	MAYO/14	JUNIO/14	JULIO/14	AGOSTO/14	SEPT/14	OCTU/14	NOV/14	DIC/14	ENE/15	FEBR/15	MAR/15	ABRIL/15	MAYO/15	
1. Inscripción al Servicio de Graduación y presentación de Monografía de Tesis a los de Flores	X																	
2. Inicio del Semestre de Graduación																		
3. Presentar estado de salud y propuesta de asesor al Comité de Graduación		X																
4. Pago de al menos el 50% de arrendo de Anuncios y Jurado de Tesis		X	X															
5. Redactar y pagar Certificación de Notas y Conservación de Biblioteca y Conservancia general		X	X															
6. Elaboración de Informe		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
7. Queación del Trabajo de Investigación		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
8. Entrega de Documento Final		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
9. Creación Carta de Intención		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
10. Pago de cumplimiento de Anuncio y Jurado		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
11. Decisión de Jurado									X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
12. Recibido de Tesis por Jurado									X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
13. Entrega de Tesis									X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
14. Recibido Tesis de expedientes									X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
15. Recibido de Expedientes por Fiscalía (CIMO)									X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
16. Ingreso de Expedientes									X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
17. Inicio de Tesis a MINED									X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
18. Recibido MINED									X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
19. Fecha probable de Graduación									X	X	X	X	X	X	X	X	X	X