

**Estudio de Diferentes Marcadores de
Glicación en las Complicaciones
Crónicas de la Diabetes Mellitus**

Javier Rodríguez García

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Facultad de Medicina

Universidad de Santiago de Compostela

Tesis Doctoral

Santiago de Compostela, 2009

D. Santiago Rodríguez-Segade Villamarín,
Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología
Molecular de la Universidad de Santiago de Compostela,
CERTIFICA:

Que el trabajo descrito en esta memoria, que lleva por título
*“Estudio de diferentes marcadores de glicación en las
complicaciones crónicas de la diabetes mellitus”*, presentado por el
Licenciado en Ciencias Químicas **D. Javier Rodríguez García**, ha
sido realizado bajo mi dirección y cumple las condiciones exigidas
para optar al grado de Doctor, por lo que autorizo su presentación
ante el tribunal.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la
siguiente certificación en Santiago de Compostela a 26 de Mayo de
2009.

Fdo. S. Rodríguez-Segade

Fdo. Javier Rodríguez

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no hubiera sido posible sin la ayuda y el estímulo de numerosas personas a las que deseo expresar mi agradecimiento.

En primer lugar al Prof. S. Rodríguez-Segade debo agradecerle la posibilidad de realizar esta tesis, así como sus muchas enseñanzas, consejos y apoyo constante, tanto a nivel profesional como personal.

Al Dr. J.M. Paz, Jefe de Servicio de Laboratorio Central del Hospital Clínico Universitario durante la fase experimental de este trabajo, por las facilidades para el desarrollo de mi labor.

A Jesús R. Requena, con quien di mis primeros pasos en el campo de la glicación de proteínas, además de su importante participación en el nacimiento de esta tesis, que en parte es una continuación de su trabajo.

A Felix Camiña y Rubén Varela, dos investigadores entusiastas de su trabajo, que siempre sacan tiempo para ayudar desinteresadamente a los que estamos a su alrededor.

A mis compañeros del Laboratorio Central del CHUS, especialmente a Luis F. Pérez, mi compañero de fatigas durante todos estos años, por su apoyo.

A todos ellos, y otros a los que no he nombrado ya que la lista sería muy larga, gracias por todo.

A mis padres y hermana Esther, por el cariño y el esfuerzo realizado durante tantos años.

A Judith y a nuestros hijos Marcos y Carolina por su paciencia, comprensión y por haberles robado parte de un tiempo que sin duda les pertenecía.

ABREVIATURAS

ADA	Asociación Americana de Diabetes
AEDT	Ácido etilendiamino-tetracético
AER	Tasa de excreción de albúmina
AGEs	Productos de glicación avanzada
ALEs	Productos de lipoxidación avanzada
AR	Artritis reumatoide
B₂M	Beta-2-microglobulina
BSA	Albúmina sérica bovina
CML	N ^ε Carboximetil-lisina
DCCT	Diabetes Control and Complications Trial
DG	Desoxiglucosona
DPCA	Diálisis peritoneal continua ambulatoria
DRA	Amiloidosis derivada de la diálisis
FA	Fructosamina
FL	Fructosa-lisina
gg	Gap de glicación en cada visita
GG	Gap de glicación individual (media de los gg)
GO	Glioxal
GOLD	Dímero de lisina y glioxal
HD	Hemodiálisis
HFBA	Acido heptafluorobutírico
HGI	Índice de glicación de la hemoglobina
HMW	Fracción de alto peso molecular (>10 kDa)
IGT	Tolerancia alterada a la glucosa
IOI	Índice de individualidad
IRC	Insuficiencia renal crónica

LES	Lupus eritematoso sistémico
LMW	Fracción de bajo peso molecular (< 10 kDa)
MBG	Glucemia media
MOLD	Dímero de lisina y metilglioxal
MDA	Malondialdehido
NBT	Nitroazul de tetrazolio
PDR	Retinopatía diabética proliferativa
PVR	Vitreoretinopatía
RAGE	Receptor de productos de glicación avanzada
RD	Desprendimiento de retina
TCA	Ácido tricloroacético

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 La glicación no enzimática.....	1
1.1.1 Antecedentes históricos.....	1
1.1.2 Reacción de Maillard: etapas.....	6
1.1.3 Glicación reversible.....	8
1.1.4 Glicación irreversible.....	13
1.1.5 Estructura de los productos finales de glicación avanzada (AGEs).....	17
1.1.6 Consecuencias biológicas de la formación de los AGEs.....	22
1.1.7 Los AGEs en diferentes patologías.....	25
1.1.8 La pentosidina como marcador de AGEs.....	30
1.1.9 Agentes que inhiben o reducen la formación de AGEs.....	31
1.2 Altos y bajos glicadores.....	33
1.2.1 Variabilidad biológica de la HbA _{1c}	33
1.2.2 Índice de glicación de la hemoglobina y gap de glicación.....	35
1.2.3 Riesgo de complicaciones microvasculares.....	37
2. OBJETIVOS.....	41
2.1 Objetivo general.....	41
2.2 Objetivos específicos.....	41
3. MATERIAL Y METODOS.....	43
3.1 Muestras biológicas.....	43
3.2 Poblaciones estudiadas.....	45
3.2.1 Pentosidina.....	45
3.2.1.1 Sujetos control.....	45
3.2.1.2 Diabetes Mellitus.....	45

3.2.1.3 Artritis Reumatoide (AR) y Lupus Eritematoso Sistémico (LES).....	48
3.2.1.4 Insuficiencia renal	49
3.2.2 Altos y bajos glicadores.....	51
3.2.2.1 Diseño y grupo de estudio	51
3.3 Instrumentación analítica.....	53
3.4 Reactivos, materiales cromatográficos y tampones.....	54
3.5. Métodos analíticos.....	56
3.5.1 Síntesis del estándar de pentosidina	56
3.5.2 Valoración del estándar de pentosidina.	59
3.5.3 Glicación de albúmina.....	59
3.5.4 Determinación de fructosamina.....	59
3.5.5 Determinación del gap de glicación (GG).....	60
3.5.6 Determinación de hemoglobina glicosilada (HbA _{1C}).....	61
3.5.7 Determinación de proteínas totales en orina y líquidos de diálisis.....	61
3.5.8 Determinación de la velocidad de excreción de albúmina (AER)	62
3.5.9 Determinación de otros parámetros bioquímicos	62
3.5.10 Ultrafiltración de muestras	63
3.5.11 Filtración en gel de exclusión molecular.....	64
3.5.12 Valoración de fluorescencia y absorbancia en fracciones cromatográficas	65
3.5.13 Condiciones experimentales para la cromatografía de HPLC.....	65
3.5.14 Determinación de pentosidina unida a proteínas séricas	66
3.5.15 Determinación de Pentosidina libre en suero	67
3.5.16 Determinación de Pentosidina total y libre en orina.....	67
3.5.17 Determinación de Pentosidina en otros fluidos biológicos ...	68
3.6 Métodos estadísticos.....	69
3.6.1 Métodos generales	69

3.6.2 Método de regresión longitudinal.....	70
3.6.3 Método de regresión de Cox de riesgos proporcionales.....	70
4. RESULTADOS Y DISCUSION.....	73
4.1 Estudio de la pentosidina.....	73
4.1.1 Estandarización del método de determinación.....	73
4.1.2 Distribución sérica.....	77
4.1.2.1 Pentosidina libre.....	77
4.1.2.2-Pentosidina en la fracción <10 kDa.....	80
4.1.2.3 Distribución de la pentosidina en la fracción > 10 kDa.....	82
4.1.3 Valores normales de pentosidina en suero y orina.....	90
4.1.4 Trastornos del cuerpo vítreo.....	97
4.1.5 Otros fluidos biológicos: estrés oxidativo.....	101
4.1.6 Diabetes mellitus.....	105
4.1.6.1 Niveles de pentosidina plasmática.....	106
4.1.6.2 Complicaciones de la diabetes.....	110
4.1.7 Artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico.....	120
4.1.8 Insuficiencia renal.....	128
4.1.8.1 Insuficiencia renal crónica a tratamiento conservador.....	129
4.1.8.2 Diálisis peritoneal ambulatoria.....	132
4.1.8.3 Hemodiálisis.....	139
4.1.8.4 Discusión.....	143
4.2 Estudio del gap de glicación.....	153
4.2.1 Estabilidad.....	153
4.2.2 Variabilidad de la HbA _{1c}	155
4.2.3 Progresión de nefropatía.....	157
4.2.4 Discusión.....	162
5. CONCLUSIONES.....	169
6. BIBLIOGRAFÍA.....	173

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La glicación no enzimática

1.1.1 Antecedentes históricos

La reacción de Maillard debe su nombre a Louis Camille Maillard (1) que en 1912 describió la formación de productos de color marrón, que se originan al incubar con aminoácidos, azúcares como la glucosa. La reacción es más intensa con pentosas que con hexosas y conduce a la formación de compuestos fuertemente coloreados e insolubles, algo similar a lo que se observa en el proceso de la caramelización. Maillard emitió la hipótesis de que esta reacción podría tener interés en el caso de la diabetes, en particular, en la destrucción y eliminación urinaria de los aminoácidos. Formulada diez años antes del descubrimiento de la insulina, esta proposición no suscitó el interés de los diabetólogos, pero sí interesó a los químicos de los alimentos, que encontraron de esta forma la llave de los aromas por vía sintética. Aunque en la bioquímica de los alimentos esta reacción ha tenido una importancia trascendental, en los organismos vivientes solo recientemente se ha reconocido su importancia.

Actualmente la “reacción de Maillard” denominada así en química alimentaria, es la base de numerosos productos fermentados o caramelizados, utilizados en la fabricación de cerveza, vino, salsas de soja, coca-cola y muchos otros. Por otra parte, esta reacción también tiene interés en toxicología alimentaria, ya que podría participar en la formación de productos cancerígenos, disminuir la calidad nutritiva de algunos productos como la

leche, destruir los aminoácidos y proteínas de soluciones parenterales, etc. Una parte importante del conocimiento actual acerca de la reacción de Maillard, se basa en investigaciones llevadas a cabo en la química alimentaria en el período de 1912 a 1975. Debido precisamente a la química de los alimentos, se sabe que el oxígeno y las reacciones de oxidación tienen un efecto catalítico en la reacción de Maillard. Por esta razón, los alimentos en conserva llevan como aditivos antioxidantes y van sellados al vacío para evitar su deterioro durante el almacenamiento. Del mismo modo, la catálisis por iones metálicos de las reacciones de oxidación también es inhibida por la adición de quelantes tales como el ácido etilendiamino tetraacético (AEDT) y citrato.

En las ciencias biomédicas, la reacción de Maillard conocida también como “browning”, debido a los productos de color marrón que se forman durante su curso, se refiere a un amplio rango de reacciones no enzimáticas entre carbohidratos y grupos amino libres de las proteínas, iniciándose con la reacción de un azúcar con proteínas, denominado glicación (glicosilación no enzimática) y se extiende hasta la formación de modificaciones químicas irreversibles en las proteínas, denominados productos finales de glicación avanzada (AGEs; advanced glycation end-products).

El descubrimiento de la reacción de Maillard *in vivo* se remonta a los trabajos sobre la hemoglobina glicada en los años 70. Se descubrió una variante de hemoglobina denominada hemoglobina A_{1c}, (HbA_{1c}), en la que se comprobó que un producto de Amadori derivado de la glucosa se hallaba unido al residuo de valina N-terminal, por lo que se deduce que la HbA_{1c} se forma como resultado de una modificación post-traslacional de la hemoglobina por la glucosa. Se comprobó que la HbA_{1c} aumentaba en función de la glucemia en los pacientes diabéticos. Muchas otras proteínas son susceptibles de experimentar este mismo tipo de reacción incluyendo tanto las proteínas de vida corta como aquellas con un recambio metabólico más lento. En este

sentido, los productos de Amadori de la hemoglobina y de la albúmina se miden en los laboratorios clínicos para el seguimiento del control glucémico de los pacientes diabéticos. La mayoría de las investigaciones sobre la glicación de las proteínas durante los años 70 y 80 se han enfocado sobre los efectos de la glicación, es decir, los efectos de la formación del aducto sobre la estructura y función de las proteínas, sin embargo, tras varios años de estudio hay pocas evidencias de que la glicación por si sola (primer paso de la reacción de Maillard), tenga algún efecto patológico en la diabetes mellitus.

La relación definitiva entre la reacción de Maillard y la glicación no enzimática se establece definitivamente en 1981 (2). Una serie de indicios implican directamente a la reacción de Maillard en los procesos básicos del envejecimiento: los cambios más importantes ocurren en tejidos no renovables; muchos de esos cambios se aceleraban en el caso de la diabetes; los mismos cambios, así como otros relacionados con el envejecimiento, pueden retardarse por una restricción calórica y finalmente, tanto la diabetes como el ayuno actúan sobre la glucemia y pueden afectar al nivel de azúcares reductores intracelulares, los cuales pueden ser iniciadores de la reacción de Maillard.

En 1986 Cerami y col. (3) propusieron que la glicosilación no enzimática de las proteínas y del ADN podría jugar un papel importante en las complicaciones de la diabetes. Desde entonces, se han planteado cuestiones importantes, tales como: 1º) ¿Qué se entiende por glicosilación no enzimática?, 2º) ¿Las lesiones moleculares secundarias a esta reacción son suficientes para inducir las lesiones de retinopatía, nefropatía y neuropatía diabéticas?. 3º) ¿Cual es el papel de estas reacciones en la uremia, arteriosclerosis y los procesos fundamentales del envejecimiento? y 4º) ¿Pueden tratarse los efectos nocivos de los azúcares reductores sobre las proteínas celulares y extracelulares?

Terminología.

En la glicosilación no enzimática, los azúcares reductores reaccionan con los grupos amino libres de las proteínas, de manera distinta que en la reacción catalizada por las enzimas glucosiltransferasas. Algunos autores recomiendan utilizar el término “glicación” en lugar de “glicosilación”, para indicar la naturaleza no glicosídica de la unión no enzimática entre el azúcar y la proteína, recomendación que adoptaremos de aquí en adelante (4). Por otro lado, se reserva el prefijo “glu-” para el caso de la reacción entre proteínas y glucosa, mientras que el correspondiente “gli-” se utiliza para cualquier azúcar reductor.

Hipótesis de los AGEs

La hipótesis de los AGEs, se introdujo a mediados de los años 80 y supuso un gran impulso para el conocimiento del significado de la reacción de Maillard en el envejecimiento y en otros procesos patológicos, centrando la atención en las reacciones de formación de los AGEs y en la acumulación de éstos en los tejidos. Los estudios de los últimos años nos muestran que con la edad, los AGEs se acumulan en proteínas tisulares de vida media larga, tales como el cristalino, el colágeno, la elastina y la mielina y que dicho proceso se acelera tanto por la hiperglicemia como por el incremento de glicación que existe en la diabetes mellitus.

La mayoría de estas investigaciones se refieren a dos AGEs que se han caracterizado química y estructuralmente: la pentosidina y la N^ε-carboximetil-lisina (CML). Sin embargo, también se han encontrado anticuerpos frente a proteínas incubadas *in vitro* con glucosa durante largos períodos de tiempo. Estos anticuerpos se han utilizado en ensayos de inmunoenzimología (ELISAs) para

medir y cuantificar AGEs que no han sido caracterizados en suero y tejido. La existencia de correlaciones positivas entre pentosidina, CML, AGEs y el grado de la retinopatía, nefropatía y complicaciones vasculares de la diabetes ha implicado a los AGEs y por tanto a la reacción de Maillard en la patogénesis de las complicaciones diabéticas (5).

La formación de los AGEs puede provocar cambios patológicos a través de tres mecanismos generales: 1º) Por alteración de la estructura y función de las proteínas (6) 2º) Variando el nivel de señales solubles, como las citoquinas, hormonas y radicales libres interactuando con receptores celulares específicos para los AGEs (7) y 3º) El proceso de formación de AGEs da lugar a la formación de oxígeno reactivo como producto intermedio (8).

Estudios realizados *in vitro* indican que la formación de AGEs en colágeno se acompaña de un incremento de fluorescencia y de formación de puentes intermoleculares, lo que sugiere que los AGEs pueden mediar en los cambios descritos en el envejecimiento del colágeno, en los que también se observa un aumento de la fluorescencia y una disminución de la elasticidad del tejido conectivo. Los AGEs también existen en los lípidos y proteínas que estructuran las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y especialmente se encuentran en las lipoproteínas oxidadas de las placas de la arteriosclerosis, lo que supone una implicación de los AGEs en el desarrollo de las típicas complicaciones vasculares de la diabetes mellitus (9).

Una fuente de malformaciones congénitas en la diabetes mellitus gestacional pudiera ser la formación de AGEs sobre el ADN. Así, algunas investigaciones han implicado a la reacción de Maillard y la posterior formación de AGEs en la patogénesis de otras enfermedades neurodegenerativas y en procesos relacionadas con el envejecimiento (5). Además de la diabetes y de la arteriosclerosis también se han detectado AGEs

en la nefropatía y en la enfermedad renal terminal (10), en la amiloidosis derivada de la diálisis (DRA) (11), en la enfermedad de Alzheimer (12), en la artritis reumatoide (AR) y en el lupus eritematoso sistémico (LES) (13) entre otras.

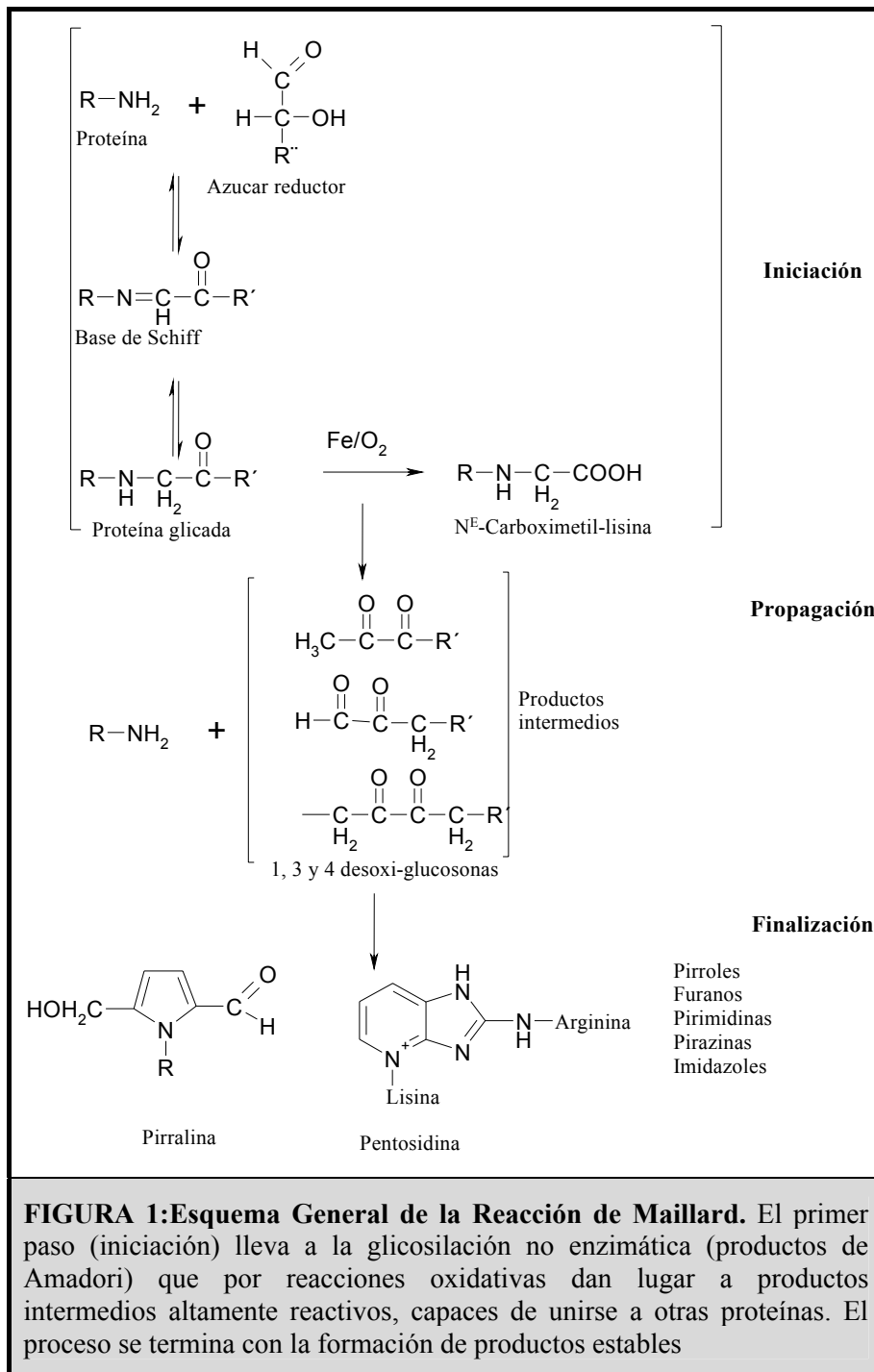
1.1.2 Reacción de Maillard: etapas

A pH fisiológico las proteínas que poseen grupos amino libres tales como el ϵ -NH₂ de la lisina o de la arginina, reaccionan de forma no enzimática con grupos aldehído o cetona de azúcares como la glucosa, para formar productos reversibles, tipo base de Schiff que luego evolucionan al correspondiente producto de Amadori, un aducto entre la proteína y el azúcar. Posteriormente, los productos de Amadori pueden experimentar una serie de reordenamientos, originando puentes moleculares entre distintas cadenas polipeptídicas, lo que da lugar, en la mayoría de los casos, a un grupo heterogéneo de estructuras químicas aún sin caracterizar, las cuales unen distintas cadenas proteicas y originan polímeros que se denominan de forma colectiva productos finales de glicación avanzada (AGEs). La formación de AGEs sobre las proteínas, implica que éstas presenten propiedades fisicoquímicas y funcionales diferentes respecto de la proteína nativa; siendo una de las más obvias el aumento en el peso molecular consecuencia del enlace covalente entre la proteína con otras cadenas peptídicas adyacentes.

La glicación, clásicamente se describe como una reacción secuencial. El proceso es muy complejo, y pueden reconocerse tres etapas (Figura 1).

1- Iniciación. Conduce a la formación de los productos de Amadori, que son cetoaminas resultantes de la reacción de los azúcares con los grupos amino

primarios. En todos sus pasos, el proceso es totalmente reversible, incluido el reordenamiento de Amadori de la base de Schiff,



2- Propagación. Los compuestos de Amadori experimentan una serie de reacciones de degradación, algunas de las cuales pueden ser de carácter oxidativo, lo que resulta en productos intermedios de elevada reactividad.

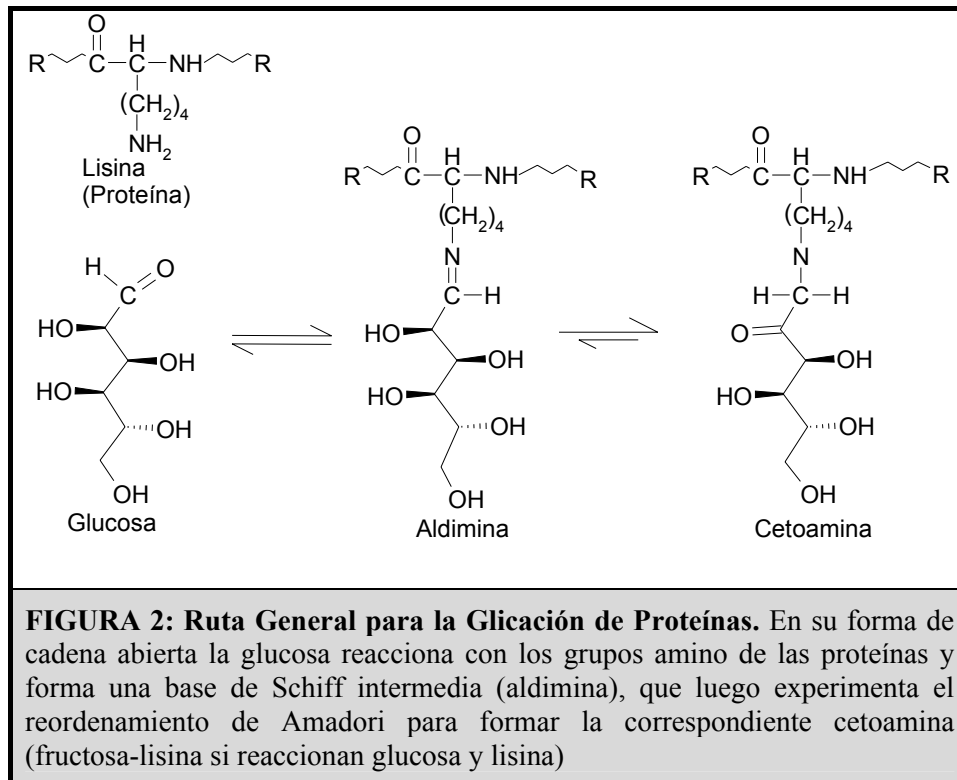
3- Finalización. Los compuestos que se generan durante la etapa de propagación, reaccionan rápidamente con grupos amino primarios, dando lugar a una gran variedad de compuestos, la mayoría de los cuales aún no se han caracterizado y colectivamente se denominan productos finales de glicación avanzada (AGEs).

1.1.3 Glicación reversible

La glicación no enzimática, primer paso de la reacción de Maillard, es una reacción de condensación entre un azúcar reductor y un grupo amino libre de una proteína (residuo amino terminal o (ϵ) épsilon-amino de una lisina). La reacción se inicia con el ataque nucleofílico del grupo amino de la proteína sobre el grupo funcional aldehído o cetona del azúcar acíclico. Originándose así una aldimina lábil, también conocida como base de Schiff. A continuación este producto intermedio sufre un reordenamiento de Amadori, con lo que se forma un derivado más estable, el 1-amino-1-desoxifruktosa, (si el azúcar es la glucosa), y que se denomina producto de Amadori.

Conviene destacar que hasta este punto, las reacciones son completamente reversibles, y que los productos no se acumulan indefinidamente, sino que alcanzan en un estado estacionario una concentración de equilibrio. Para la formación del producto de Amadori la constante de equilibrio global es de 8,4 (14). A las pocas horas las bases de Schiff alcanzan su concentración de equilibrio, y su valor *in vivo* únicamente depende de la concentración ambiente de glucosa existente en ese período de

tiempo. A los 28 días se alcanza la concentración de equilibrio de los productos de Amadori, y su valor *in vivo*, depende de la concentración de glucosa ambiental promedio y de la vida media de la proteína estudiada. De ello se desprende que en individuos normales siempre existirá un pequeño porcentaje de proteínas que se encuentran en forma de productos de Amadori.



Los distintos grupos amino libres de una misma proteína tienen diferente reactividad frente a un azúcar dado. Esto se debe a que únicamente puede formar bases de Schiff la forma desprotonada del grupo amino. A pH fisiológico la abundancia relativa de esta forma depende de su pKa, y éste, del microambiente que rodea al grupo amino.

Del mismo modo, los distintos azúcares reaccionan con diferente intensidad frente a un mismo grupo amino. La glucosa es el azúcar reductor

más inerte en la iniciación de la reacción de Maillard (Tabla 1). La existencia de distintas velocidades de reacción puede obedecer a dos causas: en primer lugar a que el ataque nucleofílico del grupo amino libre es más eficiente en el caso de las aldosas, dado que el carbonilo del grupo aldehído es más electrófilo que el del grupo cetona. En segundo término, a que la reactividad relativa de los monosacáridos depende en gran medida de la proporción en que se encuentren en forma acíclica, lo cual, a su vez depende del equilibrio entre las formas de cadena abierta y en anillo.

TABLA 1: Velocidades de Reacción Aproximadas de Distintos Azúcares Respecto a la Glucosa	
Azúcar Reductor	Velocidad global de reacción
Glucosa	1
Galactosa	4,6
Manosa	3
Fructosa	10
Glucosa-6-Fosfato	18
Fructosa-6-Fosfato	10
Xilosa	7
Ribosa	129

Se ha observado que en muchos casos la formación (*in vivo* o *in vitro*) de productos de Amadori sobre proteínas, puede inducir alteraciones en la estructura, en las propiedades fisicoquímicas y en su bioactividad. En gran medida estos cambios dependen de la localización celular o tisular de la proteína. Teniendo esto en cuenta, podemos reconocer cuatro grandes grupos de proteínas:

1.- *Proteínas plasmáticas*

En general, la formación de productos de Amadori sobre estas proteínas conduce a alteraciones en sus propiedades de unión con distintos ligandos o con otras proteínas. Así, la HbA_{1C} tiene una menor P₅₀ que la HbA, por ello tendrá una menor afinidad por el oxígeno (15). Cuando la albúmina se glica se reduce su afinidad por la bilirrubina en un 50% y en un 95% por los ácidos grasos. La glicación de la LDL conduce a una menor captación por los fibroblastos y por tanto a un menor *clearance* plasmático. La glicación de la fibrina, reduce su degradación por la plasmina. En el caso de la antitrombina III, su glicación disminuye su afinidad por la heparina, con lo cual se reduce su capacidad para inhibir a la trombina.

2.- *Proteínas de membrana*

A lo largo de la vida del eritrocito, las proteínas de la membrana eritrocitaria se glican de forma progresiva; este proceso aumenta notablemente en la diabetes. Así ocurre con la espectrina, que es la proteína mayoritaria de la superficie interna de la membrana del eritrocito. En la membrana interna, la espectrina forma una red proteica elástica que es la responsable de conferirle al eritrocito deformado su forma original. La disminución de la deformabilidad eritrocitaria que se observa en la diabetes podría explicarse por el aumento de la glicación. Las proteínas de membrana de las plaquetas también se glican más en la diabetes, lo que podría explicar los defectos en la función de las plaquetas, típicos de esta patología, como son el incremento en la adhesividad y agregación. (16)

3.- *Proteínas citosólicas*

La glicación de las proteínas citosólicas depende del tejido en el que se encuentren (en general, sólo será significativa en los tejidos insulino-independientes), y de la vida media de la proteína, aunque, como esta es relativamente corta, su glicación es prácticamente despreciable. Un caso bien conocido es el de la superóxido dismutasa (Cu,Zn-SOD), enzima relativamente abundante en eritrocitos, que en humanos son libremente permeables a la glucosa. La Cu,Zn-SOD principalmente se glica en las posiciones Lys-122 y Lys-128. Las cargas positivas de estas lisinas, localizadas en la superficie de la molécula, juegan un papel importante en la entrada del anión superóxido en el centro activo de la enzima. Si estos residuos se glican, se pierde su carga positiva, con lo que la enzima disminuye su actividad. En diabéticos, el 50% o más de la Cu,Zn-SOD eritrocitaria se encuentra glicada (17).

4.- *Proteínas estructurales*

Una gran parte de la investigación sobre la glicación no enzimática *in vivo*, se ha centrado en proteínas con un recambio metabólico muy lento, tales como las proteínas del cristalino, la mielina de los nervios y el colágeno de la matriz extracelular. Todas estas proteínas pertenecen a tejidos insulino-independientes, se glican *in vivo*, y acumulan productos de Amadori a un ritmo acelerado en la diabetes. Los tejidos que las contienen, (cristalino, nervios y pared vascular), son los que se afectan más en procesos como la diabetes y el envejecimiento. Sin embargo, la mayoría de los datos disponibles sugieren que las complicaciones crónicas de la diabetes y el envejecimiento se originarían, más que por sus productos de Amadori, por los productos de glicación avanzada de estas proteínas estructurales.

En conclusión, debido a la amplia distribución en todos los tejidos de estos productos de glicación precoz, y al hecho de que la concentración de los productos de Amadori sólo se eleva de dos a tres veces su nivel normal, parece poco probable que los productos de glicación precoz contribuyan de forma significativa a las complicaciones de la diabetes.

1.1.4 Glicación irreversible

Este proceso se corresponde con las etapas de propagación y terminación de la reacción de Maillard. Ambas etapas son importantes en proteínas con un recambio lento, como son las proteínas estructurales.

A lo largo de la vida de la mayoría de las proteínas celulares y plasmáticas, los aductos de Amadori se encuentran en equilibrio con la glucosa y prácticamente no evolucionan hacia estadios posteriores, los cuales requieren períodos de tiempo de semanas a meses; sin embargo, en proteínas de vida media larga, dichas transformaciones ocurren espontáneamente y de forma constante. Los productos intermedios y finales de esta cascada de acontecimientos se describen mejor como una clase heterogénea de aductos entre azúcares y aminoácidos, que se forman por sucesivas reacciones de deshidratación, condensación, fragmentación, oxidación y ciclación etc, en conjunto se les denomina productos finales de glicación avanzada (Advanced Glycation End-products, AGEs). Como se deduce a partir de sus vías de formación, son un grupo heterogéneo de compuestos, que principalmente se encuentran unidos a las proteínas de manera covalente e irreversible. Algunos de estos compuestos son de color marrón y tienen espectros de fluorescencia y absorción característicos.

Dentro de los AGEs se incluyen una serie diversa de compuestos; de alguno se piensa que ya son entrecruzamientos entre cadenas peptídicas y por lo tanto no reactivos, mientras que de otros se cree que son intermediarios, y por tanto capaces de seguir reaccionando y producir puentes intermoleculares.

Con el tiempo, las moléculas portadoras de AGEs se vuelven de color oscuro e insolubles y si la reacción es muy avanzada se formarían melanoidinas, que son polímeros de elevado peso molecular y similares a las que se forman en el fondo de un plato quemado.

In vivo, la formación de AGEs implica que las proteínas han de tener una vida lo suficientemente larga como para que puedan detectarse. Esta es el motivo por el que los trabajos iniciales sobre este tipo de productos se realizaron en el cristalino y colágeno; al envejecer, sus proteínas se vuelven de color amarillo y muy insolubles, en parte debido a la formación de puentes intermoleculares atribuibles a la reacción de Maillard.

El esquema clásico de la reacción de Maillard implica a los productos de Amadori, productos mayoritarios que resultan de la condensación de glucosa con aminos primarios, y que serían los únicos precursores de los productos de glicación avanzada. Esta descripción lineal de la glicación se basa en resultados obtenidos *in vitro*, al incubar proteínas con concentraciones elevadas de glucosa en condiciones de pH y temperatura similares a las fisiológicas, así como de los conocimientos obtenidos en la primera mitad del siglo por los químicos de alimentos.

Wolff y Dean (18) muestran que la glucosa puede autooxidarse en presencia de metales, lo cual daría lugar a compuestos reactivos identificados como glioxal y arabinosa (19). En un estudio se demostró que un 50% de la CML, (uno de los AGEs caracterizados), se formaba por descomposición de

los productos de Amadori, un 40% posiblemente se producía a partir de un aducto de Schiff y menos del 10% se originaba a partir de la autooxidación espontánea de la glucosa. Resultados similares introduciendo un mayor énfasis en la autooxidación de la glucosa se han obtenido por Wells-Knech et al (19).

El proceso de la glicación auto-oxidativa propugna que la glucosa experimenta reacciones de auto-oxidación catalizadas por metales de transición, lo que origina compuestos dicarbonílicos altamente reactivos los cuales rápidamente se unen a los grupos amino proteicos formando cetoiminas. De esta forma, la auto-oxidación de la glucosa no tendría efecto en la formación de productos de glicación temprana, sino en la de productos de glicación avanzada.

Desde otra perspectiva, otros estudios demuestran que no sólo ocurre con la CML, sino también con la pentosidina, que es otro producto de glicoxidación y se puede originar a partir de vías que incluyen a distintos azúcares, y que implican varios mecanismos de fragmentación de los productos de Amadori e incluso puede originarse a partir del ascorbato. Sustancialmente la composición de los productos obtenidos depende de las condiciones de reacción (relación molar de reactantes, tipo de buffer, presencia de agentes quelantes etc.). El descubrimiento de vías múltiples de formación de productos avanzados de la reacción de Maillard supone una mayor dificultad al interpretar los resultados que se obtienen en estudios biológicos.

Estudios recientes indican que la reacción puede explicarse a través de mecanismos que incluyen reacciones oxidativas y no oxidativas. Las reacciones oxidativas darían lugar a la autooxidación de la glucosa, con la consiguiente glicoxidación y formación de especies de oxígeno reactivo. Por otra parte, en reacciones no oxidativas podrían formarse, desoxiosonas, que son unos intermediarios reactivos de la reacción de Maillard, como la 3-

desoxiglucosona (3DG). Por ello, en condiciones fisiológicas no están muy claros los efectos del oxígeno y de los metales de transición sobre la formación de AGEs.

Basándose en los conocimientos mas recientes, las vías de formación de los AGEs podrían resumirse en la siguiente figura. La glicación y las reacciones de oxidación conducen a la formación de AGEs, incluyendo la CML y la pentosidina. Las reacciones no oxidativas también dan lugar a la formación de AGEs tales como la pirralina y el “crossline”

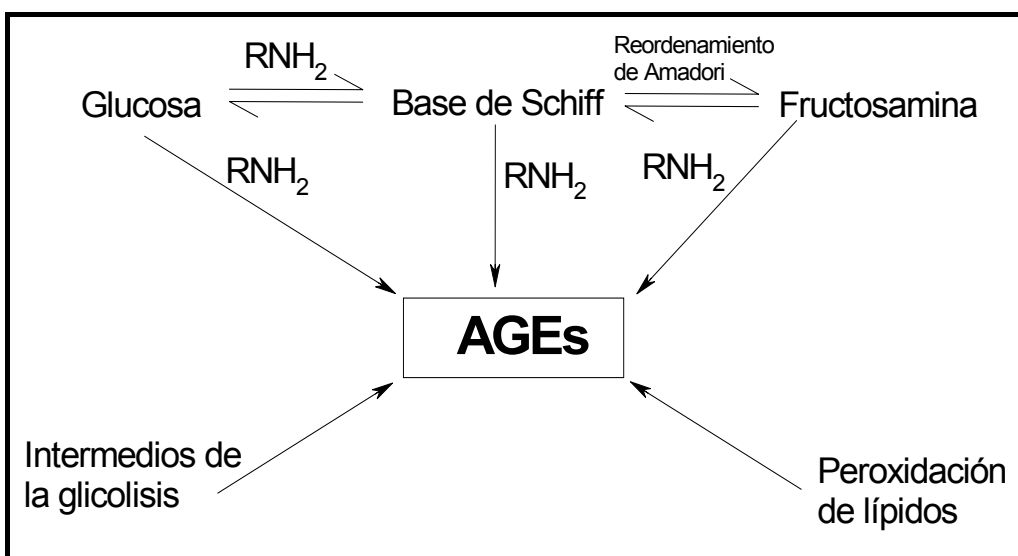


FIGURA 3: Mecanismos para la Formación de Productos Finales de Glicación Avanzada. La glucosa es un claro precursor de AGEs, pero distintos compuestos dicarbonílicos, derivados de la oxidación de carbohidratos, como glioxal, metilglioxal y 3-desoxiglucosona son también precursores de AGEs *in vivo* (20). Hay al menos cuatro procesos implicados en la formación de AGEs en los sistemas biológicos: (i) oxidación de monosacáridos (glicación autooxidativa); (ii) fragmentación de bases de Schiff; (iii) degradación de fructosamina y (iv) reacción directa de los compuestos α y β -dicarbonílicos formados por degradación de productos de la glicolisis o peroxidación de lípidos con proteínas (5)

1.1.5 Estructura de los productos finales de glicación avanzada (AGEs)

AGEs identificados *in vivo*

A pesar de la gran cantidad de investigación realizada para dilucidar la estructura de las modificaciones ocurridas durante la glicación avanzada de las proteínas, pocas se han caracterizado y de éstas sólo dos estructuras se han estudiado extensamente, la pentosidina y la N^e-carboximetil-lisina (CML)

Se han detectado aproximadamente una docena de AGEs en tejidos, y se pueden subdividir en las siguientes categorías:

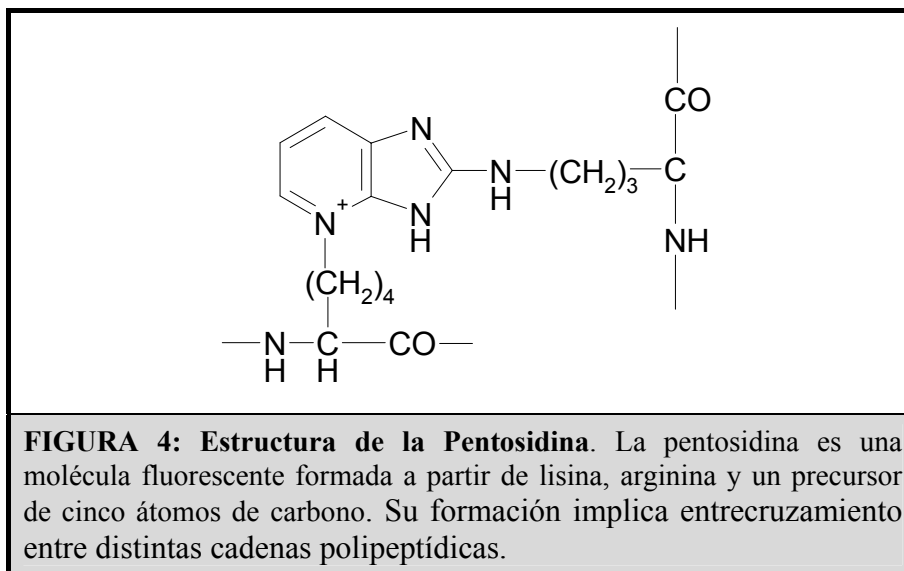
1-AGEs **fluorescentes que provocan entrecruzamiento** de cadenas polipeptídicas como pentosidina y crossline.

2-AGEs **no fluorescentes que provocan entrecruzamiento** de cadenas polipeptídicas como GOLD, MOLD, etc.

3-AGEs que **no provocan el entrecruzamiento** entre cadenas polipeptídicas como pirralina, CML.

La pentosidina se descubrió simultáneamente por los grupos de Baynes (21) y de Monnier (22) prevaleciendo el nombre asignado por este último grupo, el cual se había adelantado en su completa caracterización química. La pentosidina, consiste en un puente molecular entre un residuo de lisina y otro de arginina, que se combinan en forma de un anillo. Los dos residuos de aminoácidos se unen a través de un resto hidrocarbonado de cinco átomos de carbono que en principio inspiró su nombre, sin embargo, posteriormente se observó que puede formarse por reacción de lisina y arginina no sólo con pentosas, sino que también con otros carbohidratos como la glucosa, aunque se desconoce su mecanismo de formación. En ensayos *in vitro*, la pentosidina se obtiene con un elevado rendimiento si se permite reaccionar a las pentosas con

lisina y arginina, pero también se obtiene a partir de glucosa, fructosa, ascorbato, compuestos de Amadori, 3-desoxiglucosona y otros azúcares (23). La presencia de oxígeno es necesaria para la formación de pentosidina a partir de estos precursores.

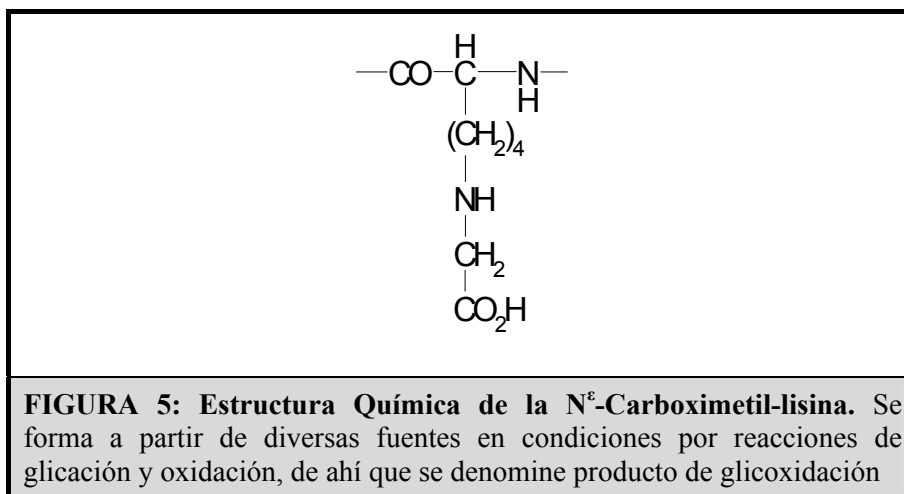


La pentosidina es fluorescente, con máximos de excitación y emisión a 335 nm y 378 nm respectivamente. Aunque la pentosidina se encuentra en el colágeno en cantidades mínimas ($\cong 0,01$ mol/mol de colágeno), representa de un 25-40% de la fluorescencia del colágeno, por tanto es uno de los fluoróforos más importantes de las proteínas glicadas tanto *in vivo* como *in vitro*, aunque se ha estimado que supone menos del 0.1% de los puentes moleculares que se generan (24).

Existen anticuerpos específicos para medir las concentraciones de pentosidina en proteínas plasmáticas (25), sin embargo, ésta sólo se encuentra en cantidades del orden del 1% de las concentraciones de la CML. Si se utilizan ELISAS competitivos se encuentra que no es un determinante mayoritario para los anticuerpos anti-AGE que se preparan en determinados

laboratorios, por ello la forma de análisis de pentosidina sigue siendo a través de HPLC con detección fluorimétrica.

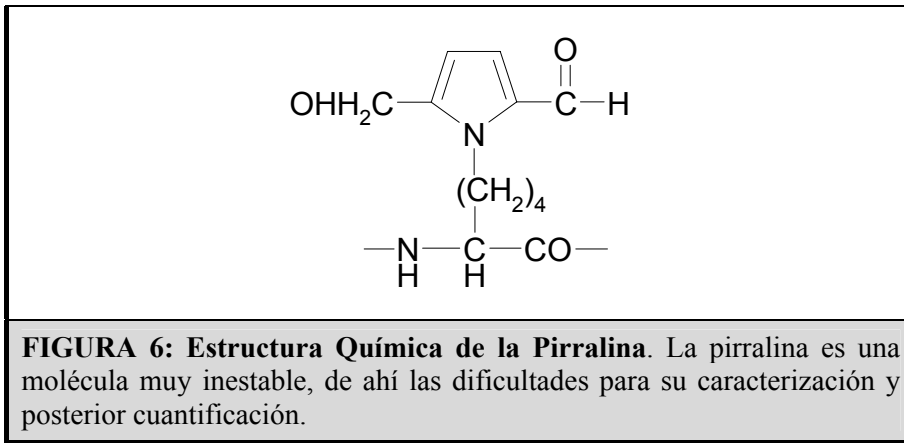
La N^ε-carboximetil-lisina (CML), es un producto intermediario que en principio se genera por oxidación de los productos de Amadori. El grupo primario en la mayoría de las proteínas modificadas es el grupo ε-amino de lisina lo que da lugar a la formación del producto de Amadori fructosa-lisina (FL). La degradación oxidativa de FL da como producto CML (26) y posteriormente se demostró que la CML también se forma, bajo condiciones oxidativas por reacción del ascorbato y otros azúcares con proteínas e incluso durante la peroxidación lipídica (27).



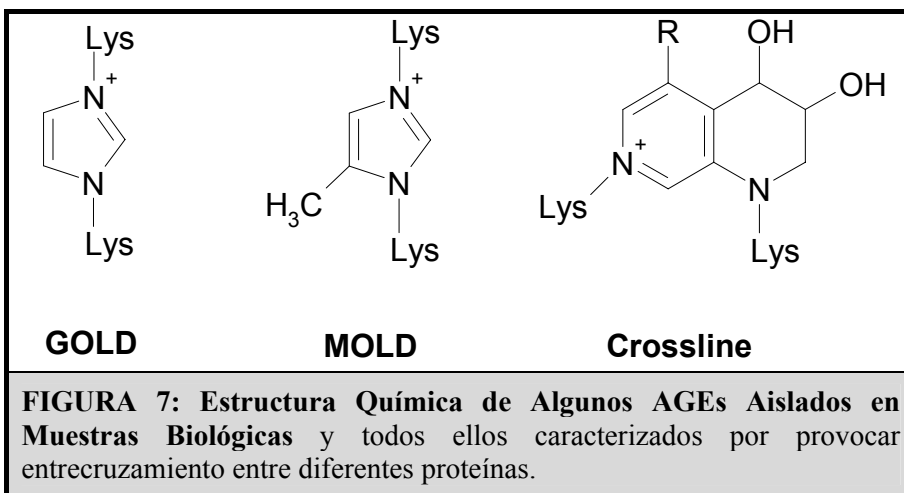
De entre todos los AGEs conocidos, la N^ε-(carboximetil)-lisina y la pentosidina se describen como productos de glicoxidación dado que para su formación a partir de glucosa se requieren condiciones de glicación y de oxidación. Estos productos de glicoxidación son los únicos AGEs que se sabe se acumulan en las proteínas tisulares con la edad (envejecimiento) y a una mayor velocidad en los pacientes diabéticos. Wells-Knecht et al. (19) han demostrado que la oxidación de la glucosa origina glioxal (GO) y arabinosa,

que respectivamente son precursores de la CML y pentosidina. Aunque estos precursores, solamente bajo condiciones oxidativas se forman a velocidades apreciables, prosiguen tanto bajo condiciones aeróbicas como anaeróbicas hasta la formación de CML y pentosidina. Por ello, estos autores proponen la participación de un mecanismo de Cannizzaro para explicar la formación de CML vía glicosilación auto-oxidativa, mientras que para la de formación de pentosidina a partir de pentosas, piensan que probablemente esté implicada la formación de desoxipentosas como productos intermedios. El GO es un producto común que se forma por oxidación de diversos carbohidratos, tales como aldosas, cetosas y ascorbato; esto sugiere que durante la reacción de Maillard existe un mecanismo general de formación de CML.

El producto mayoritario resultante de la reacción entre glucosa y aminos primarias cuando se calientan a reflujo es la pirralina, también denominada pirrol-lisina. El rendimiento a pH ligeramente ácido se aproxima al 10% si el reactante es el ácido ϵ -amino ácido caproico. La pirralina también se aísla a partir de una mezcla de glucosa y lisina después de 7 días de incubación alcanzándose un rendimiento del 1%. Debido a su labilidad frente a la hidrólisis ácida se han producido primero anticuerpos policlonales, y luego monoclonales para realizar la cuantificación de pirralina en plasma a través de ELISAS después de llevar a cabo una digestión proteolítica. En un trabajo se observó que la pirralina era estable a la hidrólisis alcalina, esto permitió el desarrollo de un método cromatográfico para su análisis en proteínas incubadas con glucosa y en tejidos biológicos. Una idea de la elevada reactividad del grupo pirrol de la pirralina nos la da el hecho de las bajas concentraciones de pirralina que existen *in vivo* y la dificultad que se ha encontrado para purificar cantidades significativas de pirralina nativa a partir de tejidos para realizar el correspondiente análisis espectral.



La pirralina se ha detectado en proteínas plasmáticas y en el colágeno tisular (28) así como en las placas seniles y en los ovillos neurofibrilares que se ven en los pacientes con enfermedad de Alzheimer (29). Aunque en la diabetes se encuentra elevada en las proteínas plasmáticas, no ocurre lo mismo en el colágeno con el envejecimiento.



El AGE crossline se han aislado a partir de reacciones modelo de N^ε-(acetil)lisina con glucosa y se han detectado a través de métodos inmunohistoquímicos en membranas basales de riñón, lugar en el que su concentración aumenta con la edad (30). El espectro de fluorescencia de las crosslines se asemeja al del colágeno envejecido, esto sugiere que las crosslines

contribuyen al incremento de fluorescencia y al entrecruzamiento que se observa en el colágeno a medida que envejece.

Otros AGEs como el dímero de lisina y glioxal (GOLD) o dímero de lisina y metilglioxal (MOLD) se forman por reacción de glioxal o derivados con lisina y se han detectado *in vivo* (31).

Se han identificado otros AGEs, aunque por el momento, su significación *in vivo* es limitada (32).

1.1.6 Consecuencias biológicas de la formación de los AGEs

Generalmente, se acepta que las proteínas que presentan vidas medias superiores a unas pocas semanas, son más susceptibles de formar productos finales de glicación avanzada y consecuentemente que las máximas concentraciones de AGEs se observan en proteínas estructurales como las existentes en el tejido conectivo y en las membranas basales. Sin embargo, se ha visto que los AGEs pueden producirse sobre proteínas de vidas más cortas, como las plasmáticas, sobre constituyentes de los lípidos y en los ácidos nucleicos. Esto es particularmente importante en situaciones en las que existe una mayor acumulación de AGEs, como la diabetes y la enfermedad renal.

Los efectos provocados por los AGEs pueden ser clasificados como dependientes o independientes del receptor ; además, los AGEs pueden actuar intracelularmente o circular e interaccionar con los receptores situados en la superficie de determinadas células tal como el receptor para AGEs (RAGE) (33). Los componentes estructurales de la matriz del tejido conectivo y en particular los componentes de las membranas basales como el colágeno tipo

IV, son dianas preferentes para la glicación, pero otras proteínas de vida media larga también pueden ser objeto de glicación avanzada, incluyendo la mielina, tubulina, el activador del plasminógeno 1 (PAI-1) y el fibrinógeno (34). La formación de entrecruzamientos intra- e inter-moleculares con el colágeno como resultado del proceso de glicación conduce a alteraciones estructurales que conllevan una pérdida de la elasticidad y aumento de la resistencia a la digestión proteolítica. Por ejemplo, el entrecruzamiento del colágeno tipo I y la elastina conduce a una mayor rigidez de los vasos sanguíneos (35, 36). La composición de la matriz extracelular también se ve modificada por los AGEs, con el aumento en la expresión de proteínas de la matriz extracelular incluyendo fibronectina, colágeno tipo III, IV y V y lamina, posiblemente inducido por la sobreexpresión de citoquinas profibróticas como el TGF- β (37, 38) y CTGF (connective tissue growth factor) (39).

Los efectos provocados por los AGEs por la vía dependiente del receptor se desencadenan por la interacción de los AGEs con distintos receptores capaces de unir esas estructuras químicas características de los AGEs. El receptor más ampliamente estudiado es el denominado receptor para AGEs (RAGE), pero otros receptores identificados son los receptores para AGEs 1, 2 y 3 (AGE-R1, AGE-R2 y AGE-R3/galectina-3) la familia de ezrin, radixin y moesin (40).

El RAGE pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas y la interacción del AGE con el RAGE desencadena la activación de segundos mensajeros tales como la proteína quinasa C y la translocación del NF- κ B al núcleo, donde incrementa la transcripción de proteínas incluyendo ICAM-1, E-selectina, endotelina-1, factor tisular, VEGF y citoquinas proinflamatorias (41-43).

La región promotora del RAGE contiene elementos funcionales para la unión del NF- κ B (44) y una consecuencia de la translocación del NF- κ B es la

sobrerregulación del RAGE, creando de este modo in círculo vicioso que perpetua la inflamación.

Los procesos que se describen a continuación ocurren tanto en el envejecimiento fisiológico de individuos normales como en pacientes diabéticos. Sin embargo, en estos últimos, y debido al estrés metabólico, los procesos conducentes al envejecimiento se verán notablemente acelerados.

1.- Colágeno y matriz extracelular

La glicación no enzimática de las hebras de colágeno provoca un mayor entrecruzamiento, debido a puentes intermoleculares; esto lo hace menos soluble y menos susceptible a la digestión enzimática, dándole una mayor rigidez al tejido que lo contiene (45). Estos entrecruzamientos, a diferencia de los producidos por la enzima lisil oxidasa en sitios específicos de los extremos carboxi- y amino-terminal del colágeno, son al azar y a lo largo de la molécula de colágeno.

En la matriz extracelular vascular, los puntos de glicación del colágeno pueden actuar como una red para el atrapamiento plasmático de albúmina, inmunoglobulinas y LDL. Brownlee M. et al (46). encuentran que el atrapamiento en la matriz vascular de la LDL depende linealmente de la concentración de AGEs que se encuentran covalentemente unidos al colágeno. La pared vascular de los pacientes diabéticos se caracteriza por una mayor permeabilidad hacia las proteínas plasmáticas, por una deposición temprana y progresiva de proteínas plasmáticas en la matriz extracelular vascular y por una arteriosclerosis acelerada.

2-Mielina y nervios periféricos

La neuropatía periférica de la diabetes y la senilidad, se asocia con desmielinización segmentaria, degeneración axónica y una excesiva glicación de la mielina de los nervios periféricos (47). En la neuropatía diabética se ha visto que la glicación de la tubulina inhibe su polimerización, este mecanismo en parte es el responsable de las anomalías del transporte axonal de las proteínas. Además de este efecto sobre el transporte axonal, la glicación también es responsable de la inactivación de la Na^+ , K^+ -ATPasa. Garner y col. (48) han demostrado que este enzima en la forma glicada es incapaz de transportar K^+ . Asimismo, han observado como ciertos inhibidores de la aldosa-reductasa restauran la funcionalidad de la molécula. Vlassara y col. (49) han detectado en los macrófagos la presencia de receptores específicos para proteínas modificadas por glucosa. Así, demuestran que la mielina glicada se elimina a través de estos receptores; este proceso explicaría en los pacientes diabéticos la desmielinización del nervio.

1.1.7 Los AGEs en diferentes patologías

Diabetes mellitus

En pacientes con diabetes el riesgo de mortalidad por complicaciones cardiovasculares es de 2 a 4 veces superior al de la población general: La hiperglucemia es la anomalía que define la DM, y es lógico suponer que la elevada concentración de glucosa es, al menos en parte, responsable de la gran mortalidad vista en la diabetes. La glicación, posiblemente representa un mecanismo por el cual los niveles excesivos de glucosa en plasma y en los espacios intersticiales, dan lugar a los cambios fisiopatológicos observados.

Existe una notable asociación entre las concentraciones de productos de glicoxidación en colágeno tisular (ajustados por la edad), y el grado de complicaciones diabéticas, sin embargo, aún no se ha establecido la causalidad entre la formación de los productos de glicoxidación y el desarrollo de complicaciones. Una fuerte evidencia a favor de que los AGEs y los productos de glicoxidación estarían implicados en el desarrollo de complicaciones diabéticas, consiste en que la aminoguanidina, un inhibidor *in vitro* de las reacciones de glicación avanzada, (3) también inhibe un amplio rango de complicaciones en animales diabéticos.

Si los AGEs son los causantes de las complicaciones, es difícil explicar porqué individuos adultos (mayores) no diabéticos que tienen niveles de AGEs más elevados que muchos diabéticos jóvenes con complicaciones, no desarrollan complicaciones de forma generalizada. Estas observaciones sugieren que los AGEs son sensores o marcadores biológicos de la velocidad de acumulación de daño en las proteínas (consecuencia de la reacción de Maillard), más que una causa directa de patología; además, la velocidad de producción del daño, medida como niveles de AGEs ajustados por la edad, podría ser más significativo en la patogénesis de las complicaciones diabéticas.

Los AGEs son reconocidos por receptores celulares específicos para AGEs, localizados en una gran variedad de células y denominados colectivamente RAGEs, dicha unión provoca una serie de respuestas celulares que incluyen producción de oxígeno reactivo, respuesta inflamatoria, alteración en la expresión de los genes, secreción de citoquinas, proliferación celular y remodelación del tejido (50).

En los tejidos, a medida que aumenta la edad del organismo se acumulan los AGEs, y este proceso se acelera en la diabetes (51). Los niveles séricos de AGEs correlacionan inversamente con la función renal y

particularmente se encuentran elevados en aquellos diabéticos con enfermedad renal (52). Muchos estudios muestran que los AGEs reactivos pueden alterar las propiedades físicas y estructurales de la matriz extracelular, induciendo el entrecruzamiento entre hebras de colágeno, el engrosamiento de las membranas basales o atrapando covalentemente proteínas plasmáticas como la LDL y la IgG. Por otra parte, los AGEs participan en una serie de respuestas celulares que como resultado dan lugar a disfunción vascular, expansión de la matriz, arterioesclerosis y glomerulosclerosis.

En la diabetes, existe una aceleración del envejecimiento del colágeno lo que de forma prematura, da lugar a los primeros síntomas, como las cataratas, la osteoporosis, la artrosis, el debilitamiento del sistema inmunitario, y de forma generalizada, la rigidez de los tejidos.

Todos los efectos no pueden atribuirse únicamente a la reacción de Maillard, sin embargo, en gran medida, su modulación depende de la glucemia promedio existente a largo plazo. La cuantificación de pentosidina en tendones de ratas revela que la restricción alimentaria se acompaña de una disminución en la síntesis de pentosidina lo que sugiere un efecto profundo de los hidratos de carbono que catalizan la reacción.

En el cristalino de los pacientes diabéticos, la glicación origina entrecruzamiento de proteínas y por tanto, formación de agregados; por otra parte, éstas se hacen más susceptibles a la oxidación debido a la alteración de su estructura. Todo ello facilita la aparición de cataratas (4).

Enfermedad renal terminal

Las complicaciones cardiovasculares son muy frecuentes entre los pacientes con enfermedad renal. Así, se ha detectado la presencia de AGEs en

las lesiones provocadas por la arteriosclerosis (53). Esto sugiere que los AGEs participan en las complicaciones cardiovasculares que se observan en los pacientes sometidos a hemodiálisis.

En la enfermedad renal terminal, la primera evidencia de una aceleración de la reacción avanzada de Maillard se obtuvo cuando se detectaron concentraciones elevadas de pentosidina en diabéticos con enfermedad renal terminal (54). Posteriormente se confirmó este hallazgo utilizando AGEs inmunorreactivos (55) y luego se mostró que el trasplante renal casi normaliza los niveles de AGEs, incluyendo la pentosidina.

En diabéticos con función renal normal el contenido en pentosidina de los hidrolizados de proteínas plasmáticas es significativamente más elevado que en pacientes normales (56). Esta diferencia en la concentración de pentosidina, no se ha observado, entre diabéticos y no diabéticos sometidos a hemodiálisis, sin embargo, en ambos casos, los niveles de pentosidina son más de 10 veces los hallados en pacientes normales.

Diferentes estudios en pacientes sometidos a hemodiálisis muestran la posible implicación de los AGEs en complicaciones tales como la arteriosclerosis, la hiperlipidemia (9) y la amiloidosis derivada de la diálisis (DRA) (56).

Otras patologías

Diferentes datos sugieren que la reacción de Maillard podría jugar un papel importante en los procesos fundamentales del envejecimiento. Así, los signos más marcados del envejecimiento se observan en tejidos que contienen proteínas de vida media larga como el colágeno y la elastina; de esta forma, las arterias, las articulaciones y la piel pierden al envejecer su elasticidad. El

envejecimiento hace a las proteínas menos solubles y más resistentes a la acción de las proteasas, lo que supone un bloqueo en los lugares de ataque enzimático.

La detección inmunohistoquímica de AGEs en lesiones provocadas por la arteriosclerosis en individuos no diabéticos y en las placas amiloides en pacientes con amiloidosis derivada de la diálisis o en pacientes con enfermedad de Alzheimer, implica también a la reacción de Maillard en la patogénesis y progresión de estas enfermedades (5).

En la DRA, la disminución existente en el aclaramiento de la β_2 -microglobulina (β_2 M), conduce a un incremento en la β_2 M circulante, tanto en su forma nativa como β_2 M-AGE (57).

En la enfermedad de Alzheimer, inmunohistoquímicamente se detectan AGEs, tanto en las placas β -amiloides como en los haces neurofibrilares. La glicación y formación de AGEs en la proteína β -amiloide favorece la nucleación y precipitación de esta proteína, lo que sugiere un mecanismo adicional a través del cual la reacción de Maillard podría acelerar la patología en la enfermedad de Alzheimer (58).

Tanto en la DRA como en la enfermedad de Alzheimer, el depósito anormal de una proteína es el factor inicial desencadenante, seguido de la acumulación de AGEs sobre esa proteína, lo que conduce a una inflamación y desarrollo de daño tisular. Aunque la reacción de Maillard puede no ser la primera fuente de patología, la inhibición de esta reacción y el correspondiente estrés oxidativo podría limitar la extensión del daño.

1.1.8 La pentosidina como marcador de AGEs

La pentosidina, producto fluorescente resultante de la formación de puentes moleculares entre residuos de lisina y de arginina y un precursor, de origen desconocido, de cinco átomos de carbono, se ha definido como un producto de glicosidación y se ha sugerido como un marcador de AGEs. Tanto en la diabetes, como en la enfermedad renal, los incrementos de pentosidina se acompañan de un incremento global de AGEs inmunorreactivos. Resultados similares se han observado en experimentos *in vitro* realizados con diversos agentes glicantes (21, 24).

En casi todos los tejidos donde se ha detectado, la pentosidina aumenta con la edad. Su elevación es lineal en el colágeno de la duramadre y alcanzaría a los 100 años 250 pmol/mg de proteína (22), en la piel el comportamiento es exponencial y parabólico en las membranas basales del riñón (54). En estos tejidos, la acumulación es del orden de tres a cuatro veces menos, probablemente debido a un mayor recambio metabólico del colágeno que de la duramadre.

La cuantificación de pentosidina en colágeno cutáneo de pacientes diabéticos insulino dependientes muestra valores de pentosidina más elevados en los que presentaban retinopatía, nefropatía, rigidez arterial y articular que en aquellos sin complicaciones y con el mismo tiempo de duración de la diabetes (59). Esto indicaría la existencia de una anomalía metabólica más pronunciada en algunos pacientes diabéticos. Dado que, en parte, la pentosidina proviene de la glucosa, es intuitiva la necesidad de un mejor control glucémico en la prevención de las complicaciones diabéticas.

La existencia de concentraciones plasmáticas y tisulares muy elevadas de pentosidina en pacientes con insuficiencia renal (60) es un fenómeno que no

ha sido aclarado. La importancia de este hallazgo reside en que la uremia provoca complicaciones similares a las observadas en la diabetes, tales como cataratas, neuropatía periférica y una fuerte aceleración de la arteriosclerosis.

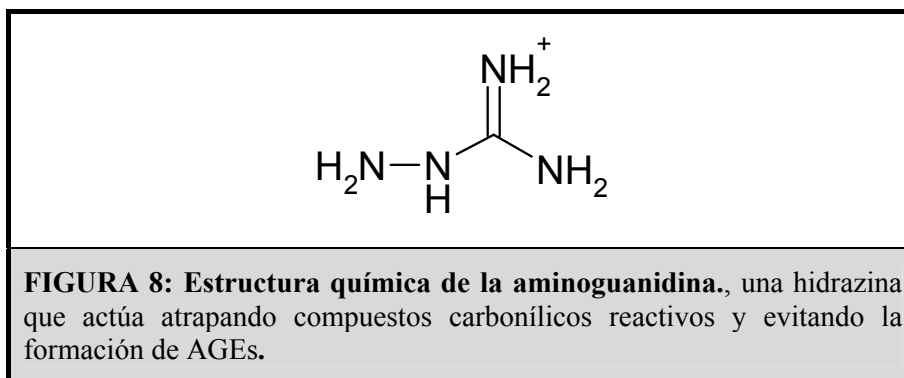
El origen preciso del azúcar o azúcares implicados en la síntesis de pentosidina es desconocido, aunque la ribosa es el precursor más reactivo, la glucosa, la fructosa e incluso el ácido ascórbico dan lugar a pentosidina cuando se les permite reaccionar con proteínas (23). Así, en el cristalino, una concentración elevada de ácido ascórbico es la responsable de la síntesis de pentosidina y del oscurecimiento de las proteínas que se ven en las cataratas. En la diabetes cabe pensar que las propias proteínas glicadas sean la fuente de pentosidina, y en la insuficiencia renal, la situación es menos clara, dado que la pentosidina se eleva de igual modo en los urémicos no diabéticos, lo que parece excluir claramente la glucosa como precursor.

Un precursor que no se elimina correctamente por el riñón enfermo podría ser el responsable del aumento de la pentosidina, así, se observa que el trasplante renal normaliza los niveles de productos de glicación avanzada (61).

1.1.9 Agentes que inhiben o reducen la formación de AGEs

La formación de AGEs puede prevenirse si se bloquean los productos iniciales de glicación; sin embargo, el desarrollo de inhibidores específicos para la formación de AGEs se ha visto imposibilitado por la complejidad de las reacciones involucradas en su formación y la diversidad de productos formados. La aminoguanidina (3), fue uno de los primeros inhibidores de AGEs estudiados y se cree que actúa atrapando los compuestos carbonílicos

intermediarios del metabolismo, ya que ha demostrado ser químicamente más *reactiva que el grupo ϵ -amino* de la lisina de las proteínas. La aminoguanidina ha demostrado ser eficaz al prevenir un amplio rango de complicaciones diabéticas en estudios sobre animales (62) y ensayos clínicos han demostrado una reducción de la Hb-AGE independientemente del descenso de la HbA1C (63). Se han realizado ensayos tanto en pacientes diabéticos de tipo 1 como de tipo 2, con especial atención sobre la nefropatía (64). Se ha observado una reducción de la proteinuria así como una disminución en el progreso de la retinopatía, aunque el estudio no demostró un beneficio significativo en la progresión de la nefropatía avanzada. Investigaciones clínicas con este agente se han visto limitadas debidas al efecto tóxico derivadas del tratamiento prolongado observadas en algunos pacientes al desarrollar anticuerpos antimieloperoxidasa y antineutrófilo (65) y en un reducido número de individuos glomerulonefritis (64).



Las investigaciones en la industria farmacéutica se centran en el desarrollo de análogos de la aminoguanidina y de otra clase de compuestos capaces de inhibir las reacciones no enzimáticas de la reacción de Maillard, pero que al mismo tiempo no inhiba las vías enzimáticas.

Un amplio abanico de estrategias terapéuticas de tipo farmacológico examinadas predominantemente en el contexto preclínico, parecen

prometedoras a la hora de reducir el daño provocado por los AGEs interfiriendo en la acumulación de dichos productos, interrumpiendo la interacción AGE-RAGE o incluso rompiendo AGEs ya preformados (66).

Seguro que en los próximos años distintos estudios demostrarán la relevancia de dirigir la terapia hacia los productos de glicación avanzada como medida para reducir un amplio abanico de complicaciones derivadas de la diabetes o del envejecimiento.

1.2 Altos y bajos glicadores

1.2.1 Variabilidad biológica de la HbA_{1c}

La HbA_{1c} es el mejor biomarcador que existe en la actualidad para valorar el control glucémico en los últimos 2 ó 3 meses. Muchos estudios se han realizado para evaluar la efectividad de esta prueba para distinguir entre sujetos normoglucémicos, con tolerancia alterada a la glucosa (IGT) y con diabetes. Sin embargo, en un meta-análisis se ha mostrado que la prueba tiene un valor limitado, ya que muchos sujetos con diabetes ó IGT presentan valores de HbA_{1c} en el rango de referencia no diabético (67). Kilpatrick et al. 1998 (68) han mostrado que en individuos normales los valores de HbA_{1c} varían notablemente entre sujetos, mientras que los valores en el mismo sujeto cambian poco con el tiempo. Es decir, la variación inter-individual de la HbA_{1c} es muy superior a la variación intra-individual. Esto implica, que el rango no-diabético de la HbA_{1c}, está compuesto de sujetos en los que cada uno tiene su propio “rango de referencia”, el cual es muy estrecho, además, cada uno de estos rangos de referencia personales difieren sustancialmente entre individuos.

Un índice de individualidad (IOI) (es decir, la raíz cuadrada del cociente entre la varianza intra- e inter-individual), superior a 1.4 indica una gran potencialidad de una prueba para el despistaje, mientras que un valor de 0.6 indica que tiene muy poco valor (69). Se han indicado valores de IOI para la HbA_{1c} de 0.27 y 0.16 (68, 70), lo que supone que, aunque mejoren los métodos analíticos, las medidas de HbA_{1c} siempre tendrán un valor limitado como una prueba para el diagnóstico de la diabetes.

Diferentes estudios muestran que sólo del 2 al 30% de la varianza no-diabética de la HbA_{1c}, puede explicarse sobre la base de la glucosa en ayunas ó post-carga (71), mientras que la varianza restante, presumiblemente se asocia con otros factores que son independientes de la glucemia, tales como diferencias en la supervivencia de los hematíes o en velocidades de glicación. Por tanto, si en individuos no-diabéticos la HbA_{1c} puede variar hasta un 2%, en pacientes diabéticos con un control de la glucemia similar, los valores de la HbA_{1c} pueden variar la misma cantidad (72). Esto a su vez, podría explicar, al menos en parte, porque algunos diabéticos alcanzan con gran dificultad niveles bajos de HbA_{1c} y otros lo consiguen mucho más fácilmente.

En los estudios en los que se ha observado evidencia de una fuerte variación biológica inter-individual de la HbA_{1c} (68, 73) algunos individuos tienen de forma consistente bajos niveles de HbA_{1c} en el rango normal, mientras que otros tienen consistentemente niveles normales altos. Estas diferencias inter-individuales en personas sin diabetes, se ha encontrado que se mantienen a lo largo de muchos años de observaciones repetidas (71, 74, 75).

1.2.2 Índice de Glicación de la Hemoglobina y Gap de Glicación

En pacientes con diabetes, existe una considerable variación inter-individual en los niveles de HbA_{1c}, a pesar de presentar niveles precedentes similares de glucemia media (MBG) (76, 77). Esta variación no es debida al azar; a partir de poblaciones de pacientes con diabetes, varios grupos de investigadores han suministrado evidencia de variación biológica inter-individual en la HbA_{1c} (78-80).

Hempe et al. (78) formulan un método estadístico para medir las diferencias entre individuos, de la HbA_{1c} en relación al MBG, al que denominaron Índice de Glicación de la Hemoglobina (HGI); de tal forma que el $HGI = (HbA_{1c} \text{ observada} - HbA_{1c} \text{ predicha})$. La HbA_{1c} predicha se calcula a partir de la recta de regresión entre la HbA_{1c} y la MBG, insertando la MBG observada del paciente en la ecuación. Hempe et al. (78) estudiando durante un período de 2 años una muestra de niños y adolescentes con diabetes de tipo 1, encuentran que los valores individuales de HGI obtenidos a partir de medidas repetidas de HbA_{1c} y MBG, tienen consistentemente la misma dirección y magnitud. Posteriormente, McCarter et al (81) encuentran resultados similares utilizando los datos de la población de estudio del DCCT. De esta forma, el cálculo del HGI, es una técnica para cuantificar las diferencias predecibles en el grado de glicación de la hemoglobina intracelular de un individuo dado, en relación al resto de la población en respuesta a un nivel dado de MBG.

Utilizando una variación de este tipo de estudio, Cohen et al. (82) comparan las diferencias de la HbA_{1c} en pacientes diabéticos, en relación a la fructosamina en vez del MBG. Estos autores, obtienen el gap de glicación (GG; anteriormente denominado gap de glicosilación), como la diferencia entre la HbA_{1c} observada de un paciente y la HbA_{1c} predicha a partir de la regresión poblacional entre la HbA_{1c} y la fructosamina. Los autores encuentran que con

el tiempo, el GG de pacientes individuales es consistente en dirección y magnitud. La glicación de la fructosamina tiene lugar fuera de la célula, mientras que la formación de HbA_{1c} tiene lugar en el hematíe. De esta forma, los autores proponen que las diferencias en el GG entre los distintos pacientes, pueden ser debidas a diferencias en la glicación de proteínas extracelulares frente a las intracelulares (82). Por tanto, el GG es otro método para demostrar la variación biológica inter-individual de la HbA_{1c} en pacientes con diabetes.

Chalew et al (83) comparan directamente, en una muestra poblacional de pacientes con diabetes de tipo 1, el HGI y el GG. Ambos índices, correlacionan estrechamente y en general, son similares tanto en dirección como en magnitud. Para la mayoría de la población, existe una buena asociación al clasificar los pacientes individuales como altos, moderados o bajos glicadores de acuerdo al HGI y al GG. Sólo un 13% de los pacientes cambian de grupo al utilizar el HGI ó el GG. La similitud de hallazgos obtenidos a partir del HGI y GG, sugiere claramente que ambos índices miden un fenómeno similar.

La glicación de las proteínas plasmáticas (fructosamina) tiene lugar extracelularmente en el espacio plasmático. De esta forma, la MBG y la fructosamina deben de reflejar el ambiente de glucosa extracelular. Contrariamente, la glicación de la hemoglobina tiene lugar en el eritrocito. Para interactuar con la hemoglobina, la glucosa ha de entrar en primer lugar en el eritrocito desde el plasma, y luego atravesar la membrana eritrocitaria hacia el citoplasma. Los factores que aumentan o disminuyen el nivel de glucosa en la célula en relación a los niveles plasmáticos, o bien la exposición de la hemoglobina a la glucosa, deberían de conducir a diferencias entre los individuos en la glicación de hemoglobina. Así, muchas especies animales tienen valores más altos de MBG y de proteínas plasmáticas glicadas que en humanos, y sin embargo, tienen niveles más bajos de HbA_{1c} (84). Las

diferencias en la permeabilidad eritrocitaria a la glucosa, que conduce a diferencias de especie en las concentraciones de glucosa dentro y fuera del eritrocito, se han utilizado para justificar las diferencias interespecie en la glicación de la hemoglobina en relación a la MBG (84, 85).

1.2.3 Riesgo de complicaciones microvasculares

La hiperglucemia crónica, medida a través de la MBG ó de la HbA_{1c} se asocia con el desarrollo y progresión de complicaciones microvasculares de la diabetes (86, 87). Análisis epidemiológicos posteriores del DCCT, muestran que los principales determinantes del riesgo de complicaciones en cada grupo de tratamiento (intensivo y convencional) son la historia de la glucemia, representada por el nivel basal de HbA_{1c}, la duración de la diabetes al inicio del estudio, y el nivel medio de HbA_{1c} a lo largo del estudio (88).

La variación biológica de la HbA_{1c} también se ha asociado con patología macro- y microvascular. Así, en sujetos no-diabéticos, los niveles de HbA_{1c} se han asociado con enfermedad cardiovascular (89, 90). De modo similar, los datos del estudio European Prospective Investigation of Cancer and Nutrition (EPIC)-Norfolk (91), muestran que la HbA_{1c} es un factor continuo de riesgo de mortalidad en la población total, incluso en gente sin diabetes. La variación biológica de la HbA_{1c} también se asoció con nefropatía, en una pequeña población de pacientes con diabetes de tipo 1 (81, 82) a partir de los datos del DCCT, demuestran la presencia de variación biológica inter-individual en la HbA_{1c} distinta a la atribuible a la MBG, asimismo, dicha variación biológica, representa un fuerte predictor de riesgo para retinopatía y nefropatía en diabéticos de tipo 1.

La hipótesis de los altos glicadores – bajos glicadores, ha sido cuestionada (92, 93). Estos autores, indican que no puede darse por válido el HGI como determinante de riesgo para complicaciones crónicas, ya que este índice autocorrelaciona con la HbA_{1c}, y por tanto el HGI sería un subrogado de la HbA_{1c}. Al replicar los análisis utilizando conjuntamente el HGI y la HbA_{1c}, encuentran que el HGI no es un factor de riesgo independiente para complicaciones microvasculares, y que el efecto del índice de glicación sobre el riesgo, se explica por el nivel asociado de HbA_{1c}.

Chalew et al. (94) indican que durante el DCCT, a cualquier nivel de MBG, los pacientes con HGI más altos, y de este modo niveles más elevados de HbA_{1c} para la misma MBG, tienen un riesgo más elevado de complicaciones. Asimismo, indican que Lachin et al. (93) con sus análisis, no resuelven la cuestión original de si otros determinantes de la HbA_{1c} distintos de la MBG, tienen alguna influencia sobre el riesgo de complicaciones. Por otra parte, señalan que Lachin et al. después de eliminar el efecto de la MBG, la HbA_{1c} aún permanece como un predictor importante de complicaciones microvasculares. De esta forma, para cualquier nivel dado de MBG, los pacientes con concentraciones más altas de HbA_{1c} tienen un riesgo mayor de complicaciones. De lo que se deduce, la existencia de otros factores además de la MBG que afectan a los niveles de HbA_{1c} del paciente y que también predicen el desarrollo de complicaciones, es decir, los factores responsables de la variación biológica inter-paciente de la HbA_{1c} contribuyen a esta fuente de riesgo.

Nathan et al.(95) responden a estas críticas indicando que McCarter et al. (81) atribuyen el 33% de la variación no explicada en la HbA_{1c}, derivada de la correlación existente en el DCCT entre la MBG (obtenida del perfil de siete puntos) y los niveles correspondientes de HbA_{1c} ($R^2 = 0.67$), a los niveles de HGI. Sin embargo, estos autores, piensan que una explicación igualmente

plausible para esa correlación imperfecta entre la MBG y los niveles de HbA_{1c}, sería la imprecisión o inexactitud de la medida de la MBG en los aproximadamente 120 días que refleja un único valor de HbA_{1c}. En el DCCT la MBG mide niveles de glucosa en siete puntos de un único día y sólo una vez cada 3 meses. La amplia variación inter-individual de estos 7 puntos (30%) en relación a la variación en la HbA_{1c} (~10%), sugiere un amplio grado de variabilidad en la media de los perfiles de glucosa y sin olvidar la posibilidad de los errores de muestreo. Los autores, también indican que cuando se hacen medidas más frecuentes de glucosa, se captura más completamente la MBG y las correlaciones mejoran notablemente desde R² de 0.84 a 0.9 (96). Los autores concluyen que ~ el 15% de la varianza restante en la asociación entre la MBG y la HbA_{1c}, no se sabe, si es atribuible a factores biológicos, o más probablemente a la imprecisión de la MBG calculada.

Otros autores, han indicado, que parte de la varianza en la HbA_{1c} no es compartida con la fructosamina, otra prueba de control glucémico, de tal forma, que algunos mecanismos pueden ser potencialmente compartidos entre la determinación de la HbA_{1c} y la fisiopatología de las complicaciones de la diabetes, y otros no. Así, se ha señalado que el gap de glicación permite asignar la fuente del riesgo asociada a la HbA_{1c} entre mecanismos relacionados y no relacionados con la glucosa (97).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

El objetivo general del presente trabajo, se ha centrado en el estudio de distintos marcadores de glicación no enzimática de proteínas y su asociación con distintas patologías. Por una parte, se ha estudiado un producto final de glicación avanzada, la pentosidina y por otra, se ha estudiado el gap de glicación obtenido a partir de la hemoglobina glicada y la fructosamina.

2.2 Objetivos específicos

- 1) Estandarización de un método, para la determinación de la pentosidina en distintas muestras biológicas.
- 2) Valorar la distribución de las diferentes formas de la pentosidina en fluidos biológicos: suero, orina, humor vítreo, líquidos de derrames serosos y líquidos de diálisis. Establecimiento de valores de referencia.
- 3) Estudio de la pentosidina en la diabetes mellitus y su asociación con las complicaciones crónicas.
- 4) Estudio de la pentosidina en pacientes con enfermedades inflamatorias: artritis reumatoide y lupus sistémico eritematoso.
- 5) Estudio de la pentosidina en pacientes con distintos grados de insuficiencia renal.

- 6) Calcular el gap de glicación y definir los pacientes altos, moderados y bajos glicadores.
- 7) Estudio con el tiempo de la estabilidad del gap de glicación.
- 8) Realizar en una amplia población de pacientes con diabetes de tipo 2, un estudio de cohorte prospectivo, para valorar el impacto del gap de glicación sobre el desarrollo de nefropatía diabética.

3. MATERIAL Y METODOS

3.1 Muestras Biológicas

Las muestras biológicas utilizadas son sangre, orina, vítreos y fluidos provenientes de distintos derrames serosos o de diálisis peritoneal.

Sangre total: La sangre se obtiene en ayunas por punción venosa, en la fosa antecubital media del brazo, utilizando para ello agujas y tubos desechables. Se recoge en tubos que contienen EDTA (tubos Venoject[®], Terumo Europe), o en tubos sin anticoagulante (tubos Vacutainer[®] con gel separador) cuando se pretende obtener suero.

Suero: La sangre total, una vez que se produce la retracción del coágulo en los tubos Vacutainer[®], se centrifuga 10 minutos a 3000 rpm en una centrífuga refrigerada. Si la muestra de suero no se procesa inmediatamente, se guarda una alícuota congelada a -30 °C, para su análisis posterior.

Orina: La recogida de orina de 24 horas, se realiza en recipientes de 2,5 litros, irrompibles y químicamente limpios. Se le recuerda al paciente que descarte la primera orina de la mañana, registre el tiempo y recoja las siguientes micciones de las próximas 24 horas, siendo la última a las 24 horas de iniciar el cronometraje. En algunos casos, especialmente pacientes diabéticos, se utiliza orina nocturna recogida durante 10-12 horas, de forma similar a la de 24 horas. Se mide el volumen total recogido, se homogeniza bien el volumen total y una alícuota de esta muestra se procesa simultáneamente con el suero para la medida de pentosidina o bien se guarda congelada a -30 °C; el resto de la

muestra sigue la metódica normal del Laboratorio para la medida de parámetros de rutina (creatinina, microalbuminuria, etc)

Vítreos: Se han obtenido 73 muestras de humor vítreo provenientes de vitrectomía pars plana para el tratamiento de retinopatía diabética proliferativa (PDR), (n=33), desprendimiento de retina con vitreoretinopatía proliferativa (PVR), (n=28) y desprendimiento de retina (RD), (n=12). Como grupo control se ha utilizado muestras de humor vítreo de 18 cadáveres, obtenidas en el momento de la autopsia. Se han descartado aquellas muestras de vítreo en casos de enfermedad intraocular, traumatismos oculares, diabetes o sepsis.

Líquidos provenientes de derrames serosos: También se han procesado líquidos provenientes de derrames pericárdicos, pleurales y articulares que se envían al laboratorio para recuento diferencial celular o medida de otros parámetros bioquímicos. Una alícuota de dichos líquidos, después de ser centrifugados, se procesa simultáneamente con el suero del paciente.

Líquidos de diálisis: A partir de pacientes sometidos a diálisis peritoneal se obtiene una muestra del dializado de la mezcla correspondiente a las 24 horas, a la cual se le determinan los parámetros bioquímicos de rutina (glucosa, urea, creatinina, albúmina etc) así como pentosidina total y libre.

3.2 Poblaciones estudiadas

3.2.1 Pentosidina

3.2.1.1 Sujetos control

Se han obtenido muestras de suero de 146 individuos sanos (55 hombres y 91 mujeres), sin ninguna patología conocida, con una media de edad de 39 años y un rango de edades de 1 a 91 años. Aleatoriamente, a partir de 52 individuos del grupo anterior se obtuvo orina de 24 horas (20 hombres y 32 mujeres).

3.2.1.2 Diabetes Mellitus

Para este estudio se utilizó sangre de 874 pacientes diabéticos, incluyendo diabetes de tipo 1 y de tipo 2, que acuden regularmente a la consulta del Hospital Clínico Universitario de Santiago, su distribución por edades, sexo y tipo de diabetes se resume en la Tabla 2. Los pacientes se diagnosticaron de diabetes de acuerdo al criterio de la Asociación Americana de Diabetes (ADA). Se seleccionaron paciente sometidos a tratamiento con insulina o con hipoglucemiantes orales (ver Tabla 2). La duración de la diabetes oscila entre 0 y 46 años para los de tipo 1 y entre 0 y 38 años para los de tipo 2. En todos los casos, un endocrinólogo del Complejo Hospitalario de la Universidad de Santiago de Compostela (CHUS) evalúa la presencia de complicaciones clínicas de acuerdo a los siguientes criterios:

TABLA 2: Características Basales de los Pacientes Diabéticos Estudiados		
Características	Tipo 1 (N=137)	Tipo 2 (N=737)
Sexo – N°. (%)		
Hombres	74 (54)	346 (47)
Mujeres	63 (46)	391 (53)
Edad (años)		
Media±SD	31±12	64±10
Rango	13-69	35-88
Edad al inicio de la DM (años)		
Media±SD	18±8	53±11
Rango	2-34	35-88
Duración de la DM (años)		
Media±SD	14±10	11±7
Rango	0-46	0-38
Tratamiento (%)		
Insulina	100	46
Antidiabéticos orales	-	54
Complicaciones crónicas (%)		
Retinopatía	39	41
Neuropatía	61	61
Nefropatía	17	25
Macroangiopatía	6	43
Hipertensión	6	36
Índice de masa corporal (kg/m²)		
Media±SD	26±3	29±5
Rango	18-31	19-51

Retinopatía: La presencia de retinopatía se basó en un examen oftalmológico. Los pacientes se diagnosticaron de retinopatía si presentaban: microaneurisma

retinal, exudados, pequeñas hemorragias intrarretinianas, sangrado venoso, neovascularización o tracción retinal.

Neuropatía: El umbral de vibración del maléolo medio y el dedo gordo del pie sirvieron de procedimiento para el diagnóstico de neuropatía. La presencia de neuropatía se estableció cuando el umbral de vibración superaba en un factor de 2 o más el valor umbral obtenido en sujetos control del mismo grupo de edad.

También se diagnosticó neuropatía cuando presentaban síntomas compatibles con polineuropatía sensoriomotora, neuropatía autonómica o motoneuropatía, ausencia de reflejos en tobillo o sensación de pinchazo en el pie.

Nefropatía: los pacientes fueron diagnosticados de nefropatía si presentaban proteinuria de 1 g/L (o si ésta fue igual o superior a 0,3 g/L en más de una ocasión), siempre y cuando no esté presente una infección o ninguna otra causa evidente de enfermedad que la justifique.

Los pacientes se clasificaron, en cuanto a su velocidad de excreción de albúmina: normoalbuminuria (<30 µg/mg creatinina), microalbuminuria (30-300µg/mg creatinina) o macroalbuminuria (>300 µg/mg creatinina). A todos los pacientes diabéticos se les determinó la pentosidina en orina en la misma muestra que la utilizada para la medida de la albuminuria (generalmente orina nocturna).

Macroangiopatía: La enfermedad macrovascular se consideró si en la historia clínica constaba infarto de miocardio, angina, claudicación intermitente, ictus cirugía vascular o amputación por enfermedad arteriosclerótica.

Hipertensión arterial: Los pacientes se definieron como hipertensos si estaban a tratamiento con algún fármaco antihipertensivo, o bien si su presión sistólica era mayor de 140 mmHg (160 mmHg para pacientes mayores de 60 años) o si su presión diastólica era mayor de 90 mmHg (95 mmHg para pacientes mayores de 60 años); la presión sanguínea utilizada para esta clasificación fue la media de dos determinaciones.

El índice de masa corporal se calculó dividiendo el peso en Kg por la altura al cuadrado expresada en metros.

3.2.1.3 Artritis Reumatoide (AR) y Lupus Eritematoso Sistémico (LES)

En la Tabla 3 se muestra la distribución por edad y sexo de los pacientes estudiados.

TABLA 3: Características de los Pacientes con AR y LES Estudiados.		
	AR	LES
Edad (años)	52±16	38±15
Hombres/Mujeres	12/48	2/35

Datos expresados como media ± SD

Aleatoriamente, se seleccionaron 60 pacientes con artritis reumatoide (AR), diagnosticados según el criterio de la American Rheumatism Association (ARA, revisión 1987). Según este criterio, un paciente se diagnostica de AR si al menos posee 4 de los 7 síntomas característicos de la AR. Se han seleccionado además 37 pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES), diagnosticados igualmente según los criterios de la ARA; todos los pacientes presentan más de 4 de los 11 posibles signos característicos. Todos los pacientes, tanto de AR como de LES fueron evaluados por el servicio de Reumatología del CHUS

3.2.1.4 Insuficiencia Renal

En la Tabla 4 se describen las características clínicas de los tres grupos de pacientes estudiados con diferentes grados de insuficiencia renal.

Los criterios diagnósticos utilizados fueron los siguientes:

1-Insuficiencia renal crónica a tratamiento conservador

Se estudiaron 71 muestras de sangre de pacientes con IRC (creatinina >1,3 mg/dl), ninguno de los cuales está sometido a sesiones de hemodiálisis o diálisis peritoneal continua ambulatoria.

TABLA 4: Características Clínicas de los Pacientes Urémicos Estudiados			
Características	IRC (N=71)	DPCA (N=32)	HD (N=44)
Sexo (%)			
Hombres	55	62	54
Mujeres	45	38	46
Edad (años)			
Media±SD	55±18	60±19	67±5
Rango	(19-89)	(10-83)	(39-81)
Duración diálisis			
Media±SD		12±13	58±55
Diabetes (%)	65		39
Hipertensión (%)	60		
Anuria (%)	0	15	89

IRC = Insuficiencia renal crónica; DPCA= diálisis peritoneal continua ambulatoria; HD= hemodiálisis.

Los pacientes tienen insuficiencia renal leve o moderada (creatinina >1,3 mg/dl), y fueron atendidos en la consulta de nefrología del Hospital

Clínico Universitario de Santiago de Compostela. La duración de la enfermedad esta comprendida entre 1 y 38 meses, siendo la media de 9 meses. De estos pacientes, 25 eran diabéticos de tipo 2, con duración media de la diabetes de 32 ± 21 meses, y los 46 restantes no eran diabéticos. La hipertensión arterial estuvo presente en 56 pacientes, 22 de los cuales eran diabéticos y los restantes no diabéticos.

2-Diálisis peritoneal continua ambulatoria

Se han estudiado muestras de sangre, orina y líquido de diálisis en 32 pacientes con insuficiencia renal aguda, a tratamiento con diálisis peritoneal continua ambulatoria (DPCA). Los pacientes realizan el intercambio del líquido de diálisis (2 litros) entre tres y ocho veces al día (Dianeal, Baxter). A estos pacientes se les determinó la pentosidina total y libre en suero, en orina en caso de tener diuresis residual, y en líquido de dializado. A un pequeño grupo, se les determinó nuevamente la pentosidina 1 año después de la primera intervención, para valorar las alteraciones en los niveles de pentosidina. Se han excluido del estudio aquellos pacientes que han recibido sesiones de hemodiálisis o que se sometieron a trasplante renal; asimismo se excluyeron los pacientes que han tenido episodios de peritonitis.

3-Hemodiálisis convencional

El estudio incluye 44 muestras de sangre de pacientes con fallo renal agudo, que estaban recibiendo sesiones de hemodiálisis con membranas de acetato de celulosa (n=22) o poliacrilonitrilo (n=22) y dializado de bicarbonato. La permanencia en HD osciló entre 55 ± 28 meses. Para estudiar el efecto de una sesión de hemodiálisis, a un grupo de 20 pacientes se les midió la pentosidina pre- y post-diálisis.

En una segunda intervención, a los 12 meses de la primera, a un grupo de 14 pacientes se le repitió la determinación de pentosidina sérica, para valorar las posibles alteraciones de la misma.

Las causas de la insuficiencia renal en los diferentes grupos, son muy variadas, incluyendo nefropatía diabética, glomeruloesclerosis, glomerulonefritis, nefroangiosclerosis, poliquistosis renal, vasculitis necrotizante, hialinosis segmentaria, etc y en algunos casos, de etiología desconocida.

3.2.2 Altos y bajos glicadores

3.2.2.1 Diseño y grupo de estudio

El Hospital Clínico (CHUS) es un centro terciario que sirve a una población de aproximadamente 450,000 personas. En sus clínicas de pacientes diabéticos ambulatorios, se atienden a casi todos los pacientes diabéticos locales que necesitan insulina o antidiabéticos orales. Desde el año 1992, la fructosamina se determina en todas las muestras sanguíneas de los pacientes diabéticos que se envían a nuestro laboratorio para la determinación de HbA_{1c}. Para este estudio, se incluyen datos de todos los pacientes a los que se les ha prescrito insulina o antidiabéticos orales, entre Marzo de 1992 y Marzo de 2007, y diagnosticados de diabetes de tipo 2 de acuerdo con el criterio de la American Diabetes Association (ADA, 2003), además deben de satisfacer los siguientes criterios de inclusión:

- 1) En todos los pacientes, a través del período de seguimiento, la nefropatía se ha evaluado anualmente a través de la tasa de excreción de albúmina (AER).

- 2) Al menos dos determinaciones anuales de AER fueron disponibles para cada paciente (basal más otra, de modo que cada paciente se haya seguido al menos un año). Los pacientes con un seguimiento de más de un año, tienen al menos una determinación de AER por año de seguimiento.
- 3) Cada una de las medidas de la AER se acompaña de la determinación de fructosamina sérica y HbA_{1c}.
- 4) El paciente carece de hemoglobinopatías conocidas o de enfermedades eritrocitarias.

Al igual que en el DCCT (DCCT 1993), nosotros distinguimos dos cohortes de pacientes:

- 1) Una cohorte primaria de pacientes con una historia de diabetes de 1 a 5 años de duración, ausencia de retinopatía oftalmoscópica, y una AER de < 40 mg/24 horas a la entrada, es decir, en el momento de las primeras determinaciones incluidas en el estudio (1,225 pacientes).
- 2) Una cohorte secundaria de pacientes con una historia de diabetes de 1 a 15 años de duración, retinopatía oftalmoscópica de ligera a moderada, y una AER de < 200 mg/24 horas a la entrada del estudio (1,089 pacientes).

Otras variables registradas a la entrada en el estudio incluyen la edad, el sexo, la duración de la diabetes y el tipo de tratamiento. Los niveles de fructosamina sérica y de HbA_{1c} se incluyeron en el estudio, no sólo para cada evaluación de la AER, sino también cada vez que se obtuvo una muestra de sangre (“visita”) y se determinaron ambos parámetros (un total de 21,960 visitas, con una media de 9.5 por paciente).

3.3 Instrumentación analítica

Para la determinación de la pentosidina se utilizó un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) GILSON (Francia), equipado con dos bombas modelo 305 y 306, un mezclador dinámico modelo 811C, un módulo manométrico modelo 805 y un muestreador modelo Aspec XL. La bomba peristáltica y el colector de fracciones utilizado para la filtración en gel son de la marca GILSON. Para concentrar las muestras se utilizó un concentrador a vacío SpeedVac[®] (SAVANT). Las determinaciones fluorimétricas se realizaron en un fluorímetro HITACHI, modelo F2000, y las determinaciones espectrofotométricas en un espectrofotómetro Perkin Elmer.

Los perfiles bioquímicos generales (glucosa, urea, creatinina, proteínas etc) y la fructosamina, se realizaron en el autoanalizador multicanal, selectivo, abierto y de acceso aleatorio HITACHI 747 (Roche, Suiza) y las determinaciones de microalbúmina en orina en el nefelómetro BNA II de Siemens.

Para la obtención de agua ultrapura se utilizó el equipo Milli Qplus de Millipore. Las balanzas utilizadas son marca Sartorius y marca Hoaus. Para la obtención de suero y purificar fracciones se utilizó una microcentrífuga Eppendorf. El equipo de filtración a vacío fue de la marca Pobel y el bloque calefactor de la marca Selecta. Como centrífuga de sobremesa se utilizó una Jouan modelo CR 4 11.

Para la medida de HbA1C se utilizó el HPLC Arkray KDK HA 8140 (Kyoto, Daiichi, Japón) distribuido por Menarini Diagnostics (Florencia, Italia)

3.4 Reactivos, materiales cromatográficos y tampones

Productos químicos y bioquímicos comerciales

El ácido clorhídrico, ácido tricloroacético (TCA), ácido perclórico, NaOH, etanol, acetonitrilo, y suero fisiológico fueron de la marca Merck Farma y Química S.A. El ácido heptafluorobutírico (HFBA), vitamina B12, insulina, azul dextrano; NaBH₄ D-ribosa, N^α-acetil-lisina, N^α-acetil-arginina, albúmina bovina, glucosa, albúmina humana, azida sódica de Sigma Química. El acetonitrilo y metanol (grado HPLC) de Romil Chemistry.

Para la determinación de albúmina, IgG, IgA, IgM, C3c, C4 y Ceruloplasmina se utilizaron anticuerpos monoclonales suministrados por Dade-Behring (Alemania).

Para la determinación de glucosa, urea, creatinina, proteínas totales y albúmina, se utilizaron reactivos comerciales en forma de kits, suministrados por Boehringer Mannheim y adaptados al autoanalizador Hitachi 747. La fructosamina se determinó con kits de Roche Diagnostics (método del NBT) y con kits de Genzyme (método GlyPro).

Materiales para cromatografía

Sephadex C-25 (Pharmacia Biotech): resina de intercambio catiónico. El intercambiador de cationes es un grupo sulfopropilo, que se mantiene cargado en intervalo de pH 4-13. Se preparó para su uso por suspensión en agua destilada, según las recomendaciones del fabricante, dejando un mínimo de 4 horas para el hinchamiento del gel, desgasificación por succión a vacío y

montaje del gel en las columnas reutilizables (Econo-Column, 0,7x30 cm BioRad) a temperatura ambiente y equilibrando con 10 ml de agua destilada.

Sephadex G-75 Superfine (Pharmacia Biotech): matriz de dextrano entrecruzado para la separación de biomoléculas con un rango de fraccionamiento entre 3000 y 80000 Da. Después de la preparación del gel según las recomendaciones del fabricante y desgasificación, se empaquetó el gel en una columna de 1x45 cm (Econo-Column, BioRad) para lo cual se aplicó un volumen de agua destilada doble del volumen de la columna.

Biogel P-6 fine (BioRad): compuesto por esferas de poliacrilamida preparadas por copolimerización de acrilamida con N,N'-metilen-bis-acrilamida, aptas para la separación de moléculas con peso molecular comprendido entre 1000 y 6000 Da. y con un pH comprendido entre 2-10. Se preparó la cantidad adecuada para rellenar una columna de 1x45 cm, siguiendo las recomendaciones del fabricante empaquetando a continuación el gel, para lo que se aplicó el doble de volumen de agua respecto al volumen de la columna.

Octadecil-silano (C-18): Se utilizaron columnas empaquetadas desechables (Sigma Química), que se activan antes de su uso, según las indicaciones del fabricante.

Disoluciones Tampón

Para la preparación de tampón fosfato 200 mM de tampón fosfato a pH=9, se disuelven 34,82 g de K_2HPO_4 en 1 litro de agua destilada y se ajusta el pH con NaOH 3N. Esta disolución tampón fue la empleada para la síntesis del estándar de pentosidina.

3.5. Métodos Analíticos

3.5.1 Síntesis del estándar de pentosidina

La síntesis del estándar de pentosidina se hizo a través del método de Baynes et al. (21). En este método, a partir de lisina y arginina acetiladas, se lleva a cabo una reacción de Maillard usando como azúcar la ribosa, dado que se ha demostrado que es el azúcar más reactivo *in vitro*. De esta forma, se obtiene la pentosidina diacetilada. La reacción se lleva a cabo en cuatro etapas.

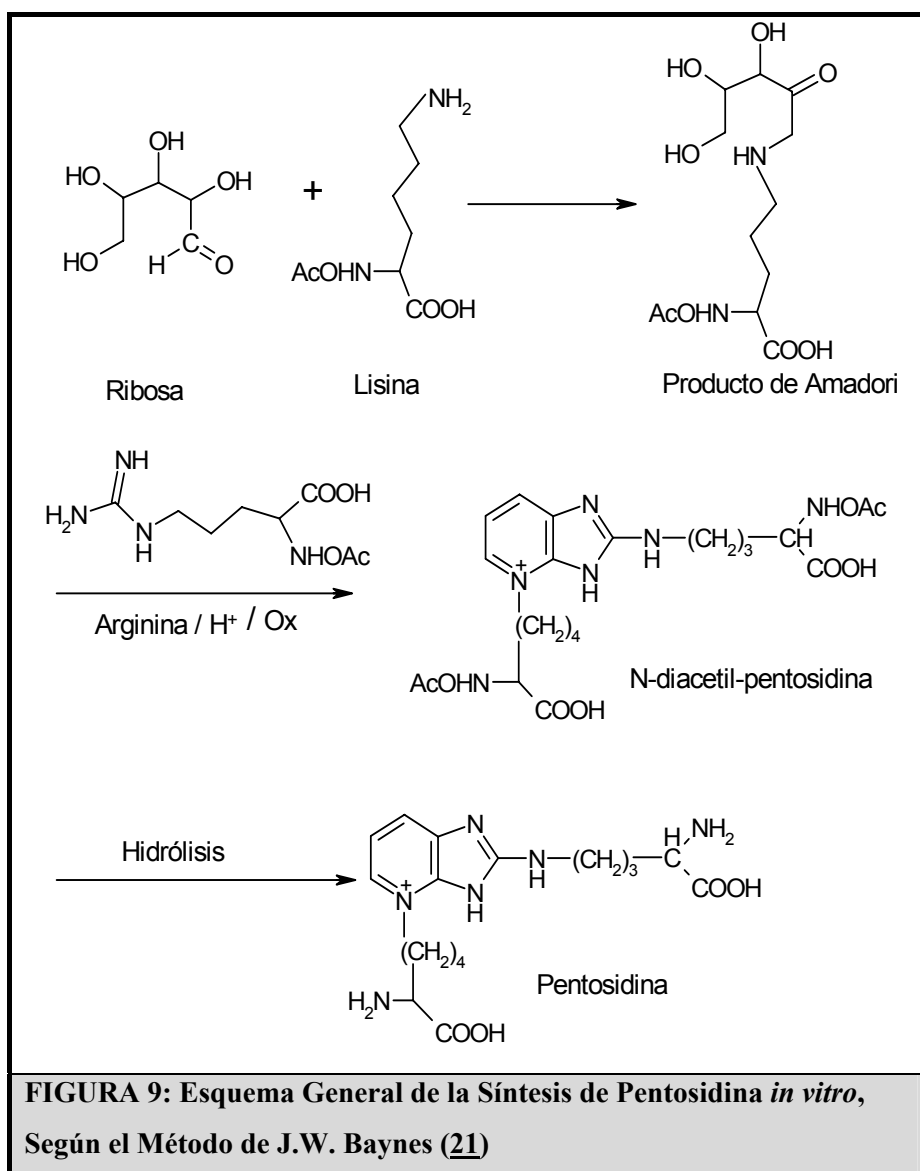
1ª Etapa: Síntesis de di-N-acetil-pentosidina

Se disuelve D-ribosa, N^α-acetil-lisina y N^α-acetil-arginina en 100 ml de tampón fosfato 200 mM a pH 9, para alcanzar una concentración final de 0.1M de cada uno de los componentes. La disolución se transfiere a un matraz de fondo redondo y se calienta a 65 °C durante 30 horas. En la fase inicial de la reacción el pH desciende bruscamente, lo que obliga a reajustes periódicos del mismo (comprobar y añadir NaOH 3N si fuese necesario cada 3-4 horas).

El curso de la reacción se monitoriza midiendo el aumento de fluorescencia debida a la formación de di-N-acetilpentosidina ($\lambda_{\text{excit}}=335$, $\lambda_{\text{emis}}=378$) o bien por la aparición de un color pardo debido a la formación de productos de caramelización, que se produce hacia las 21 horas de reacción. Finalizada la reacción, después de unas 30 horas, se concentra en un rotavapor hasta obtener un residuo oscuro caramelizado, similar al alquitrán. Este residuo se lleva a sequedad, dejando el matraz destapado, en un baño de arena a 100 °C durante 12 horas. El residuo seco se disuelve en 150 ml de MeOH y se filtra para eliminar sales insolubles. Finalmente se concentra a sequedad en el rotavapor.

2ª Etapa: Purificación de di-N-acetil-pentosidina

El concentrado que se obtiene en el apartado anterior, se disuelve en 40 ml de agua destilada y se aplica a una columna de vidrio rellena con 20 ml de octadecil-silano (C-18). Una vez introducidos los 40 ml del producto en la columna, se lava con 80 ml de agua, para eliminar los productos de “browning” no retenidos, y se recoge el eluido en un matraz limpio.



A continuación se aplica a la columna 80 ml de una mezcla agua/acetonitrilo (95:5), y se recoge esta segunda fracción eluida. Finalmente se lava la columna con 80 ml de una mezcla agua/acetonitrilo (75:25) y se recoge el eluido en un tercer matraz.

Seguidamente se procede a analizar las tres fracciones eluidas de la columna. Para ello se registran los espectros de emisión a $\lambda_{emis}=378$ de cada una de las tres fracciones, utilizando una $\lambda_{exc}.335$ nm. Se comprueba que todo el producto, la di-N-acetil-pentósidina se encuentra en la segunda fracción.

3ª Etapa: Obtención de la pentósidina libre.

Finalmente, se obtiene la pentósidina libre por hidrólisis de la pentósidina di-acetilada, para ello se requieren condiciones de reacción muy drásticas. A un volumen de la fracción que contiene la pentósidina di-acetilada, se le añade un volumen igual de HCl 12N y se calienta a 110 °C durante una hora, comprobándose que la hidrólisis se completa al analizar por HPLC la mezcla de reacción. Esta mezcla de hidrólisis se concentra a sequedad en un Speed-Vac, para obtener un nuevo residuo seco.

4ª Etapa: Purificación de la pentósidina

El residuo seco del apartado anterior se redisuelve en 20 ml de agua destilada. Un mililitro de esta disolución se diluye 1:10 con agua y se carga en una columna rellena con 5 ml de una resina de intercambio iónico (SP-Sephadex C-25, Pharmacia Biotech). A continuación, se lava la resina con 10 ml de HCl 0,1N, desechando el eluido. Finalmente se recupera la pentósidina de la columna con 5 ml de HCl 1N.

El rendimiento final de todo el proceso es del orden del 3,9%.

3.5.2 Valoración del estándar de pentosidina.

La pentosidina sintetizada y purificada como se ha descrito anteriormente fue valorada contra un estándar radiactivo sintetizado en el laboratorio del Prof. J. W. Baynes (21) en el Departamento de Química, de la Facultad de Medicina, Universidad de Carolina del Sur (USA).

3.5.3 Glicación de albúmina

Se incubó albúmina bobina (BSA, Sigma, St. Louis, USA), con una concentración de glucosa de 40 mg/ml (Sigma) 50 mM en tampón fosfato 0.1 M a pH 7.4. Se añadió azida sódica (Merk, Darmstadt, Alemania) como conservante. La reacción se llevó a cabo en tubos con tapón de rosca colocados en una estufa a 37°C durante dos semanas. Se ajustó el pH a lo largo del período según necesidad. Esta albúmina fuertemente glicada se usó como muestra para la puesta a punto del método cromatográfico de determinación de pentosidina.

3.5.4 Determinación de fructosamina

Al inicio del estudio se determinó la concentración de fructosamina (compuestos de Amadori) de las distintas muestras con reactivos comerciales (Fructosamine, Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania). Este método se basa en la reducción del nitroazul de tetrazolio (NBT) por los compuestos de Amadori en condiciones alcalinas y posterior determinación espectrofotométrica de la absorbancia a 546 nm. Las determinaciones se

realizaron en un autoanalizador automático adaptando el kit comercial según las instrucciones del fabricante.

Posteriormente, se cambió el método de determinación de fructosamina por un método enzimático y más específico, el test GliPro® (Genzyme Diagnostics, UK).

El primer reactivo contiene una proteínasa K que produce una digestión de la muestra y posterior liberación de los fragmentos de las proteínas glicadas. Una nueva enzima, la cetoamina oxidasa, en el segundo reactivo, facilita la oxidación específica de la unión de cetoamina del sustrato con fragmentos de proteínas glicadas. La liberación de peróxido de hidrógeno permite una determinación colorimétrica de la cantidad de proteínas glicadas en una reacción a punto final.

Los resultados se obtienen midiendo el aumento de absorbancia a 550 nm que es proporcional a la concentración de proteína glicada de la muestra. La secuencia de reacción es la siguiente:

La interconversión y comparación de los resultados entre ambos métodos de determinación de fructosamina se llevó a cabo con la siguiente ecuación de regresión:

$$\text{Fructosamina}_{\text{GliPro}} = 1.33 \cdot \text{Fructosamina}_{\text{NBT}} - 127.5 \quad (r = 0.991)$$

3.5.5 Determinación del gap de glicación (GG)

De acuerdo a lo indicado por Cohen et al. (82), la HbA1c fue regresionada sobre la fructosamina utilizando un modelo de regresión

longitudinal de medidas repetidas (ver apartado 3.6.3). El gap de glicación en cada visita, gg , se definió como la HbA_{1c} observada menos el valor de HbA_{1c} predicho a partir de la ecuación de regresión obtenida en este estudio (ver apartado 4.2.2). De esta forma, para cada paciente, se calculó un gap de glicación característico, GG, que es el valor medio de todos los valores de gg de todas las visitas de cada paciente a lo largo del estudio. Finalmente, los sujetos se ordenaron en base a su valor de GG y se clasificaron por tertiles como sujetos con valores altos, medios o bajos de GG (altos, moderados o bajos glicadores).

3.5.6 Determinación de hemoglobina glicosilada (HbA_{1c})

Se mide la fracción A_{1c} de las hemoglobinas glicosiladas utilizando un método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) estandarizado y alineado al método utilizado en el DCCT. El cromatógrafo está equipado con una columna de intercambio iónico Micronex A_{1c}-HSII (Sekisui Chemical Co., Tokyo, Japón) que opera a 48 °C y una velocidad de flujo de 2.2 ml/min. El volumen de muestra hemolizada es de 3 µL y el proceso cromatográfico tiene una duración de 4 minutos por prueba. Las distintas fracciones eluidas se leen a $\lambda=415$ nm (blanco a 500 nm). Los resultados se expresan como %HbA_{1c}, es decir como porcentaje de la hemoglobina total.

3.5.7 Determinación de proteínas totales en orina y líquidos de diálisis

La determinación de proteínas totales en orina y líquidos de diálisis, se realizó en un nefelómetro BNA II (Dade-Behring, Alemania), usando TCA 20% (Merck) como reactivo precipitante.

3.5.8 Determinación de la velocidad de excreción de albúmina (AER)

La albúmina en orina se midió en el nefelómetro BNA II (Dade-Behring, Alemania), utilizando reactivos monoclonales suministrados por el propio fabricante. La estimación de la velocidad de excreción de albúmina se realiza por cálculo numérico a partir del volumen (mL) de orina eliminado y de la concentración de albúmina en orina (mg/dL), todo ello referido al tiempo durante el cual se recoge la orina. Los resultados se expresan en $\mu\text{g}/\text{min}$. Este mismo método se utilizó para la determinación de albúmina en líquido de diálisis.

3.5.9 Determinación de otros parámetros bioquímicos

Los parámetros bioquímicos de rutina se midieron todos ellos en el analizador automático Hitachi 747 (Hitachi, Tokio, Japón), usando reactivos suministrados por el propio fabricante y adaptando las técnicas según las recomendaciones del mismo suministrador. En las distintas determinaciones se emplean métodos optimizados por la Sociedad Alemana de Química Clínica (Deutsche Gesellschaft Für Klinische Chemie) y comercializados por Boehringer Mannheim para autoanalizadores Hitachi. Los parámetros valorados son: Proteínas Totales, Albúmina, Glucosa, Urea y Creatinina.

Proteínas Totales: Se utilizó el método Biuret, en el que se forma un quelato coloreado, en medio alcalino, entre el ion Cu^{2+} y los átomos de oxígeno del carbonilo y de nitrógeno de la amina del enlace peptídico, que se lee a 546 nm.

Albumina: Se utilizó el método del bromocresol, en el que se mide el cambio de color a 600 nm de la disolución debido a la formación de complejos entre la albúmina y el verde de bromocresol a pH 4,2.

Glucosa: Se utilizó el método de GOD-PAP (Trinder). La glucosa se oxida a gluconato y H_2O_2 ; el H_2O_2 oxida luego a la 4-aminofenazona que en presencia de fenol y peroxidasa forma finalmente el complejo 4-(p-benzoquinona-monoimino)-fenazona que se lee a 510 nm.

Urea: Se utilizó el método de la ureasa. Se mide a 340 nm la cantidad de NADH transformada en NAD^+ .

Creatinina: Se usó el método de Jaffé cinético, sin desproteinización. En solución alcalina, la creatinina forma con el picrato un complejo coloreado. midiendo a 505 nm la velocidad de desarrollo del colorante.

3.5.10 Ultrafiltración de muestras

Para estudiar la distribución de la pentosidina, se filtran las muestras de suero con membranas Centricon 10 (Amicon, Beverly, MA); de esta forma se separan dos fracciones: la HMW con proteínas de alto peso molecular (> 10.000 Da) y la LMW con proteínas de bajo peso molecular (< 10.000 Da). Este método es el utilizado por Makita et al. (52) para estudiar la distribución de los AGEs en el suero de pacientes urémicos.

Un mililitro de suero se diluye con 2 ml de suero fisiológico y la mezcla se aplica a los microconcentradores Centricon 10. Después de centrifugar a 4000 rpm durante 2 horas, se obtienen dos fracciones de cada muestra. La fracción ultrafiltrada, denominada LMW con péptidos de peso molecular <10 kDa y la fracción retenida que contiene las proteínas con pesos moleculares >10 kDa. En cada una de las distintas fracciones se determina el contenido en pentosidina, fluorescencia y proteínas.

3.5.11 Filtración en gel de exclusión molecular

Para averiguar que fracción proteica se asociada a la pentosidina, se realiza una cromatografía en columna utilizando un gel de exclusión molecular. Se prepara una mezcla de sueros que tienen una elevada concentración de pentosidina. A partir de esta mezcla, se aplican 0.5 ml a una columna de 1x45 cm rellena con gel Sephadex G-75 Superfine (Pharmacia, Uppsala, Suecia) y a continuación se eluye con agua destilada. Se ajusta el caudal de la columna a un flujo de 6 ml/hora con una bomba peristáltica (Gilson, Villiers-le-Bel, Francia) y con un colector automático (Gilson, Villiers-le-Bel, Francia) se recogen 40 fracciones de 1 ml cada una. A estas fracciones se les determina la fluorescencia a 370/440 y 335/378 nm, su contenido en proteínas, la absorbancia a 280 nm, y su contenido en pentosidina. La columna se calibra previamente con patrones de peso molecular conocido (azul dextrano, albúmina bobina, insulina y vitamina B12)

De forma similar, la fracción LMW (PM < 10 kDa), descrita en el apartado anterior, se filtra a través de gel Biogel P6 (BioRad). Después de empaquetar una columna de 1x45 cm, se introducen 2ml de la fracción LMW,

se eluye con agua, se ajusta el volumen y se recogen fracciones de 1 ml. A estas fracciones se les determina la fluorescencia a 335/378 y 370/440 nm, la absorbancia a 280 nm y el contenido en pentosidina.

3.5.12 Valoración de fluorescencia y absorbancia en fracciones cromatográficas

A las fracciones recogidas de las distintas columnas, se les determina la fluorescencia específica a 400 y 378 nm utilizando respectivamente longitudes de onda de excitación a 370 y 335 nm. Las medidas se llevaron a cabo en un espectrofluorímetro Hitachi F-2000 (Hitachi, Tokio, Japón) en una cubeta de 1x1 cm.

A las fracciones anteriores, se les determina la absorbancia a 280 nm para estimar en cada una de ellas la concentración proteica. Las medidas se realizaron en un espectrofotómetro Perkin Elmer, utilizando una cubeta de cuarzo de 1x1 cm.

3.5.13 Condiciones experimentales para la cromatografía de HPLC

Se emplea un equipo de la marca Gilson (Gilson, Villiers-le-Bel, Francia), que consta de dos bombas modelo 305 y 306, un mezclador dinámico modelo 811 C, un módulo manométrico modelo 805 y un muestreador Aspec XL. La separación de los componentes se lleva a cabo en una columna Spherisorb C-18 de 15 x 0.4 cm (Teknokroma, Barcelona, España) con un gradiente lineal del 9 al 18% de acetonitrilo/0.1% HFBA durante 35 minutos,

seguido de un período de lavado con acetonitrilo al 90% durante 15 minutos. El flujo fue de 0.9 ml/minuto. El eluido se monitoriza con un espectrofotómetro de fluorescencia modelo F2000 (Hitachi, Tokyo, Japón), equipado con una célula de flujo continuo. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 335 y 378 nm respectivamente, el fotomultiplicador opera a 700 mV y el ancho de banda para excitación y emisión fue de 10 nm.

3.5.14 Determinación de pentosidina unida a proteínas séricas

Para la valoración de la pentosidina utilizamos una modificación del método de Takahashi y col. (98). Una muestra de 200 µl de suero (con aproximadamente unos 15 mg de proteína) se precipita con 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 10 % en un tubo de vidrio con tapón de rosca, a continuación se centrifuga durante 10 minutos y se retira luego el sobrenadante. El precipitado se reduce durante 4 horas a temperatura ambiente para lo cual, a cada tubo se añaden 3 ml de una disolución 10 mM de NaBH₄ (10 mM NaBH₄ en NaOH 0.1 N) y después 3 ml de HCl 12N. Los tubos se purgan con nitrógeno, se tapan y se calientan a 130 °C durante 18 horas en un bloque calefactor (Selecta, España.) para completar la hidrólisis. Las muestras ya hidrolizadas se concentran a sequedad en un concentrador Speed-Vac (Savant, Farmingdale, NY) y el residuo resultante se rehidrata con 500 µl de agua y se filtra a través de membranas Durapore de 45 µm (Millipore, Bedford, MA). Las muestras filtradas (400 µl) se diluyen con 10 ml de agua y se aplican a una columna de 0.7 x 1.5 cm rellena con resina de intercambio catiónico SP-Sephedex C-25 (Pharmacia, Bromma, Suecia) que previamente se había equilibrado con agua. Después de lavar con 20 ml de HCl 0.1N, la pentosidina se eluye con 5 ml de HCl 1N. Cada columna se utiliza una sola vez. El eluido se concentra a vacío hasta sequedad y el residuo se reconstituye con 500 µl de

una mezcla 95:5 de agua:acetonitrilo, con 0.1% de ácido heptafluorobutírico (HFBA), de los cuales se inyectan 100 µl en el sistema de HPLC.

3.5.15 Determinación de Pentosidina libre en suero

Para la determinación de pentosidina libre, se utilizaron dos métodos diferentes de eliminación de proteínas: precipitación de proteínas con TCA o bien ultrafiltración de las proteínas.

Método de precipitación: Una muestra de suero de 0.5 ml se precipita con 2 ml de TCA al 10%, se centrifuga recogiendo el sobrenadante. Este se diluye con 10 ml de agua y la disolución se aplica directamente a una columna de intercambio catiónico de SP-Sephadex C-25, similarmente a lo descrito en el apartado anterior para la pentosidina ligada a proteína. La pentosidina una vez eluida de la columna y concentrada, se reconstituye en 250 µl de la misma mezcla agua/acetonitrilo y se inyecta en el sistema de HPLC.

Método de la ultrafiltración: Una muestra de 2 ml de ultrafiltrado de LMW se diluye con 15 ml de agua, a continuación se determina el contenido en pentosidina por el mismo método que en el caso de la precipitación.

3.5.16 Determinación de Pentosidina total y libre en orina

Para la determinación de pentosidina total y libre en orina se siguió el método de Takahashi et al. (98). En este caso, se utiliza SP-Sephadex C-25 para el pretratamiento de las muestras, antes de su análisis por HPLC. Se

miden los niveles de pentosidina en orina sin hidrólisis de muestra (pentosidina libre) y después de haber hidrolizado (pentosidina total). Un volumen de 2 ml de orina se hidroliza con un volumen igual de HCl 12N a 130 °C durante 18 horas. Finalmente, 125 µl de orina (para medir pentosidina libre) o 250µl del hidrolizado (para la determinación de pentosidina total) se disuelven en 15 ml de agua destilada y se aplican a una columna de SP-Sephadex C-25 de 0,8 x 1,0 cm. La columna se lava con 20 ml de HCl 0.1N y la pentosidina se eluye con 5 ml de HCl 1N. El eluido se concentra a sequedad y se disuelve finalmente en 250 µl de la disolución agua/ACN 0.1% HFBA para su análisis por HPLC.

3.5.17 Determinación de Pentosidina en otros fluidos biológicos

Para la determinación de pentosidina en otros fluidos biológicos, como vítreo, líquido peritoneal, líquido pleural, líquido pericárdico o articular, etc, se procedió de forma similar al método descrito anteriormente para suero. La pentosidina libre se midió en el sobrenadante después de haber precipitado las proteínas con TCA, o bien directamente, sin precipitación, cuando el contenido proteico era bajo (caso de los líquidos de diálisis)

3.6 Métodos Estadísticos

3.6.1 Métodos generales

Los datos obtenidos para los distintos parámetros clínicos o bioquímicos se sometieron a un tratamiento estadístico utilizando los programas informáticos SPSS versión 15, Stata versión 10 y Microsoft Excel 5.0.

Para la eliminación de datos aberrantes se utilizó el criterio de Dixon sin modificar en el caso de que la muestra poblacional fuese inferior a 30, ó el criterio de Dixon modificado para series más grandes.

Para la estimación de la normalidad se utilizaron los coeficientes de sesgo y curtosis, excepto en aquellas muestras donde el número de datos era inferior a 25, en cuyo caso se utilizó el test de Shapiro-Wilk.

Dependiendo del tipo de distribución, se utilizaron como medidas de centralización la media aritmética o la mediana y como medidas de dispersión la desviación estándar, el error estándar de la media o el rango semi-intercuartílico.

Para los estudios de correlación se utilizó el test de Student o el de Spearman, dependiendo de la normalidad o no de las distribuciones en las series analíticas continuas. También se ha estimado el coeficiente de correlación biserial puntual para los estudios de correlación entre la pentosidina (variable continua) y la presencia de complicaciones clínicas, el sexo, tipo de diabetes y presencia o no de HTA (variables dicotómicas).

Para la observación de diferencias entre grupos se utilizó el test H de Kruskal-Wallis, como test no paramétrico.

Se comprobó la existencia o no de diferencias entre las medias aplicando el test U de Mann-Witney o Wilcoxon de rango de sumas.

3.6.2 Método de regresión longitudinal

Para el estudio del gap de glicación en pacientes diabéticos de tipo 2, se utilizó el modelo lineal longitudinal, para el cálculo de la regresión de la HbA_{1c} cruda sobre la fructosamina cruda. La confirmación de la linealidad se hizo por medio de un algoritmo de ajuste-spline, que no hace asunciones previas en relación a la pendiente. Sobre la base del criterio informativo de Arkaike que muestra el mejor ajuste, se utilizó un modelo de intersección aleatoria.

3.6.3 Método de regresión de Cox de riesgos proporcionales

La regresión de Cox para el estudio de progresión de nefropatía, utiliza como “covariables básicas” de los pacientes con diabetes de tipo 2 la edad basal, el sexo, el tiempo de duración de la diabetes al inicio del estudio, el tipo de terapia (insulina o antidiabéticos orales) y el tipo de cohorte (primaria o secundaria). Se han utilizado distintos tests de regresión de Cox que utilizan las covariables básicas solas o juntas con una o más de las “tres covariables adicionales primarias”: updated mean (u.m.) fructosamina, u.m. HbA_{1c} y GG (gap de glicación).

Estos modelos fueron comparados para la bondad del ajuste a través de pruebas de razón de verosimilitud. En análisis adicionales de Cox, el grupo de estudio fue tricotomizado por tertiles de GG y se incluyó para este análisis la HbA_{1c} basal como una covariable. Para el ajuste de modelos de regresión de Cox de riesgos proporcionales discretos, en el que se ajusta por varios casos vinculados, las u.m. variables fueron las medias en cada visita de cada paciente, de todos los valores del paciente de la variable incluyendo la última visita, y se incluyeron en el análisis como covariables tiempo-dependientes. Las covariables continuas fueron introducidas como términos lineales (la no linealidad fue descartada examinando modelos alternativos que utilizan splines suavizados penalizados). La asunción de riesgos proporcionales se validó previamente a estos análisis, examinando los residuos de Schoenfeld.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Estudio de la Pentosidina

4.1.1 Estandarización del método de determinación

En 1989, Sell y Monnier aislaron y caracterizaron el compuesto fluorescente denominado pentosidina a partir del colágeno humano y de otras proteínas tisulares (22). Este compuesto purificado y cuantificado por pesada ha servido de estándar hasta que se sintetizó el producto en el laboratorio. *In vitro*, la pentosidina se obtiene con buen rendimiento haciendo reaccionar lisina y arginina con pentosas, pero también se obtiene a partir de glucosa, fructosa, ascorbato, compuestos de Amadori, 3-desoxyglucosona y otros azúcares. Para la formación de pentosidina a partir de todos estos precursores se requiere la presencia de oxígeno.

Para este estudio, hemos sintetizado pentosidina, siguiendo el proceso de Baynes et al., utilizando la ribosa como azúcar precursor (21), tal como hemos descrito en el apartado de material y métodos. El rendimiento final de todo el proceso ha sido del 3%, similar al 3.9% obtenido por el grupo de Baynes et al. El rendimiento del proceso muestra una gran dependencia del pH de la reacción y de la presencia de oxígeno, así el rendimiento se reduce a un 2% cuando el pH pasa de 9 a 7,4 y es nulo cuando la mezcla de reacción tiene un pH ácido. En condiciones anaerobias o bajo atmósfera de nitrógeno, también se inhibe la reacción. La observación de que se necesita oxígeno para la formación de pentosidina indica la naturaleza oxidativa de alguna de las reacciones que tiene lugar a lo largo del proceso.

Un rendimiento en torno al 3-4% obtenido *in vitro* utilizando condiciones ideales de pH y temperatura y como reactantes lisina, arginina y ribosa puede parecer bajo, sin embargo, es muy superior al que se obtiene *in vivo*, donde se estima que la pentosidina sólo es responsable de <1% de los entrecruzamientos que se producen entre cadenas de proteínas. En realidad, sólo una pequeña parte de las posibles modificaciones de la lisina da como resultado pentosidina, ya que este aminoácido aparece implicado en la estructura de otros compuestos fluorescentes formados en condiciones similares, así como en la estructura de la CML, un AGE no fluorescente, cuya concentración en el organismo es muy superior a la de pentosidina. Todo esto da idea de la cantidad y heterogeneidad de los entrecruzamientos que se producen entre cadenas polipeptídicas *in vivo*.

Dado que no existe un estándar internacional para la pentosidina, hemos valorado nuestro estándar frente a un estándar sintetizado en el laboratorio del Prof. Baynes, partiendo de precursores radiactivos (N^{α} -Acetil-(G- 3H)-arginina y N^{α} -Acetil-(4,5- 3H)lisina), y cuantificado midiendo la radioactividad específica del producto final purificado (21).

En el año 1992, Odetti y col. (60) desarrollan un método cromatográfico para la determinación de pentosidina en hidrolizados de proteínas. Este método permite la cuantificación de pentosidina en proteínas plasmáticas y en tejidos y consta de una doble cromatografía: fase reversa y cromatografía de intercambio iónico. Sin embargo, el método es bastante complejo ya que requiere dos sistemas de HPLC, y por otra parte, los procedimientos son bastante tediosos.

Posteriormente, en 1994, Taneda y Monnier (25) desarrollan un ELISA como método alternativo al de HPLC para la cuantificación de pentosidina.

Estos autores utilizan un anticuerpo policlonal de conejo contra pentosidina sintética. El análisis por ELISA ha mostrado ser tan sensible como el método de HPLC en hidrolizado de proteínas, sin embargo, presenta una afinidad reducida por la pentosidina de proteínas nativas, probablemente debido a problemas estéricos. Por otra parte, el desarrollo de anticuerpos contra la pentosidina ha permitido localizar *in situ* este tipo de AGEs a través de estudios inmunohistoquímicos.

La pentosidina presenta una fluorescencia típica con máximos de excitación/emisión a 335/378 nm. Esta propiedad se ha aprovechado para desarrollar un método con detección fluorimétrica que permite su cuantificación. El procedimiento más utilizado para la determinación de pentosidina tanto en tejidos como en otros fluidos biológicos es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), con detección fluorimétrica.

En este estudio, hemos utilizado una modificación del método de Takahashi et al. (98) para la cuantificación de pentosidina. Originalmente, el método consiste en la hidrólisis de la muestra y pre-tratamiento del hidrolizado con una resina de intercambio catiónico de forma previa a la cromatografía de fase reversa en HPLC. Debido a la presencia de aminoácidos básicos, oxígeno y compuestos carbonílicos se pueden generar artefactos fluorescentes durante la etapa de hidrólisis, esto interfiere en la cuantificación de pentosidina y en la correcta interpretación de los cromatogramas. En este estudio, hemos introducido una etapa previa a la hidrólisis, consistente en reducir las muestras con NaBH₄. Esta reducción de las muestras de suero simplifica notablemente los cromatogramas, además de evitar la formación de pentosidina durante la etapa de hidrólisis. A pesar de ello, para la correcta cuantificación de pentosidina se necesita la combinación de cromatografía de intercambio catiónico y la fase reversa, ya que la reducción con NaBH₄ no basta para eliminar los artefactos fluorescentes formados durante la hidrólisis.

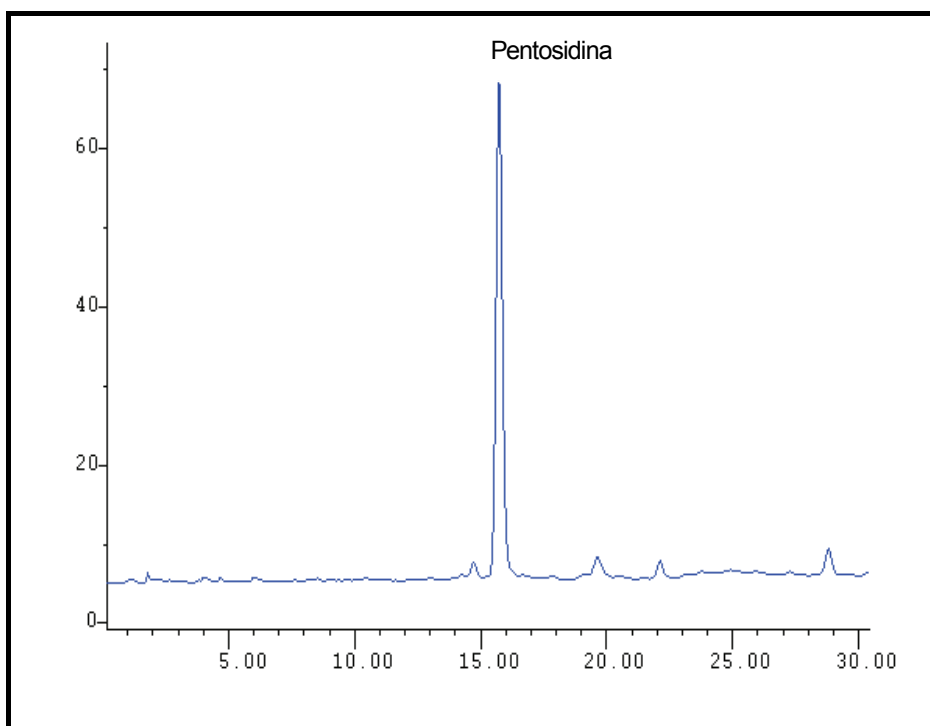


FIGURA 11: Cromatograma Característico de un Hidrolizado de Proteínas. Cromatograma correspondiente a una muestra de suero de un paciente con elevada concentración de pentosidina, después de haber realizado una doble cromatografía; intercambio catiónico y fase reversa con detección fluorimétrica a 335/378 nm. Se representa el tiempo de retención frente a la intensidad de la fluorescencia (mV).

El cromatógrafo de HPLC se calibró a 5 puntos con el estándar con concentraciones comprendidas entre 0 y 2000 pmol/ml. Si alguna muestra excede este rango, se diluye y se procesa nuevamente. El análisis mediante regresión lineal muestra la linealidad de la calibración entre ambos extremos ($r=0.999$). La recuperación analítica de la pentosidina que se añade a un suero fue del 95% a nivel de 500 pmoles, y de un 93% para una concentración de 50 pmoles ($n = 5$). El coeficiente de variación intraensayo para una mezcla de sueros con concentración de pentosidina de 38 pmol/ml fue de 4.5% (38.0 ± 1.7 pmol/ml). El coeficiente de variación interensayo para la misma muestra fue de 6.1% (media 39.1 ± 2.3 pmol/ml). El límite de detección, estimado como aquella señal doble de la del ruido de fondo, se estableció en 200 fmol por inyección

Con este procedimiento, se ha cuantificado la pentosidina en suero, orina y distintos líquidos biológicos, expresando los resultados en pmol/ml o pmol/mg de proteína. En el caso de las orinas, los resultados se expresan en nmol/mmol creatinina para tener en cuenta la dilución y la masa corporal.

4.1.2 Distribución sérica

Para determinar la fracción proteica que ha sido modificada post-traducionalmente por la pentosidina, se sometieron las proteínas séricas a ultrafiltración en concentradores Centricon-10, obteniéndose de esta forma dos fracciones, una con un PM >10 kDa (HMW) y otra con PM <10 kDa (LMW).

Una vez que se separaron las proteínas en función de su peso molecular a través de su filtración en un gel de exclusión molecular se determinó en cada una de estas fracciones la pentosidina total y la pentosidina asociada a las proteínas específicas.

4.1.2.1 Pentosidina libre

La pentosidina libre se midió precipitando directamente las proteínas con TCA 10% y analizando la pentosidina en el sobrenadante. Se realiza una doble cromatografía, tal como se describe en material y métodos. En la Tabla 5 se muestran los resultados de la valoración de la pentosidina libre en muestras de suero correspondientes a individuos normales y a pacientes con insuficiencia renal crónica, tanto en DPCA como en hemodiálisis.

TABLA 5.: Pentosidina Total y Libre en Pacientes Normales y con Insuficiencia Renal.				
Muestras	N	Pentosidina total (pmol/ml)	Pentosidina libre (pmol/ml)	Pentosidina libre (%)
Controles	20	46±22	0,7±0,9	2,1
Hemodiálisis	20			
Prediálisis		690±378	31±17	4,5
Postdiálisis		733±392	7±4	1,0
Diálisis peritoneal	20	265±168	8±5	3,0

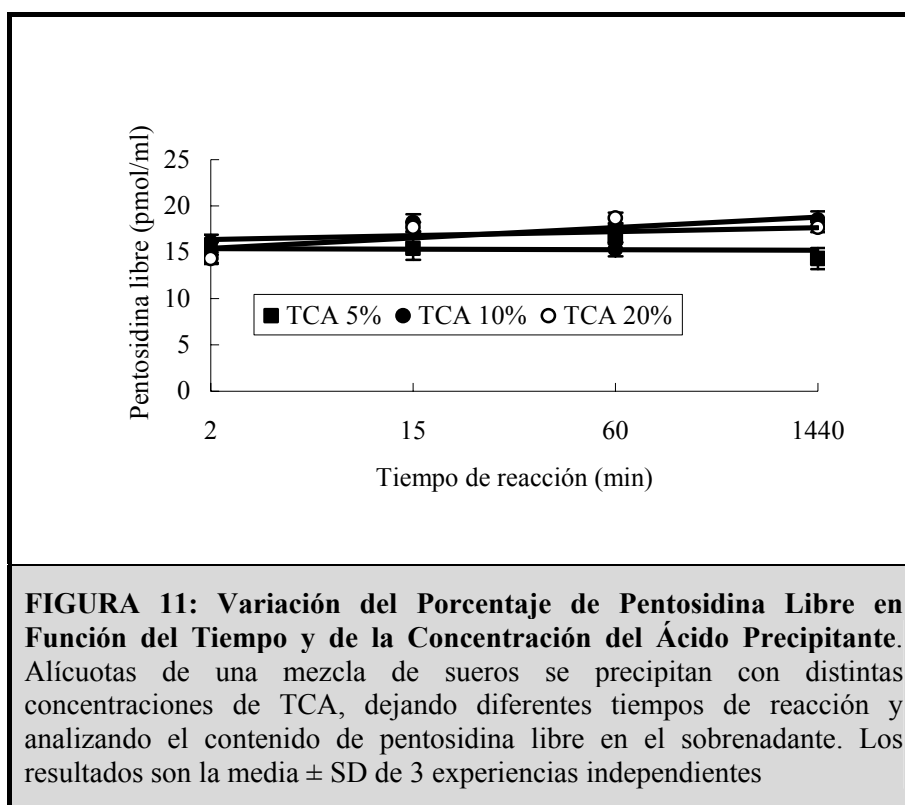
Datos expresados como media ± SD

En todos los casos las diferencias entre las concentraciones de pentosidina libre de los pacientes con insuficiencia renal y controles fueron estadísticamente significativas ($p < 0.001$), así como entre pre- y post-diálisis ($p < 0.001$).

La concentración de pentosidina libre es significativamente menor en pacientes con diálisis peritoneal que con hemodiálisis ($p < 0.0001$), y, en ambos casos es superior a la existente en pacientes normales ($p < 0.0001$). En todos los casos existe una correlación excelente entre la fracción total y la libre ($r = 0.99$; $p < 0.0001$). En los pacientes control es algo menor la exactitud de las determinaciones, debido a la existencia de concentraciones muy bajas de pentosidina, lo que obliga a utilizar relativamente grandes volúmenes de suero, lo cual dificulta la separación cromatográfica y la identificación de la pentosidina. Por otra parte, la hemodiálisis elimina significativamente ($p < 0.001$) la concentración sérica de pentosidina libre, disminuyendo su

concentración unas 5 veces después de finalizado el proceso dialítico (7 pmol/ml v.s 31 pmol/ml).

Para comprobar que la unión de la pentosidina a las proteínas de elevado peso molecular es una unión covalente y no inespecífica, se varió la concentración del ácido precipitante y el tiempo de contacto de las proteínas con el ácido. A partir de una mezcla de sueros con elevadas concentraciones de pentosidina, se realizaron alícuotas y se precipitaron con TCA a distintas concentraciones y a diferentes tiempos de reacción. En la Figura 11 se muestran los resultados obtenidos en tres muestras independientes.



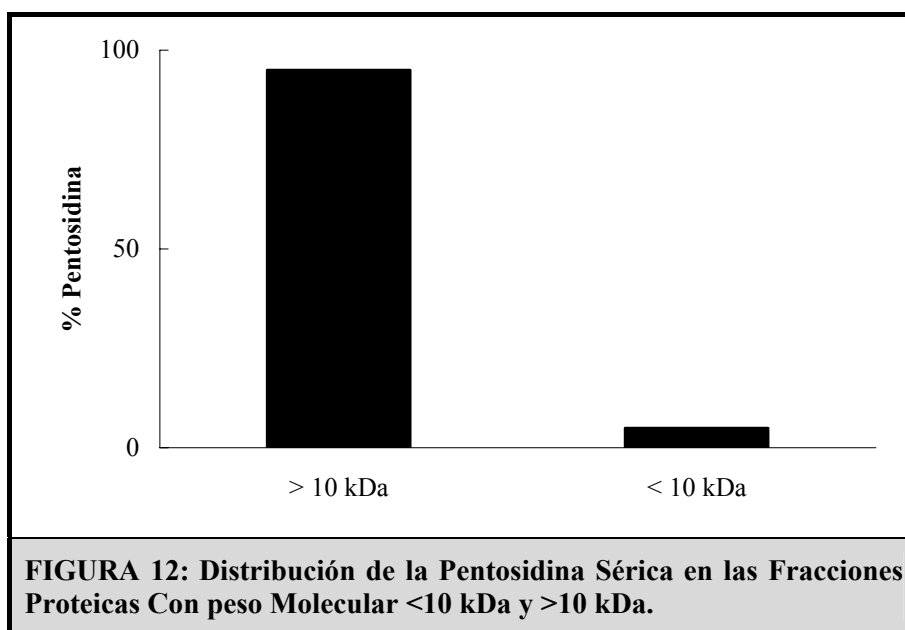
El porcentaje de pentosidina liberada no varía ni por la concentración del ácido ni por el tiempo de exposición, de lo que se deduce que las uniones entre la pentosidina y las proteínas plasmáticas de elevado peso molecular, son

covalentes. Resultados totalmente equivalentes se obtienen si se utiliza ácido perclórico en vez de ácido tricloroacético.

Otros experimentos que sugieren una interacción covalente entre la pentosidina y las proteínas de elevado peso molecular (>10kDa), son la imposibilidad de liberar la pentosidina de las proteínas por medio de agitación vigorosa en vortex, ultrafiltración y tratamiento con ultrasonidos.

Por otra parte, al añadir pentosidina pura a una alícuota de suero, y someterla incubación a 37°C durante 2 horas y posterior precipitación con ácido, se recupera el 100% de la pentosidina, de lo que se deduce que la pentosidina es un producto final estable y que en forma libre no presenta reactividad alguna frente a las proteínas plasmáticas.

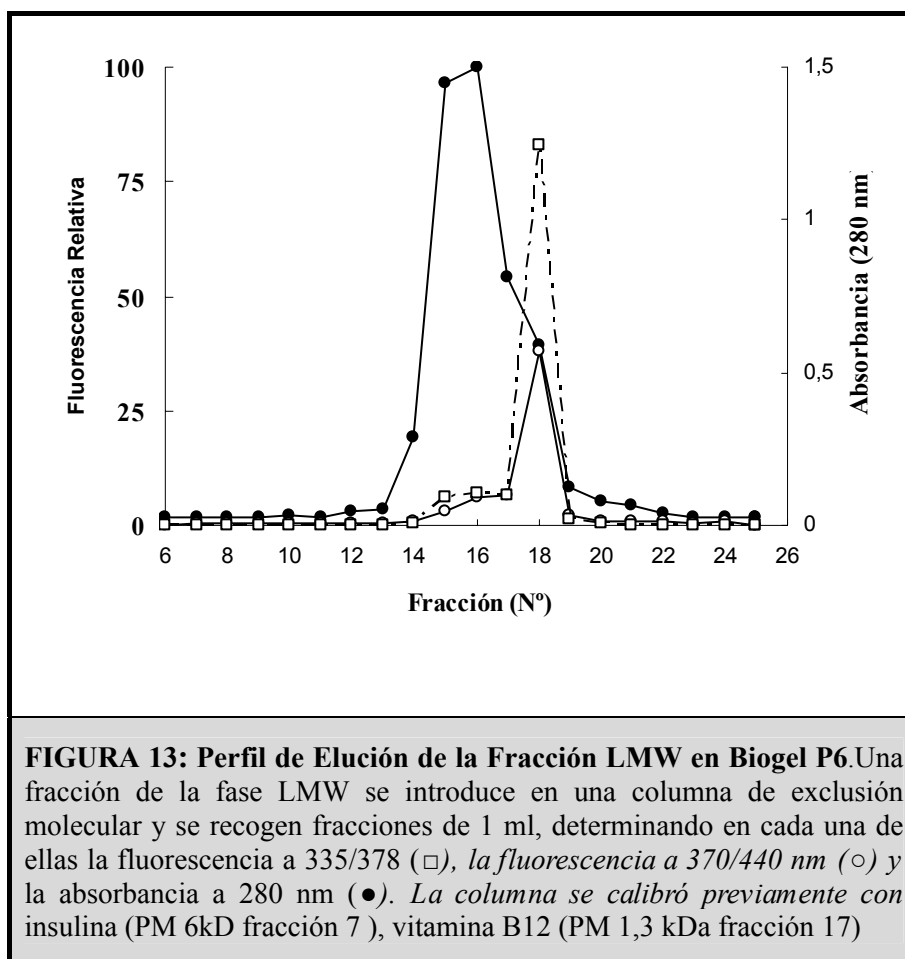
4.1.2.2-Pentosidina en la fracción <10 kDa



En la fracción ultrafiltrada de PM <10 kDa, la concentración de pentosidina total representa un pequeño porcentaje de la pentosidina total de la muestra original, inferior siempre al 5%.

En la Figura 12 se muestran los resultados realizados en 5 mezclas de sueros diferentes, en todos los casos, más del 95% de la pentosidina se encuentra asociada a proteínas de peso molecular > 10 kDa.

La Figura 13 muestra un perfil de absorbancia a 280 nm y fluorescencia a 335/370 y 370/440 nm de una muestra de 3 ml de la fracción LMW sometida a cromatografía en Biogel P6 (BioRad) (Ver material y métodos)



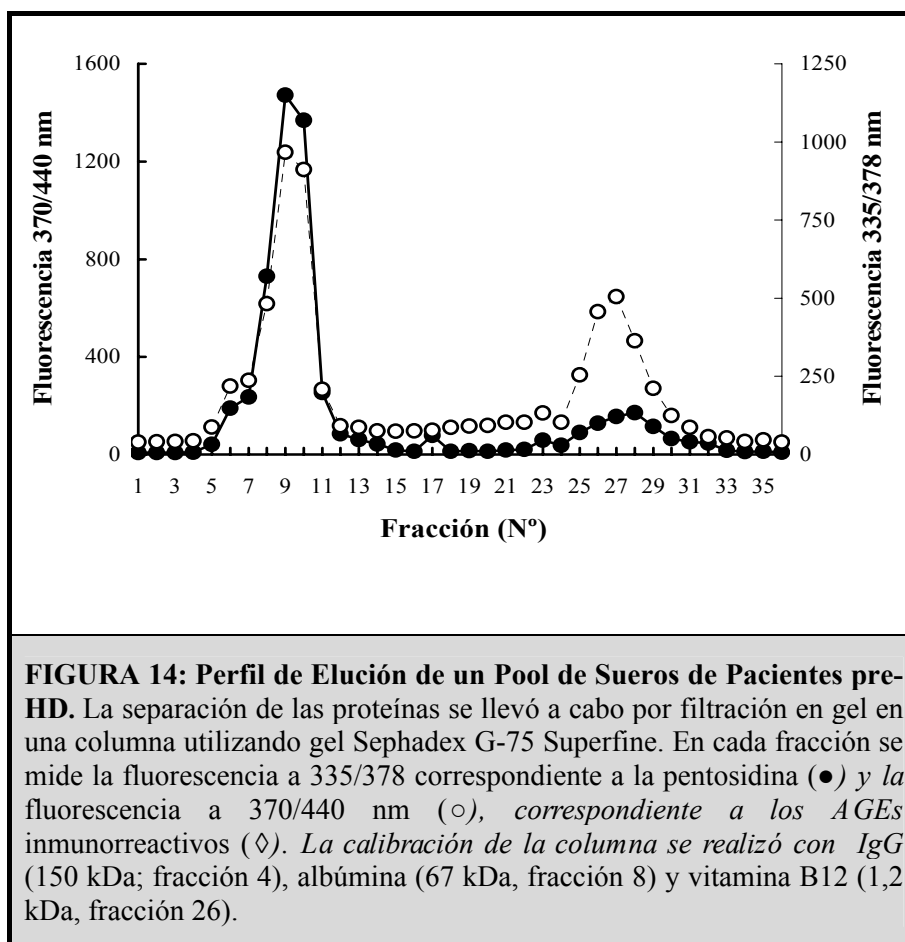
La cromatografía de exclusión molecular revela la presencia de dos picos principales, ambos con un peso molecular entorno a los 1000 Da, fuera del rango dinámico de separación de la columna. Al determinar el contenido de pentosidina en cada una de las fracciones, sólo se detecta en las correspondientes al primer pico (fracciones 14-17), la pentosidina correspondiente a este pico es el $83\pm 8\%$ de la correspondiente a la fracción LMW. Únicamente se detectan trazas de pentosidina en las fracciones correspondientes a otras regiones del cromatograma de filtración.

Al objeto de comprobar la validez del método de ultrafiltración y descartar que la pentosidina encontrada en la fracción HMW se deba a asociaciones inespecíficas, se añadió a tres muestras de suero 10 pmol de pentosidina purificada, procediendo a continuación a su fraccionamiento. La recuperación de pentosidina en la fracción LMW fue del $90\pm 2\%$. Al determinar directamente la pentosidina libre en la fracción LMW, se observa que prácticamente toda la pentosidina correspondiente a esa fracción es libre ($90\pm 8\%$, $n = 5$).

4.1.2.3 Distribución de la pentosidina en la fracción > 10 kDa

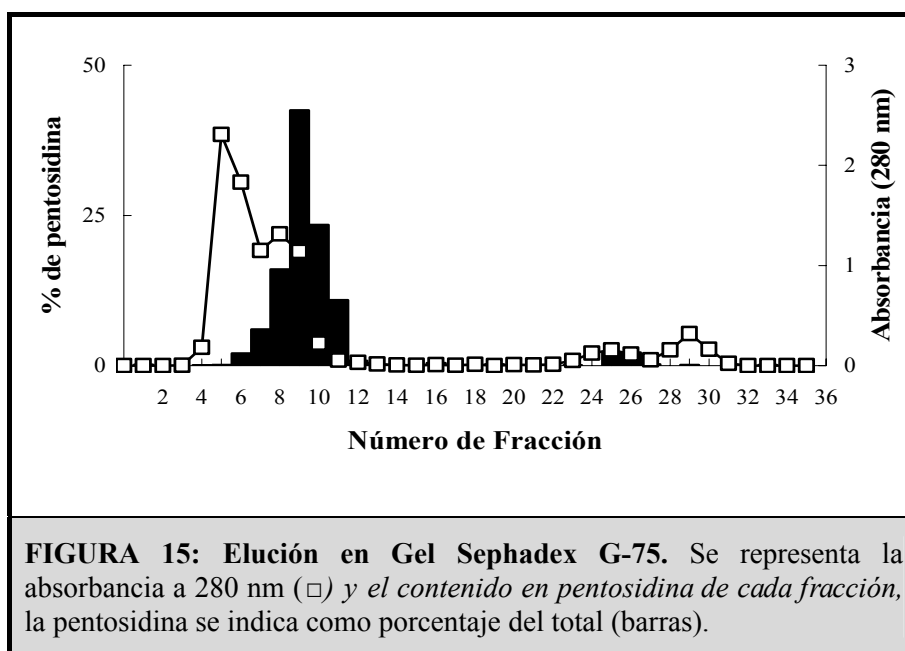
Para el estudio de la distribución de la pentosidina en la fracción de proteínas de alto peso molecular (>10 kDa) se prepara una mezcla seleccionada de sueros de pacientes que tengan concentraciones elevadas de pentosidina. A continuación, diferentes alícuotas de esta mezcla se fraccionan por filtración en gel de exclusión molecular Sephadex G-75 (Pharmacia, Uppsala, Suecia) que presenta un rango de fraccionamiento entre 3-80 kDa.

Se recogen fracciones sucesivas de 1 ml, a las que se les mide la fluorescencia a 370/440 y 335/378 nm, la absorbancia a 280 nm y el contenido en pentosidina y proteínas específicas. La columna se calibra previamente con IgA (180 kDa), albúmina bovina (66 kDa) y vitamina B12 (1,3 kDa).



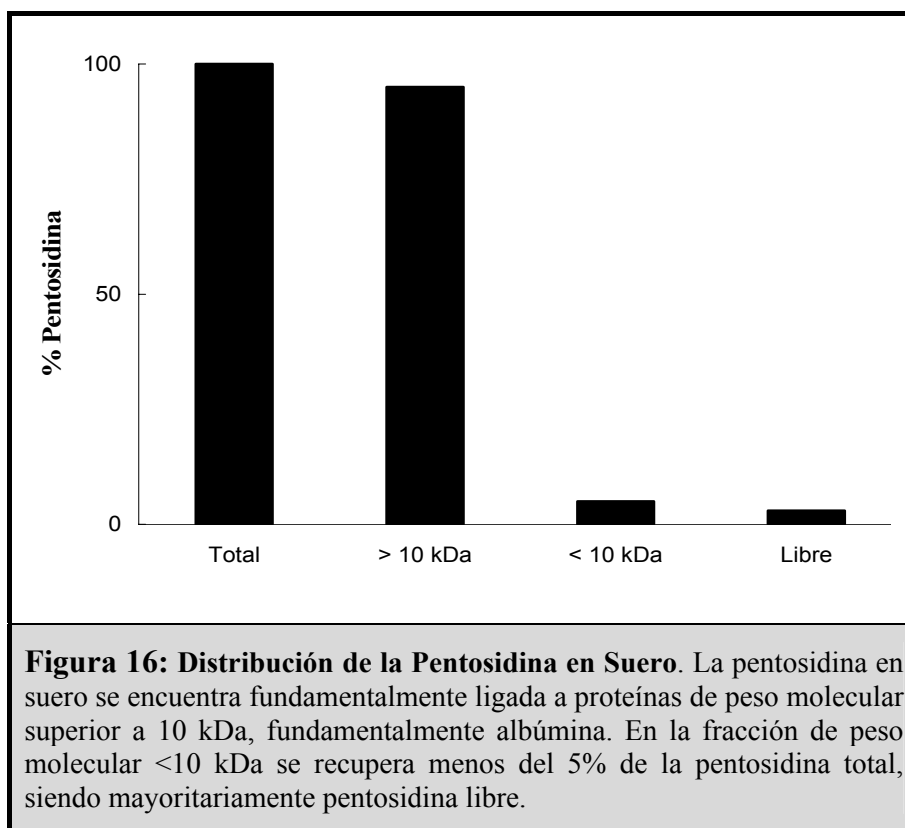
La Figura 14 representa un perfil típico de elución de las fracciones obtenidas a partir de esta columna. El registro de la fluorescencia a 335/378 nm permite detectar dos picos. El primero corresponde a proteínas de peso molecular sobre 66 kDa y el segundo a proteínas de peso molecular inferior a 3000 D, que son los péptidos de peso molecular inferior al rango efectivo de separación de la columna, en cuya fracción se encuentra también la pentosidina

libre. Similarmente, la fluorescencia a 370/440 nm, típica de los compuestos de Maillard, permite la detección de dos picos. Probablemente, la fluorescencia del pico < 3000 Da se deba a fluorescencia de fondo inespecífica debida a pequeños péptidos y otros materiales fluorescentes. Al determinar la pentosidina y a absorbancia a 280 nm en cada una de las fracciones eluidas (Figura 15), sólo se detecta entre la fracción 6 a 12 y la 25 y 26. Utilizando anticuerpos monoclonales para distintas proteínas, sólo detectamos albúmina en las fracciones 6-12, mientras que en las fracciones 25-26 no se ha podido identificar ningún péptido, aunque probablemente sea en su mayoría pentosidina libre.



En todos los grupos estudiados, la mayor parte de la pentosidina se encuentra ligada a las proteínas tal como puede observarse en la Tabla 5, y sólo una pequeña fracción se encuentra libre en plasma, lo que contrasta con la distribución de los AGEs inmunorreactivos .

En resumen, puede decirse que en todos los casos estudiados, la pentosidina mayoritariamente se encuentra ligada a proteínas de peso molecular superior a 10 kDa y menos del 5% restante aparece en una fracción de peso molecular inferior a 10 kDa, siendo esta última casi toda pentosidina libre. En la Figura 16 se muestra la distribución típica de pentosidina en suero.



Los AGEs séricos medidos por inmunoensayos AGE-específicos se concentran mayoritariamente en una fracción de bajo peso molecular (2.000 a 6.000 D), que se denomina LMW-AGEs (AGEs de bajo peso molecular) y que pueden aislarse secuencialmente por ultrafiltración y filtración en gel (52). Estos péptidos muestran una elevada fluorescencia de Maillard (370/440 nm) y una alta reactividad frente al colágeno y otras proteínas. La retención de estos péptidos debido a una función renal disminuida o alterada, particularmente en la diabetes mellitus, podría favorecer su toxicidad intrínseca y podrían

contribuir a la formación de las típicas secuelas de la glicación. Se ha visto como la administración intravenosa a ratas de péptidos que llevan asociados AGEs da lugar al desarrollo de lesiones similares a las observadas en la diabetes, tanto a nivel vascular como a nivel renal (99)

La pentosidina es un producto final de glicación, es decir, incapaz de reaccionar en su forma libre para formar nuevos puentes intermoleculares, tal como muestran nuestros resultados al añadir pentosidina libre al suero, lo que es una clara diferencia en relación a los AGEs inmunorreactivos. Nuestros resultados muestran que la mayor parte de la pentosidina se encuentra ligada preferentemente a proteínas de elevado peso molecular (fracciones 6-12). En estas fracciones, la única proteína plasmática identificada a través de inmunoensayos específicos es la albúmina, no detectándose otras proteínas séricas, como las inmunoglobulinas (IgG, IgA, IgM), factores de complemento (C3c, C4), proteínas de fase aguda (ceruloplasmina, antitripsina, haptoglobina) transferrina y lipoproteínas. Todas estas globulinas plasmáticas eluyen a tiempos diferentes de la albúmina, algunas incluso con el frente del disolvente. Por otra parte, hemos detectado una relación directa entre el contenido de albúmina y el de pentosidina en las diferentes fracciones obtenidas. Estos resultados indican que la pentosidina sérica se encuentra mayoritariamente asociada a la albúmina. Una pequeña proporción (aproximadamente el 5%) se encuentra ligada a otras proteínas no identificadas, y el resto, 2-3% se encuentra en forma libre.

Es discutible el origen de la pentosidina libre presente en el plasma, sin embargo, existen distintas proteínas tisulares y plasmáticas que contienen cantidades significativas de pentosidina, las cuales al ser catabolizadas podrían dar lugar a pentosidina libre.

La pentosidina libre se acumula especialmente en el plasma de pacientes con insuficiencia renal, en particular, en los sometidos a HD. Una de las causas de esta acumulación en estos pacientes podría ser la alteración de los mecanismos de filtración glomerular. Los elevados niveles circulantes serían el resultado de un equilibrio entre los factores que favorecen la aparición de pentosidina libre, (catabolismo de proteínas), y de los factores que disminuyen su filtración glomerular.

De forma similar, las elevadas concentraciones de LMW-AGEs en la enfermedad renal crónica no se normalizan por medio de la hemodiálisis convencional y sólo se logra reducir su concentración aproximadamente al 50% durante una sesión; sin embargo, las concentraciones retornan a valores previos al tratamiento al cabo de unas 3 horas. Además, los LMW-AGEs se mantienen en valores normales en pacientes con trasplante renal funcional. Esto sugiere que aparte de los AGEs que se forman a partir de la glucosa u otros monosacáridos, existe otra fuente de biomoléculas patogénicas, la que se forma los LMW-AGEs circulantes. Presumiblemente, estos productos se originarían por degradación de las proteínas tisulares, y si estos AGEs no se eliminan inmediatamente de la circulación por el riñón, acaban produciendo daño tisular (52). Nuestros resultados indican que los niveles de pentosidina libre se ven influenciados por el tipo de diálisis. La fracción libre se reduce un 80% durante una sesión de HD, y aunque la pentosidina libre supone menos del 5% de la pentosidina total, la HD es el único mecanismo de eliminación en estos pacientes.

En los pacientes tratados con DPCA, el aclaramiento de la pentosidina se produce por difusión a través de la membrana peritoneal. La pentosidina es una molécula relativamente pequeña (379 D) que difunde a través de la membrana peritoneal hasta alcanzar el equilibrio entre el suero y el dializado, de esta forma, los niveles plasmáticos son inferiores en pacientes tratados con

DPCA que en los tratados con HD. Sin embargo, la DPCA produce un aclaramiento importante de proteínas de elevado peso molecular que difunden a través de la membrana, de tal forma, que el aclaramiento de pentosidina se produce tanto en su forma libre como en la ligada.

La filtración en gel de suero procedente de pacientes tratados con HD nos muestra que la pentosidina se encuentra tanto en forma libre como unida a albúmina. El patrón de distribución es claramente diferente al de los AGEs inmunorreactivos, descritos por Makita et al (52). Estos autores demuestran que la mayoría de estos compuestos se concentran en una fracción de peso molecular comprendida entre 2000 y 6000 Da., aproximadamente dos tercios de estos AGEs se encuentran en la fracción de $PM < 10$ kDa, tanto en el grupo control como en los no diabéticos y esta proporción se incrementa en las muestras de pacientes urémicos. Los AGEs encontrados en suero son fragmentos originados por el catabolismo de las proteínas tisulares, que se eliminan posteriormente por el riñón sano, sin embargo la disminución de la función renal conduce a su acumulación en los pacientes urémicos. Estas observaciones, junto con el hallazgo de que individuos diabéticos con función renal normal no se diferencian de los individuos control hizo suponer que, la disminución de la filtración glomerular tiene un gran impacto en la acumulación de AGEs en suero, mayor incluso que el propio incremento debido a la síntesis. Una vez que los AGEs empiezan a acumularse, su reactividad frente a las proteínas de la matriz podría continuar dañando al glomérulo, con lo que se iría acentuando el proceso de destrucción de la función renal.

Nuestros resultados indican que la distribución de la pentosidina en suero es claramente distinta de los AGEs inmunorreactivos, y un incremento de la concentración circulante de pentosidina responde mas a una mayor síntesis que a una menor eliminación. La pentosidina unida a la albúmina no se filtra a

través de la membrana basal del riñón, por lo cual una disminución de su filtración glomerular no causará un incremento en la pentosidina unida a albúmina. Es probable que además de la glucosa, otras sustancias que se acumulan en los pacientes con uremia, puedan servir como precursores para la formación de pentosidina ligada a la albúmina, o bien que ciertos catalizadores del proceso de glicosidación puedan acelerar el proceso de formación de estos productos, incluso en ausencia de concentraciones elevadas de glucosa, como sucede en algunos pacientes urémicos, independiente de si son o no diabéticos.

En resumen, nuestros resultados muestran que mayoritariamente la pentosidina se encuentra ligada covalentemente a proteínas de elevado peso molecular y que la concentración de pentosidina libre es inferior al 5% de la total. Asimismo, hemos identificado a la albúmina como la proteína sérica sobre la que se acumula la pentosidina.

4.1.3 Valores normales de pentosidina en suero y orina

En 146 sujetos normales (55 hombres y 91 mujeres) de la misma área geográfica que los pacientes estudiados, se valoró la pentosidina sérica y aleatoriamente en 40 la pentosidina en orina. Los pacientes normales se sometieron previamente a un examen médico para descartar cualquier patología que pudiese afectar a la interpretación de los resultados. En la Tabla 6 se muestran los resultados obtenidos para estas determinaciones, así como para un perfil analítico que incluye proteínas totales, albúmina, glucosa, urea, creatinina y fructosamina.

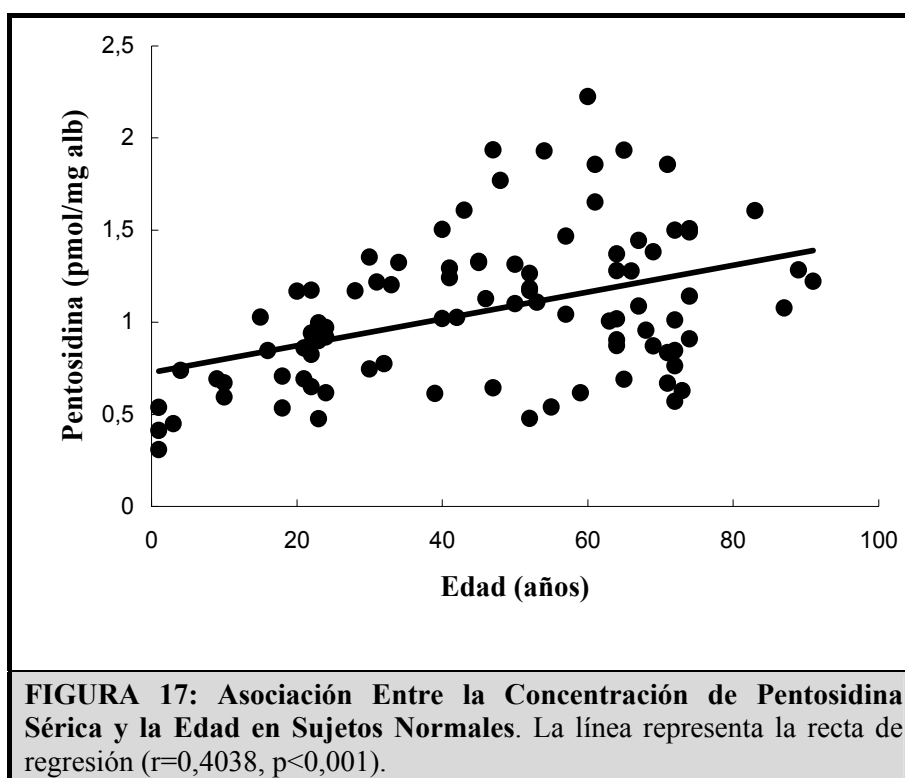
TABLA 6: Pentosidina y Otros Parámetros Bioquímicos en Sujetos Normales			
Constituyente	N	Media	Rango
Proteínas (g/dl)	146	7,3	6,2-8,6
Albúmina (g/dl)	146	4,5	3,5-5,6
Glucosa (mg/dl)	146	91	80-104
Urea (mg/dl)	146	34	5-40
Creatinina (mg/dl)	146	0,9	0,6-1,3
Fructosamina (mmol/l)	76	258	177-310
Pentosidina (pmol/ml)	146	44	21-75
Pentosidina (pmol/mg albúmina)	146	1,00	0,30-1,80

Pentosidina sérica

La concentración de pentosidina sérica fue de 44 ± 13 pmol/ml, (21-75 pmol/ml). Cuando se expresa en función de la albúmina los resultados son de $1,00 \pm 0,31$ pmol/mg albúmina (0,30-1,80 pmol/mg alb). La separación de las muestras entre hombre y mujeres (Tabla 7) no muestra diferencias estadísticamente significativas ($p=0,227$)

TABLA 7: Pentosidina Sérica en Pacientes Normales		
Sexo	N	Pentosidina (pmol/mg alb)
Hombres	55	$1,1 \pm 0,49$
Mujeres	91	$0,99 \pm 0,35$

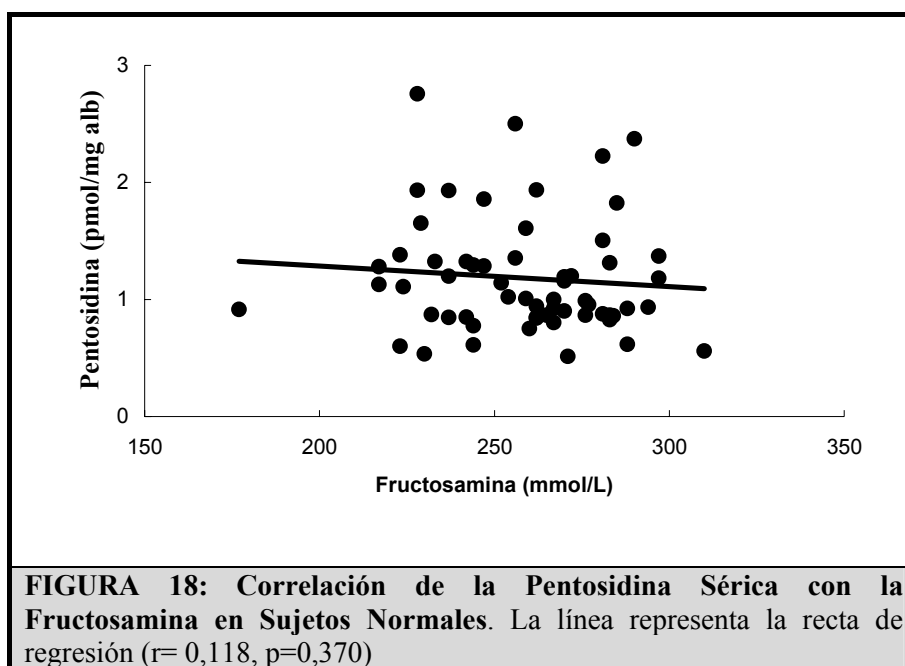
Datos expresados como media \pm SD



En la Figura 17, se muestra la existencia de una correlación estadísticamente significativa entre la pentosidina sérica y la edad ($r= 0.4038$, $p=0.0008$).

Para valorar en el grupo control si los productos de glicación avanzada se asocian con los de glicación precoz, se determinó paralelamente como marcador de glicación precoz los niveles de fructosamina, no encontrándose una correlación significativa entre ambas variables ($r=-0,118$; $p=0,370$).

Aunque el rango la creatinina en suero es muy estrecho en este grupo control, no existe correlación entre la pentosidina sérica y la creatinina: $r=0,102$; $p=0,270$). Asimismo, no se encontró asociación entre la pentosidina y otros parámetros bioquímicos estudiados, como la glucosa y la urea.



El análisis de regresión múltiple muestra que de las variables estudiadas, únicamente la edad tiene alguna influencia en la concentración de pentosidina plasmática.

TABLA 8: Variables que Afectan a la Concentración de Pentosidina Sérica		
Variable	Coefficiente de regresión estándar	p
Edad (años)	0,0060	0,0410
Fructosamina (mmol/l)	-0,0004	0,9090
Glucosa (mg/dl)	0,0108	0,1749
Urea (mg/dl)	0,0030	0,9671
Creatinina (mg/dl)	0,1471	0,7583

R=0,417, p=0,171. Análisis de regresión múltiple.

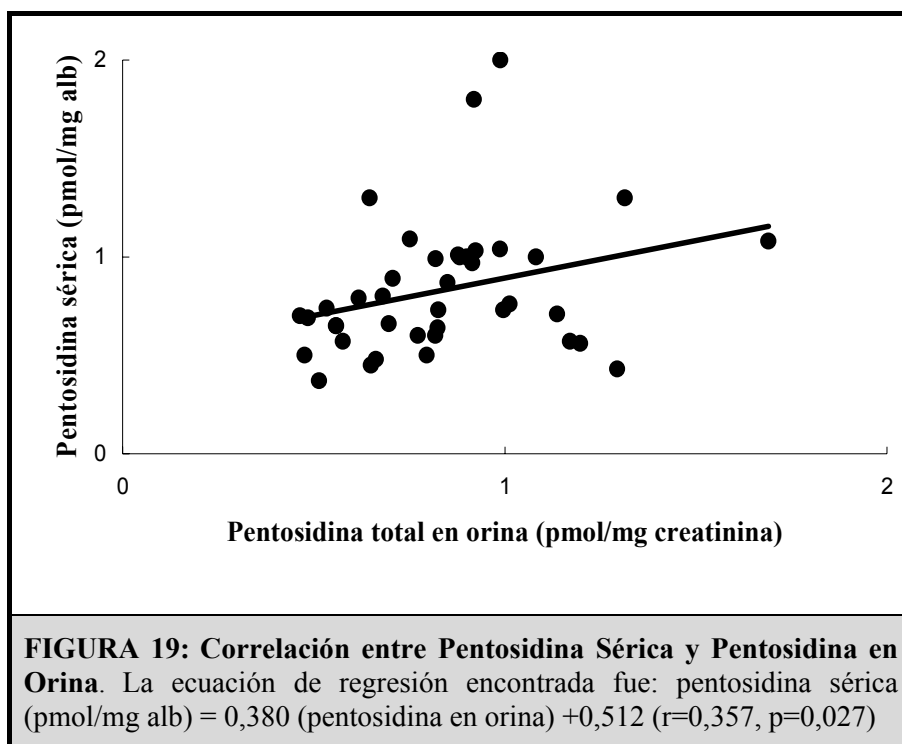
Pentosidina en orina

Después de hidrolizar las muestras con HCl 6N, se determinó la pentosidina total en orina, así como su fracción libre, que se valoró directamente, después de añadir TCA a las muestras de orina.

TABLA 9: Concentración de Pentosidina en Orina			
Pentosidina	N	Media	Rango
Total (pmol/ml)	40	13,1	5,1-49
Libre (pmol/ml)	40	7	2-23

En la Tabla 9 se muestran los resultados obtenidos en 40 muestras de sujetos control, la diuresis (ml/12 horas) en estas muestras tuvo un valor medio de 660 ml (100-1850).

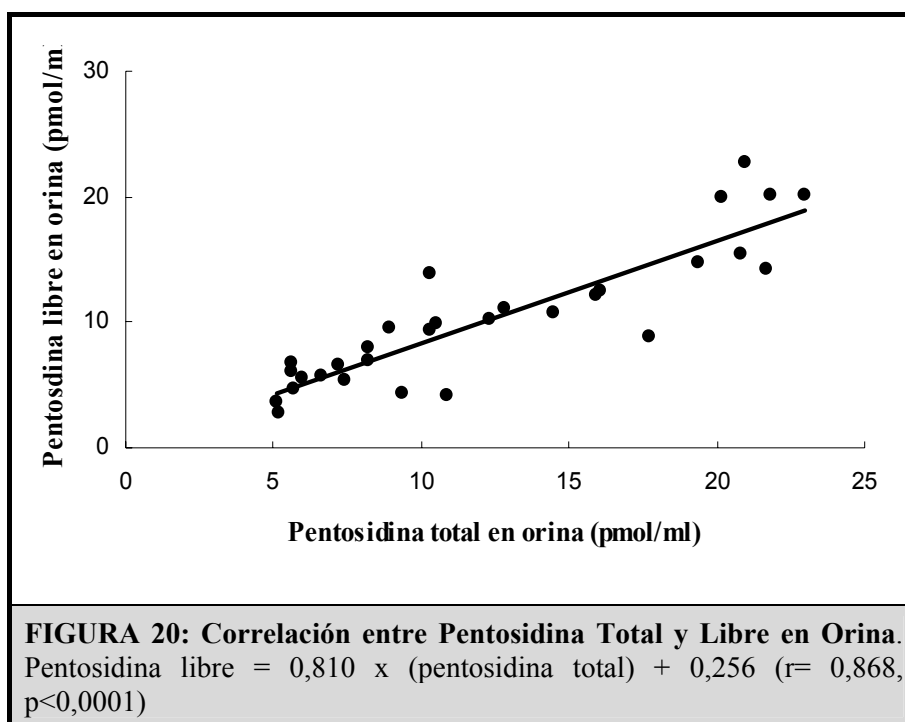
Existe una baja correlación, pero estadísticamente significativa, entre la pentosidina en suero y en orina ($r=0,357$, $p=0,027$). Los resultados muestran que la mayoría de la pentosidina que se encuentra en la orina ($83\pm 10\%$) es la forma libre, y existe una buena correlación entre la pentosidina libre y la pentosidina total ($r=0,868$, $p<0,0001$).



La pentosidina es lo suficientemente pequeña como para filtrarse a través de la membrana basal glomerular (PM 379), por lo cual se elimina del plasma a medida que se transforma en pentosidina libre o bien permanezca unida a péptidos lo suficientemente pequeños como para que puedan filtrarse por el glomérulo y de esta forma eliminarse en la orina.

Nuestros resultados indican que con el envejecimiento, la pentosidina aumenta en suero, lo que implica que su síntesis aumenta con la edad y que esta elevación no puede atribuirse a una mayor glucemia, ya que en el grupo control, todos los casos presentan una glucemia normal, incluidos los sujetos de más edad. Por otra parte, no se observa correlación entre la pentosidina y la glucemia; tampoco se observa con los productos de glicación temprana, valorados como fructosamina (Figura 18).

En orina se detecta la pentosidina tanto en su forma ligada como en la libre, si bien la fracción libre supone mas del 80% de la pentosidina total. En el grupo control la excreción de pentosidina es de aproximadamente 26 nmoles/día, es decir, unos 10 microgramos cada 24 horas. Puede asumirse que en este grupo control, la mayoría de la pentosidina detectada en orina, se origina a partir del catabolismo de la albúmina y el resto del catabolismo de otras proteínas estructurales como el colágeno. La correlación entre pentosidina total y libre en orina puede observarse en la Figura 20.



La formación de AGEs sobre las proteínas se interpreta como una señal química para marcar las proteínas viejas, y sirve como punto de reconocimiento para su renovación (100). Una acumulación excesiva de AGEs disminuye la susceptibilidad de las proteínas para su digestión enzimática. La rigidez progresiva en los tejidos ricos en colágeno tales como arterias, pulmones, articulaciones y matriz extracelular se ha asociado con

enfermedades propias del envejecimiento tales como arteriosclerosis, hipertensión, glomeruloesclerosis, enfisema, cataratas y demencia (101).

En nuestros resultados encontramos que la pentosidina sérica aumenta con la edad en los sujetos normales. Estos datos apoyan la teoría de que en general, los productos de glicación avanzada y en particular la pentosidina, se encuentran implicados en los procesos bioquímicos básicos del envejecimiento, ya que provocan cambios estructurales en los tejidos y alteran su función específica, además de inducir la muerte celular, activando la apoptosis (100)

En un estudio realizado (102) utilizando distintas especies animales con diferente esperanza de vida,(ratas, perros etc.) además de en humanos, se ha encontrado que la pentosidina del colágeno aumenta en todas ellas con la edad, si bien la velocidad es distinta para cada especie, y parece estar regulada por factores genéticos de cada especie, tales como la velocidad de recambio del colágeno y la habilidad para reparar los efectos de la glicoxidación debidas a la reacción de Maillard.

Aunque el recambio del colágeno es independiente del fenómeno de la glicoxidación, el entrecruzamiento entre fibras del colágeno puede alterar este recambio metabólico, debido a que el colágeno viejo o de pacientes diabéticos, que es rico en pentosidina, es menos susceptible a la digestión por colagenasas. De este modo, se tiene la paradoja de que una excesiva glicoxidación altera su recambio metabólico. Un segundo factor que puede controlar la velocidad de glicoxidación es la glucemia. Así, se propone que la glucosa podría ser un mediador en el envejecimiento de acuerdo con la observación de que complicaciones como la rigidez de las articulaciones y arterias, pérdida de masa ósea, formación de cataratas, arteriosclerosis y las enfermedades cardiovasculares empeoran drásticamente con la diabetes. Además, estas secuelas del envejecimiento así como la velocidad de glicoxidación serían dos

veces mas rápidas en pacientes con diabetes (2) por otra parte, la diabetes parece acelerar los procesos básicos del envejecimiento.

4.1.4 Trastornos del cuerpo vítreo

En muestras de humor vítreo de un total de 91 pacientes, obtenidas durante la vitrectomía pars plana de pacientes con retinopatía diabética proliferativa (PDR) o de pacientes no diabéticos con vitreoretinopatía (PVR) o desprendimiento de retina (RD). Como grupo control se utilizaron vítreos de cadáveres, extraídos en el momento de la autopsia a las 4-6 horas del fallecimiento.

Dada la naturaleza de las muestras de humor vítreo, la medida de las proteínas totales se ha realizado utilizando el método de Bradford modificado para la medida de proteínas en muestras ricas en colágeno (103).

TABLA 10: Concentraciones de Proteínas en los Vítreos Estudiados				
	N	Proteínas (mg/dl)		p[*]
		Mediana	IQR	
PDR	33	625	491-703	<0.0001
PVR	28	622	294-787	<0.0001
RD	12	602	151-849	0.0002
Control	18	78	62-120	

*Respecto al grupo control; IQR= rango intercuartilico; PDR = Retinopatía diabética proliferativa; PVR= Vitreoretinopatía; RD= Desprendimiento de retina.

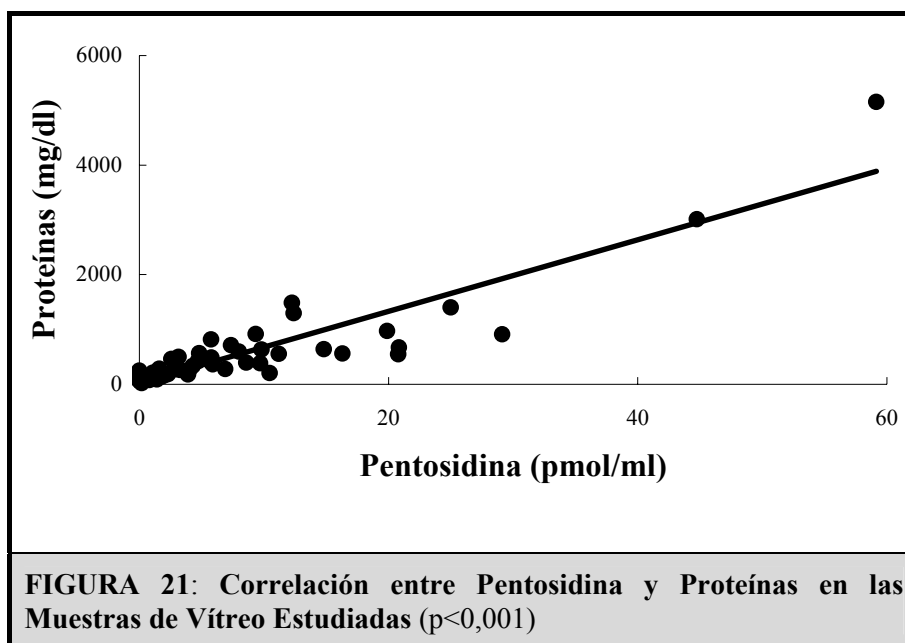
Las concentraciones de proteínas en los diferentes tipos de vítreos expresados en mg/dl se indican en la Tabla 10.

TABLA 11: Niveles de Pentosidina en los Vítreos Estudiados.						
	Pentosidina (pmol/ml)			Pentosidina (pmol/mg proteína)		
	Mediana	IQR	p*	Mediana	IQR	p*
PDR	5,40	3,16-7,90	<0.0001	0,92	0,55-1,26	0.8927
PVR	5,70	1,59-12,39	<0.0001	1,12	0,46-1,80	0.3784
RD	1,95	0-9,44	0.0747	1,02	0,24-1,44	0.2412
Control	0,81	0,20-1,50		0,97	0,68-1,30	

*Respecto al grupo control; IQR= rango intercuartilico; PDR = Retinopatía diabética proliferativa; PVR= Vitreoretinopatía; RD= Desprendimiento de retina.

La concentración de proteínas es significativamente más elevada en todos los grupos en relación al grupo control. Sin embargo, no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos estudiados.

Las concentraciones de pentosidina expresadas como pmol/ml o pmol/mg de proteína se muestran en la Tabla 11. Si la pentosidina, se expresa por ml de humor vítreo, se observan concentraciones muy elevadas en el grupo con PDR (5,40 pmol/ml), en el grupo con PVR (5,70 pmol/ml) y en el grupo con RD (1,95 pmol/ml), en relación al grupo control (0,81 pmol/ml) siendo los pacientes con desprendimiento de retina, los que presentan concentraciones menos elevadas. Sin embargo, cuando las concentraciones de pentosidina se expresan en pmol/mg de proteína, no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tipos de vítreos y los procedentes del grupo control. Asimismo no se observan diferencias entre los distintos grupos. Por otra parte, el nivel de pentosidina correlaciona significativamente con las proteínas del vítreo, tanto en el grupo de pacientes ($r=0,54$; $p<0.001$) como en el grupo control ($r=0,77$; $p<0.001$) (Figura 21).



Diferentes estudios han sugerido que los AGEs pueden jugar un papel importante en la patogénesis de la degeneración vítrea en los pacientes con diabetes. Concretamente, dos estudios previos (104, 105) han demostrado elevadas concentraciones de AGEs en vítreos de pacientes diabéticos comparado con los no diabéticos, si bien en el primero de los estudios citados, las concentraciones parecen ser mucho más elevadas que en el segundo estudio, probablemente debido al diferente método de estudio utilizado. En cualquier caso, el resultado de dichos estudios sugiere que los AGEs inmunorreactivos juegan un papel importante en la desestabilización, licuefacción prematura y posteriores complicaciones que ocurren en el vítreo de muchos de los pacientes diabéticos.

En este estudio, nosotros no hemos encontrado diferencias significativas en las concentraciones de AGEs, medidos como pentosidina, en el vítreo de pacientes diabéticos comparado con pacientes no diabéticos o con los vítreos controles. Si embargo, en los estudios previos mencionados, se han medido AGEs inmunorreactivos, en contraste con nuestro estudio donde se ha

medido exclusivamente pentosidina. Otra diferencia importante se refiere al grupo control; en los estudios previos el grupo control consistía en vítreos de pacientes sometidos a vitrectomía a causa de anomalías en el segmento posterior y en ausencia de enfermedad sistémica. En dichos estudios, el término control se puede utilizar únicamente en el sentido de que no eran diabéticos, pero no en un sentido estricto del término. En nuestro estudio hemos incluido como grupo control, vítreos provenientes de autopsias. Indudablemente, existe cierta incertidumbre acerca de si los valores medidos en el vítreo de cadáveres reflejan fielmente la concentración del vítreo en vivo, pero no existe alternativa mejor para usar como control, ya que humor vítreo de individuos sanos normalmente no está disponible. La misma incertidumbre o probablemente más existen cuando el grupo control está formado por vítreos con otras patologías.

Recientemente, Matsumoto et al (106) midieron la concentración de pentosidina en vítreo de pacientes diabéticos y la compararon con la concentración en el vítreo de pacientes no diabéticos sometidos a vitrectomía. Solamente encontraron una diferencia significativa con $p < 0.05$ cuando compararon ambos grupos. Al igual que en los estudios mencionados anteriormente, el grupo control consistía en vítreos de pacientes no diabéticos sometidos a vitrectomía. Adicionalmente, los resultados han sido expresados por unidad de volumen; es decir pmol de pentosidina/ml de vítreo. Se debe puntualizar que los AGEs son proteínas modificadas y por tanto van necesariamente ligados a proteínas, por lo que alteraciones en la concentración de proteínas debe acompañarse de cambios en la concentración de AGEs; esto es particularmente importante en las alteraciones de la barrera hematorretiniana, donde se produce un gran aumento de las proteínas del vítreo debido a la entrada de proteínas sanguíneas. En efecto, nuestro estudio muestra que los vítreos de pacientes con PDR o PVR presentan mayor concentración de proteínas que los vítreos del grupo control ($p < 0.0001$). De este modo, cuando

la concentración de pentosidina se expresa como pmol/ml de vítreo, los vítreos de pacientes con PVR o PDR muestran concentraciones de pentosidina significativamente más elevadas que el grupo control ($p < 0.0001$). Sin embargo, cuando los resultados se expresan como pmol de pentosidina/mg de proteína, no se encuentran diferencias significativas entre los vítreos de pacientes con o sin diabetes y los vítreos provenientes de cadáver. Estos resultados pueden reflejar simplemente la rotura de la barrera hematorretiniana, un componente común en la fisiopatología de la PDR, PVR y RD.

Estos resultados muestran que la concentración del producto de glicoxidación denominado pentosidina, expresado como pmol/mg de proteína en el vítreo de pacientes con PDR no son diferentes estadísticamente de los encontrados en pacientes con PVR, RD o los encontrados en un grupo control formado por cadáveres. Aunque algunos estudios han sugerido que los AGEs pueden tener un papel importante en la patogénesis de la retinopatía diabética proliferativa, se necesitan más investigaciones para conocer en detalle su verdadera relevancia en esta alteración multifactorial.

4.1.5 Otros fluidos biológicos: estrés oxidativo

Al objeto de valorar si la pentosidina es un marcador de estrés oxidativo, se ha estudiado la pentosidina, en distintos líquidos biológicos procedentes de efusiones pleurales, pericárdicas, peritoneales o articulares; paralelamente se midió la pentosidina en suero para valorar una posible asociación entre el medio interno y el foco inflamatorio.

En la Tabla 12 se muestran las concentraciones de pentosidina determinadas en distintos líquidos biológicos y en suero de 50 pacientes. Así como otros parámetros bioquímicos.

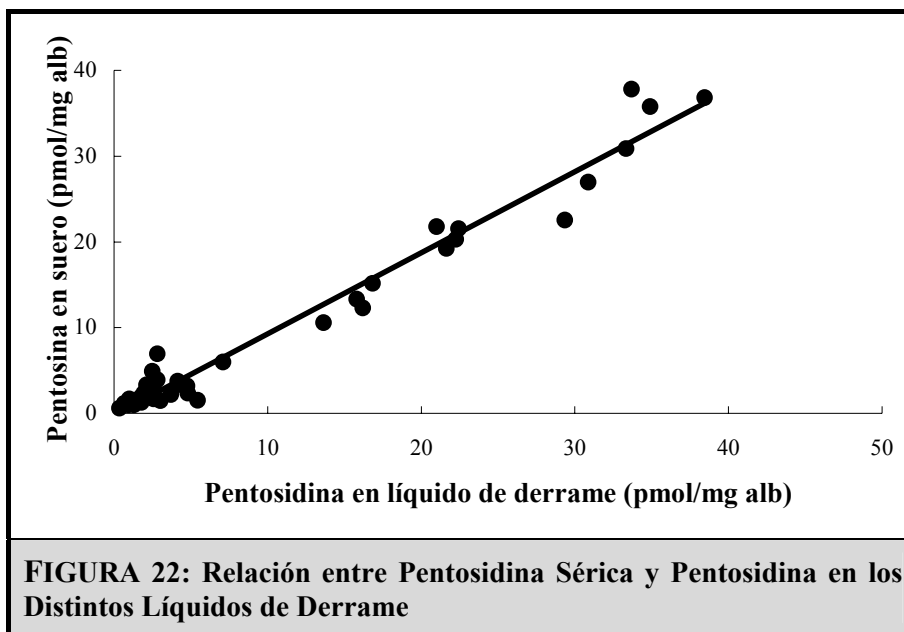
TABLA 12: Pentosidina en Suero y Líquidos Biológicos			
	Suero	Líquidos biológicos	p
Proteínas (g/dl)	6,2±1,1	2,5±0,6	<0,0001
Albúmina (g/dl)	3,2±0,9	1,4±0,4	<0,0001
Glucosa (mg/dl)	113±51	114±20	ns
Urea (mg/dl)	49±42	52±42	ns
Creatinina (mg/dl)	1,2±1,3	1,2±1,7	ns
Pentosidina (pmol/ml)	252±292	86±84	<0,0001
Pentosidina (pmol/mg alb)	7,9±9,1	7,6±8,4	ns

Datos expresados como media ± SD

Nuestros resultados muestran que las concentraciones de pentosidina son significativamente más elevadas en suero que en el líquido de derrame, cuando se expresan los resultados por unidad de volumen ($p < 0,0001$), sin embargo, cuando se expresan los datos en función del contenido de albúmina, las concentraciones de pentosidina en ambos fluidos son casi idénticas y no existen diferencias significativas entre ambos tipos de fluidos. En la Figura 22 se observa una correlación positiva entre la pentosidina en suero y en los líquidos de derrame.

El estrés oxidativo es un factor determinante para entender porque unos pacientes tienen concentraciones de pentosidina más elevadas que otros con similares características. Si el estrés oxidativo y los radicales de oxígeno juegan un papel importante en el daño tisular y en el desarrollo de inflamación,

cabe pensar que la pentosidina se encontrará localmente aumentada en los focos de inflamación, donde se producen los derrames.



Aunque los mecanismos son poco claros, la formación de pentosidina se relaciona directamente con los fenómenos oxidativos. Así la hiperglucemia crónica provoca acumulación de productos formados por la vía no enzimática, tales como la pentosidina; sin embargo, en la artritis reumatoide, las concentraciones de pentosidina se encuentran elevadas, aunque, la concentración de glucosa es normal. En los últimos años, se han estudiado los productos de glicación como fuente de radicales libres. Dado que la formación de pentosidina requiere condiciones aerobias, una de las posibles explicaciones para la formación de pentosidina podría estar en los radicales libres que se originan en el medio. De esta forma, la acumulación de productos como la pentosidina, podría no ser una causa directa de una hiperglicemia sostenida durante años, sino que podría deberse a la exposición a sucesivas oxidaciones inducidas por radicales libres. Este mecanismo podría explicar la elevada

concentración de pentosidina que se observa en pacientes con artritis reumatoide.

Uno de los posibles mecanismos para la formación de pentosidina en estos pacientes consistiría en que la inflamación y el consiguiente estrés oxidativo que existe en foros determinados de lugar a una acumulación de pentosidina y posterior difusión a otras partes del organismo. A la vista de nuestros resultados, esta hipótesis parece poco probable ya que las concentraciones de pentosidina son similares en el suero y en el líquido de derrame. Si el origen de la pentosidina fuese local, ello supondría que la concentración en el líquido fuese mayor que en suero, sin embargo, nuestros resultados indican lo contrario. Por tanto, el hecho de que la pentosidina sea prácticamente igual en suero y líquido de derrame, contradice la hipótesis de que el estrés oxidativo local sea el causante de la acumulación de pentosidina en el suero de los pacientes.

Los resultados de nuestro estudio muestran que los niveles de pentosidina en los distintos líquidos correlacionan de forma significativa con los observados en suero. Si bien, determinados compuestos en los derrames pueden mostrar actividad local, tales como parámetros de inflamación, de degradación etc., la pentosidina parece reflejar únicamente el estado general de oxidación, incluso es posible que las proteínas modificadas por la glicación penetren en el lugar de inflamación.

4.1.6 Diabetes Mellitus

Se estudiaron un total de 874 pacientes diabéticos, que se controlan regularmente en las consultas externas del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela y cuyos perfiles analíticos se realizan en el Laboratorio Central. En la Tabla 13. se muestran los parámetros bioquímicos estudiados.

TABLA 13: Parámetros Bioquímicos de los Pacientes Diabéticos Estudiados		
Parámetro	Tipo 1 (N=137)	Tipo 2 (N=737)
AER* (mg/24 h)		
Mediana	5,6	12,6
Rango	0,4-1403	1,1-4259
Creatinina (mg/dL)		
Media±SD	0,9±0,2	0,9±0,3
Rango	0,2-2,1	0,2-3,9
Aclaramiento Cr (ml/min)		
Media±SD	131±104	123±75
Rango	14-756	13-617
Glucosa (mg/dL)		
Media±SD	221±98	213±70
Rango	52-473	64-496
Fructosamina (mmol/L)		
Media±SD	455±79	421±85
Rango	258-680	235-795
Hemoglobina A1c (%)		
Media±SD	8,3±2,0	7,8±1,8
Rango	4,8-15,2	4,2-13,9
Pentosidina (pmol/mg albúmina)		
Media±SD	1,52±0,65	1,63±0,92
Rango	0,60-4,25	0,44-8,33

*AER= Tasa de excreción de albúmina (*Albumin Excretion Rate*)

La duración de la diabetes oscila entre pacientes recién diagnosticados y con más de 40 años de evolución. La muestra estudiada se compone de 737 pacientes con diabetes tipo 2 (391 mujeres y 346 hombres) y 137 pacientes con diabetes tipo 1 (63 mujeres y 74 hombres), diagnosticados de acuerdo con los criterios de la U. S. National Diabetes Data Group (107).

4.1.6.1 Niveles de pentosidina plasmática

En relación con el grupo control (Tabla.6), los diabéticos presentan concentraciones plasmáticas más elevadas de pentosidina. Las diferencias son significativas tanto para diabéticos de tipo 1 ($p < 0,01$) como de tipo 2 ($p < 0,01$).

TABLA 14: Concentraciones de Pentosidina por Sexo en los Pacientes Diabéticos		
Sexo	Pentosidina (pmol/mg de albúmina)	
	Tipo 1	Tipo 2
Hombres	1,56±0,71* (n=74)	1,61±0,83** (n=346)
Mujeres	1,46±0,56 (n=63)	1,70±1,10 (n=390)

* $p=0,393$ y ** $p=0,189$, respecto al grupo respectivo de mujeres

El solapamiento de valores de pentosidina entre el grupo normal y los pacientes diabéticos es elevado; únicamente un 35% de los diabéticos presenta niveles circulantes de pentosidina superiores al límite superior normal. No existen diferencias significativas entre los pacientes diabéticos de tipo 1 y los de tipo 2. ($p > 0,05$). En ambos tipos de diabetes, tampoco se observan diferencias según el sexo de los pacientes. (Tabla 14)

En el grupo con diabetes tipo 1 (Tabla 15), la pentosidina plasmática correlaciona con la edad ($r=0,335$, $p<0,001$), fructosamina ($r=0,269$, $p=0,001$), hemoglobina glicosilada ($r=0,302$, $p<0,001$), creatinina sérica ($r=0,197$, $p=0,021$) y con la duración de la diabetes ($r=0,410$, $p<0,001$). En los pacientes diabéticos tipo 2, la pentosidina plasmática se asocia significativamente con la edad, ($r=0,197$, $p<0,001$), creatinina ($r=0,127$, $p<0,001$) y con la duración de la diabetes ($r=0,127$, $p<0,001$). Sin embargo, no se detecta correlación con los productos de glicación temprana: hemoglobina glicosilada ($r=0,031$, $p=0,396$) y fructosamina ($r=0,066$, $p=0,074$).

TABLA 15: Asociación de la Pentosidina Plasmática con Diferentes Variables en Pacientes Diabéticos.

Variable	Tipo 1		Tipo 2	
	r	p	r	p
Edad	0,335	<0.001	0,197	<0.001
Fructosamina	0,269	0.001	0,066	0.074
AER	0,196	0.096	0,210	0.187
Creatinina	0,197	0.021	0,127	<0.001
Aclaramiento Cr	0,143	0.121	0,165	0.243
Glucosa	0,087	0.345	0.265	0.389
Hemoglobina A1c	0,302	<0.001	0,031	0.396
Duración	0,410	<0.001	0,127	<0.001

Tabla 16: Parámetros que Afectan a la Concentración de Pentosidina Plasmática.						
Variable	Todos los pacientes		Creat. ≤ 1 mg/dl		Creat. > 1mg/dl	
	Coefic. de regresión estándar	p	Coefic. de regresión estándar	p	Coefic. de regresión estándar	p
Intersección	-0,177	0,691	0,137	0,778	-1,666	0,351
Edad (años)	0,016	<0,001	0,015	<0,001	0,032	0,033
Duración diabetes (años)	0,012	0,048	0,007	0,242	0,028	0,108
BMI (kg/m2)	-0,008	0,368	-0,007	0,453	-0,009	0,796
Hemoglobina A1c	0,055	0,113	0,036	0,282	0,097	0,423
Creatinina (mg/dl)	0,757	<0,001	0,361	0,244	1,301	0,005
Glucosa (mg/dl)	-0,001	0,281	-0,001	0,508	-0,002	0,283
Fructosamina (mmol/l)	0,005	0,937	0,041	0,529	-0,129	0,577
Albuminuria (µg/min)	-0,198	0,159	-0,097	0,372	-0,096	0,617

Resultados del análisis multivariado para comprobar las variables que afectan a la pentosidina sérica. Los pacientes se han clasificado en dos categorías: función renal normal (creatinina ≤1 mg/dl) o función renal alterada (creatinina > 1 mg/dl)

Mediante análisis multivariado se ha realizado el estudio de las diferentes variables que puedan afectar a la concentración de pentosidina sérica (Tabla 16). Los resultados muestran que de todas las variables estudiadas, solamente la edad y la creatinina afectan a la concentración de pentosidina en suero. Resalta especialmente el hecho de que ni la hemoglobina glicosilada ni la fructosamina, dos parámetros de reconocida utilidad para valorar el control

glucémico parecen tener efecto sobre los niveles circulantes de pentosidina; lo mismo ocurre con la duración de la diabetes y la albuminuria. Si sólo se consideran los pacientes con función renal normal (creatinina ≤ 1 mg/dl), el único parámetro de los estudiados que afecta significativamente a la concentración de pentosidina plasmática es la edad ($p=0,032$). En el grupo de pacientes con creatininas superiores a 1 mg/dl los factores que afectan a la pentosidina sérica son la edad ($p=0,033$) y la creatinina ($p=0,005$)

TABLA 17 Efecto de la Edad sobre las Concentraciones de Pentosidina en Suero y Orina en Pacientes con Diabetes de Tipo 2*.				
Edad (años)	Pentosidina (pmol/mg albúmina)		Pentosidina (pmol/mol creatinina)	
	Suero	p**	Orina	p**
<55	1,43±0,66 (0,52-,08)		1,42±0,69 (0,23-4,20)	
55-64	1,55±0,83 (0,42-,45)	1,000	1,65±0,83 (0,16-6,70)	0,352
65-74	1,74±1,05 (0,23-,51)	0,027	1,93±1,38 (0,20-13,1)	<0,001
>74	2,13±1,41 (0,76-0,7)	<0,001	2,21±1,28 (0,23-7,46)	<0,001

* Valores expresados como medias \pm SD (rango)

**La comparación es con el grupo de pacientes de menos de 55 años

En la Tabla 17 se muestra el efecto de la edad sobre la concentración de pentosidina en el grupo de pacientes con diabetes de tipo 2, observándose como de forma similar a los sujetos normales, la concentración de pentosidina sérica se incrementa significativamente con la edad.

4.1.6.2 Complicaciones de la diabetes

En los pacientes con diabetes de tipo 1 y con complicaciones crónicas, los niveles de pentosidina plasmática fueron ligeramente superiores a los observados en pacientes sin complicaciones, sin embargo, las diferencias sólo fueron estadísticamente significativas en los subgrupos con hipertensión o macroangiopatía. (Tabla 18)

TABLA 18: Pentosidina Sérica y Complicaciones Crónicas en Diabetes de Tipo 1			
Complicación	N	Media±SD	p*
Ninguna	47	1,42±0,61	---
Retinopatía	51	1,58±0,69	0,229
Neuropatía	44	1,69±0,76	0,061
Nefropatía	24	1,61±0,89	0,278
Retinopatía o neuropatía o nefropatía	77	1,48±0,52	1
Retinopatía y neuropatía y nefropatía	11	1,91±1,14	0,062
Macroangiopatía	8	2,35±1,13	0,001
Hipertensión	8	2,15±1,18	0,01

* Respecto al grupo de pacientes sin complicaciones

En los pacientes con diabetes de tipo 2, existen diferencias significativas entre los pacientes sin complicaciones y aquellos que si las presentan. En todos los casos, los pacientes con complicaciones tienen valores de pentosidina significativamente más elevados que el grupo sin complicaciones. Las concentraciones más elevadas de pentosidina se presentan en los pacientes con retinopatía (p=0,006) o macroangiopatía (p=0,006), seguidos de los existentes en los subgrupos con hipertensión (p=0,011) y

nefropatía (p=0,029). La presencia de las tres complicaciones microangiopáticas no supone la existencia de mayores niveles plasmáticos de pentosidina. (Tabla 19)

TABLA 19: Pentosidina Sérica y Complicaciones Crónicas en Diabetes de Tipo 2			
Complicación	N	Media±SD	p*
Ninguna	68	1,44±0,66	----
Retinopatía	255	1,84±1,13	0,006
Neuropatía	206	1,76±1,10	0,025
Nefropatía	182	1,74±1,06	0,029
Retinopatía o neuropatía o nefropatía	357	1,74±1,08	0,081
Retinopatía y neuropatía y nefropatía	53	1,82±1,10	0,146
Macroangiopatía	219	1,81±1,10	0,006
Hipertensión	260	1,74±1,00	0,011

* Respecto al grupo de pacientes sin complicaciones

Es conocida la influencia de la función renal sobre los niveles plasmáticos de pentosidina, ya que se observa una correlación lineal positiva entre ambos parámetros. Para eliminar el efecto de la insuficiencia renal sobre las concentraciones plasmáticas de pentosidina, se realizó el estudio multivariado por medio del análisis de regresión logística para las distintas variables dependientes (retinopatía, neuropatía, nefropatía y enfermedad cardiovascular) en el grupo total de pacientes con diabetes de tipo 2 y en el subgrupo con función renal normal (creatinina \leq 1 mg/dl). En el subgrupo con nefropatía se incluyeron todos los pacientes. Estos cálculos no se realizaron en los pacientes con diabetes de tipo 1 ya que el tamaño de la muestra es mas

reducido, lo cual no permite una clasificación de acuerdo con las complicaciones crónicas.

TABLA 20: Predictores Significativos de Riesgo de Retinopatía en Pacientes con Diabetes de Tipo 2		
Variable	Riesgo Relativo (IC 95%)	p
<i>Todos los pacientes</i>		
Edad (años)	1,055 (1,015-1,095)	0,006
Glucosa (mg/dl)	1,006 (1,001-1,011)	0,027
Albuminuria ($\mu\text{g/hr}$)	2,767 (1,362-5,995)	0,006
Duración de diabetes (años)	1,086 (1,077-1,149)	0,004
<i>Creatinina ≤ 1 mg/dl</i>		
Glucosa (mg/dl)	1,007 (1,001-1,013)	0,016
Pentosidina (pmol/mg alb)	1,867 (1,128-3,091)	0,015
Duración de diabetes (años)	1,083 (1,023-1,149)	0,007

IC= intervalo de confianza

El análisis de regresión logística muestra que un aumento en la pentosidina sérica se relaciona significativamente con el desarrollo de la retinopatía diabética en pacientes de tipo 2 con función renal normal. Por cada pmol/mg de albúmina de aumento de la pentosidina sérica, el riesgo relativo de retinopatía fue de 1,87 (95% IC, 1,13 a 3,09) (Tabla 20)

Similarmente, la pentosidina sérica se relaciona significativamente con el desarrollo de neuropatía diabética en los pacientes diabéticos de tipo 2 con función renal normal. En este caso, cada pmol/mg de albúmina de aumento en la pentosidina sérica el riesgo relativo de neuropatía fue de 1,79 (95% IC, 1,02 a 3,12) (Tabla 21)

TABLA 21. Predictores Significativos de Riesgo de Neuropatía en Pacientes con Diabetes de Tipo 2		
Variable	Riesgo Relativo (IC 95%)	p
<i>Todos los pacientes</i>		
Edad (años)	1,060 (1,02-1,101)	0,002
Hemoglobina A1c (%)	1,314 (1,057-1,633)	0,014
Albuminuria ($\mu\text{g/hr}$)	3,222 (1,501-6,920)	0,003
<i>Creatinina ≤ 1 mg/dl</i>		
Edad (años)	1,049 (1,007-1,092)	0,021
Hemoglobina A1c	1,273 (1,002-1,616)	0,048
Albuminuria ($\mu\text{g/hr}$)	3,380 (1,319-8,661)	0,011
Pentosidina (pmol/mg alb)	1,789 (1,024-3,124)	0,041

IC= intervalo de confianza

En el conjunto total de pacientes diabéticos de tipo 2, la pentosidina se asocia significativamente con el desarrollo de nefropatía diabética. Cada pmol/mg de albúmina de aumento de la pentosidina sérica supone un riesgo relativo de nefropatía de 1,34 (95% IC, 1,1 a 1,65) (Tabla 22)

TABLA 22: Predictores Significativos de Riesgo de Nefropatía en Pacientes con Diabetes de tipo 2		
Variable	Riesgo Relativo (IC 95%)	p
<i>Todos los pacientes</i>		
Edad (años)	1,081 (1,051-1,109)	<0,001
Albuminuria ($\mu\text{g/hr}$)	1,088 (1,038-1,114)	<0,001
Pentosidina (pmol/mg alb)	1,343 (1,095-1,648)	0,005
Sexo (Hombre)	6,856 (3,971-11,84)	<0,001

IC= intervalo de confianza

Mediante análisis de regresión logística, se observa como la pentosidina sérica es un predictor significativo para el desarrollo de hipertensión en pacientes con diabetes de tipo 2 y con función renal normal. Por cada pmol/mg de albúmina de aumento de la pentosidina sérica el riesgo relativo de hipertensión fue de 1,31 (95% IC, 1,036 a 1,667) (Tabla 23) no siendo significativo en el grupo total.

TABLA 23 Predictores Significativos de Riesgo de Hipertensión en Pacientes con Diabetes de Tipo 2		
Variable	Riesgo Relativo (IC 95%)	p
<i>Todos los pacientes</i>		
Índice de masa corporal (kg/m ²)	1,166 (1,115-1,219)	<0,001
Creatinina (mg/dl)	2,412 (1,129-5,1539)	0,023
Edad (años)	1,044 (1,023-1,065)	<0,001
Glucosa (mg/dl)	1,004 (1,001-1,008)	0,021
Hemoglobina A1c (%)	0,864 (0,751-0,994)	0,041
Albuminuria (µg/hr)	1,049 (1,001-1,099)	0,026
<i>Creatinina ≤1 mg/dl</i>		
Índice de masa corporal (kg/m ²)	1,203 (1,143-1,265)	<0,001
Edad (años)	1,034 (1,011-1,058)	0,004
Pentosidina (pmol/mg alb)	1,314 (1,036-1,667)	0,024

IC= intervalo de confianza

Al contrario de lo observado con las complicaciones microvasculares e hipertensión, los niveles elevados de pentosidina sérica no implican un mayor riesgo de padecer complicaciones cardiovasculares, a pesar de que los pacientes que presentan macroangiopatía tienen valores de pentosidina significativamente mas elevados que aquellos sin complicaciones (Tabla 24).

Estos resultados muestran que los pacientes diabéticos, tanto los de tipo 1 como los de tipo 2, tienen niveles circulantes de pentosidina más elevados que los sujetos control, sin embargo no se observan diferencias significativas en cuanto al tipo de diabetes o al sexo de los pacientes. En definitiva, los niveles de pentosidina circulante se ve afectada por el control glucémico, además de la edad y la función renal.

En los pacientes diabéticos de tipo 2, el incremento de pentosidina en suero parece estar influenciado principalmente por la función renal y por la edad de los pacientes así como por la duración de la enfermedad, tal como muestra el análisis univariado. A diferencia de los pacientes diabéticos de tipo 1, no se observa asociación entre la concentración de pentosidina y el control glucémico. Aunque estas correlaciones son estadísticamente significativas tanto en la diabetes tipo 1 como en la tipo 2, sólo explican una pequeña fracción de la varianza total, por lo que debe de haber otros factores desconocidos responsables de la acumulación de pentosidina en estos pacientes. Se demuestra además que aunque niveles elevados de glucosa contribuyen indudablemente a la elevación de los productos de glicación avanzada en los pacientes diabéticos, no son el único determinante de esta elevación especialmente en los diabéticos de tipo 2.

Para los pacientes con diabetes de tipo 2, análisis de regresión múltiple identifica la edad y la función renal como determinantes independientes en aquellos pacientes con función renal alterada (creatinina >1 mg/dl.), mientras que en los pacientes con función renal normal (creatinina ≤ 1 mg/dl.) la concentración de pentosidina sólo se ve afectada por la edad de los pacientes. Estas observaciones implican que los niveles de pentosidina plasmática en los pacientes diabéticos de tipo 2 vienen determinados principalmente por la edad y por la función renal y parecen independientes del control glucémico.

TABLA 24. Predictores Significativos de Riesgo de Desarrollo de Cardiopatía Isquémica en Pacientes con Diabetes de Tipo 2		
Variable	Riesgo Relativo (IC 95%)	p
<i>Todos los pacientes</i>		
Índice de masa corporal (kg/m ²)	1,083 (1,024-1,145)	0,006
Edad (años)	1,053 (1,027-1,079)	<0,001
Sexo (Hombre)	1,979 (1,242-3,154)	0,004
<i>Creatinina ≤1 mg/dl</i>		
Índice de masa corporal (kg/m ²)	1,091 (1,024-1,161)	0,007
Creatinina (mg/dl)	18,818 (2,273-155,8)	0,007
Edad (años)	1,062 (1,031-1,094)	<0,001

IC= intervalo de confianza

El efecto tan marcado de la función renal y de la edad (Tabla 16) en la concentración de pentosidina es poco probable que sea debido únicamente a un aclaramiento renal inadecuado, ya que la pentosidina plasmática se encuentra casi exclusivamente ligada a la albúmina, además similarmente a lo que se observa en los pacientes normales, la pentosidina en orina se correlaciona con la pentosidina sérica, lo que implica que la acumulación en suero no es achacable directamente a la posible disminución de la filtración glomerular que se produce con el envejecimiento. Parece más probable que se deba a que en el suero se acumulen catalizadores o precursores de la formación de pentosidina, lo que acelera el proceso de glicación no enzimática sobre las proteínas del plasma. La formación de pentosidina parece ligada no solo a los procesos de glicación, sino también a los de oxidación; la presencia de oxígeno es necesaria para la formación de pentosidina in vitro, de ahí su clasificación como producto de glicoxidación (21). En los pacientes diabéticos hay una producción aumentada de radicales libres secundaria a la oxidación de substratos (azúcares, grasas insaturadas y proteínas glicadas), autooxidación de la glucosa

así como a una deficiencia en defensas antioxidantes (8). Las implicaciones biológicas de la formación de productos de glicoxidación se han visto ampliadas por la observación experimental de que estos aductos se pueden formar en los lugares de inflamación en situaciones de normogluemia (108). Todo esto justifica un incremento de AGEs, incluyendo pentosidina en los pacientes diabéticos.

Nuestros resultados muestran que en los pacientes con diabetes de tipo 1 la concentración de pentosidina es más elevada en aquellos pacientes que presentan complicaciones microvasculares cuando se comparan con los que no presentan complicaciones, sin embargo no se observan diferencias significativas entre los grupos, excepto en el caso de la hipertensión y la macroangiopatía (ver Tabla 18). Sin embargo, en el grupo de pacientes con diabetes de tipo 2, la concentración de pentosidina sérica es más elevada ($p < 0,05$) en los pacientes con complicaciones microvasculares, macroangiopatía o hipertensión comparado con aquellos pacientes sin complicaciones. En los de tipo 2, el análisis de regresión logística muestra que la concentración de pentosidina sérica se asocia con riesgo de padecer complicaciones diabéticas microvasculares: nefropatía, retinopatía y neuropatía (Tablas 20, 21 y 22)

La función renal es determinante para la concentración de pentosidina ya que regula la concentración circulante de estos compuestos. El riñón es además un órgano diana para el daño inducido por los AGEs. Estudios en animales demuestran claramente el papel patogénico de los AGEs y el RAGE en la nefropatía diabética. Los animales diabéticos poseen cantidades elevadas de AGEs en el tejido renal y esa anomalía ha sido ligada a diversos aspectos estructurales de la nefropatía diabética, incluyendo el engrosamiento de las membranas basales, expansión mesangial, glomerulosclerosis y fibrosis tubulointersticial (109). En la retinopatía diabética se producen alteraciones morfológicas y funcionales en los capilares de la retina; aumento de la

permeabilidad para la albúmina y macromoléculas, disfunción vascular, pérdida de pericitos y engrosamiento de las membranas basales. Estas alteraciones conducen al edema ocular y una progresiva oclusión de los capilares. Distintos AGEs han sido localizados en los vasos sanguíneos de la retina de pacientes diabéticos tipo 2 cuya concentración se correlaciona con el grado de retinopatía (110, 111).

La neuropatía diabética es una complicación que implica tanto el sistema nervioso periférico como el autónomo. La formación de AGEs ha sido postulada como un candidato importante a la hora de explicar la causa de la neuropatía periférica (112). Los AGEs se hallan elevados en el suero y en los nervios periféricos de los pacientes diabéticos. Las proteínas estructurales y funcionales de esos nervios se encuentran también glicadas dando como resultado la alteración de la conducción nerviosa y otras alteraciones patológicas características. Adicionalmente, las interacciones entre los AGEs y sus receptores inducen efectos biológicos en los tejidos diana para las complicaciones diabéticas, incluyendo el tejido nervioso (112).

Nosotros hemos encontrado una correlación positiva entre la pentosidina y la presencia de hipertensión en aquellos pacientes diabéticos de tipo 2. La hiperglucemia induce un estado vascular inflamatorio, que promueve la formación de AGEs y aumento en la expresión endotelial de IL-6, VCAM-1 y MCP-1 (113). La biodisponibilidad del NO se reduce en la hiperglicemia y los AGEs juegan un papel importante en ese proceso, ya que el tratamiento con aminoguanidina, un inhibidor de AGEs previene la depleción de NO y mantiene la función endotelial (114).

Finalmente, en nuestro estudio, los pacientes con cardiopatía isquémica presentan concentraciones de pentosidina sérica mas elevada que aquellos pacientes diabéticos sin complicaciones, sin embargo, según nuestros

resultados, en los pacientes diabéticos de tipo 2, niveles elevados de pentosidina no implican un mayor riesgo de padecer complicaciones cardiovasculares. La relación entre la cardiopatía isquémica y las elevadas concentraciones de pentosidina pueden ser explicadas por la estrecha relación entre la pentosidina y los procesos oxidativos ya que el LDL oxidado está implicado en la aterogénesis. El LDL oxidado ejerce un efecto aterogénico tanto *in vivo* como *in vitro* (115). De las lesiones producidas por la arteriosclerosis se han aislado lipoproteínas oxidadas. Además, productos de la oxidación de lípidos tales como el malonaldehído han sido detectados por técnicas inmunohistoquímicas en las lesiones producidas por la arteriosclerosis y finalmente, diferentes antioxidantes químicos retardan la formación de lesiones en animales hipercolesterolémicos (116).

Teniendo en cuenta que los pacientes diabéticos son muy propensos a las complicaciones vasculares, nuestras observaciones sugieren que la pentosidina plasmática podría ser un buen marcador de complicaciones tanto microvasculares como cardiovasculares en los pacientes diabéticos.

4.1.7 Artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico

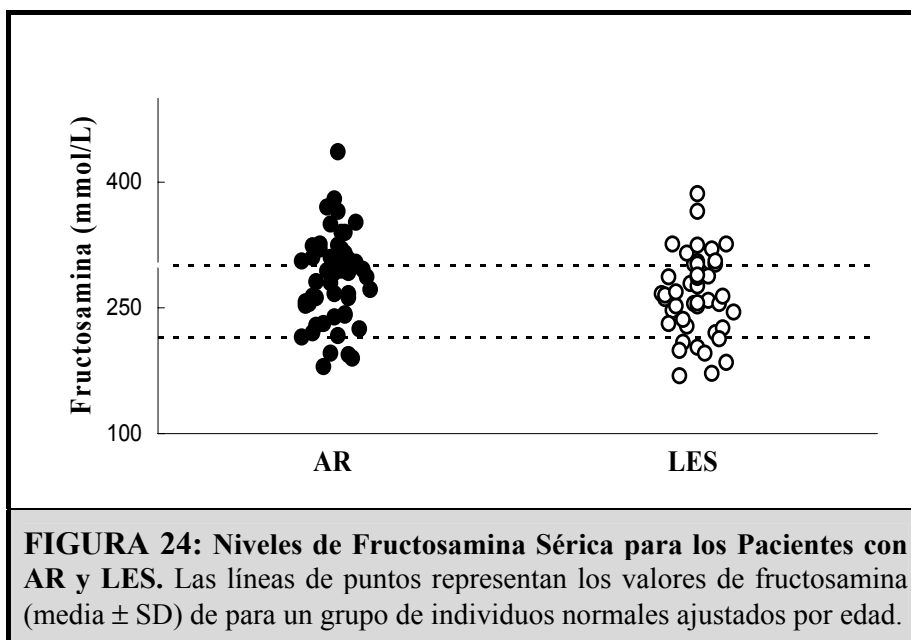
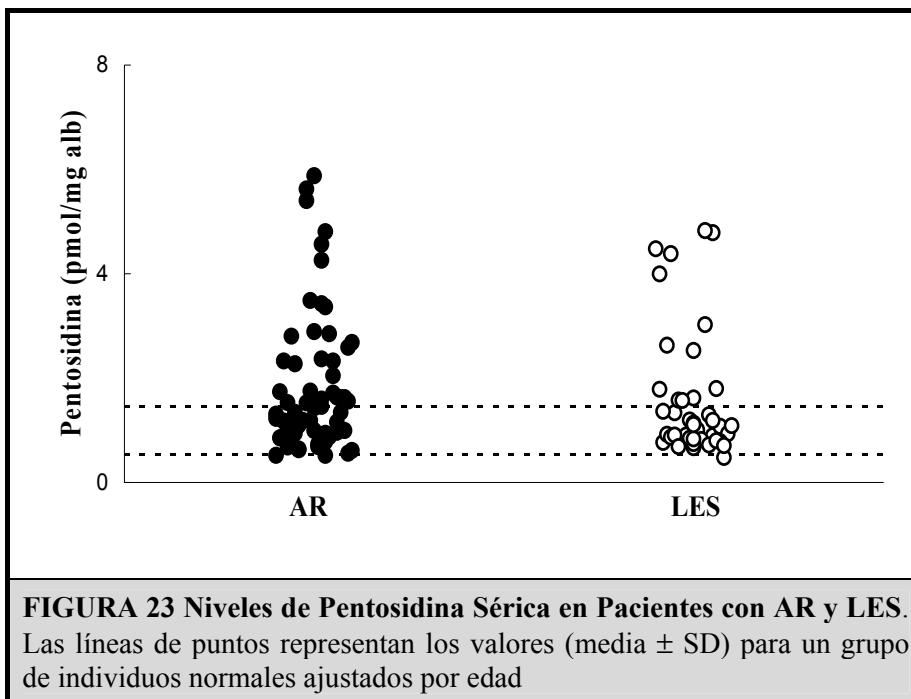
En la Tabla 25 se muestran las características bioquímicas generales de los pacientes con artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico.

	AR	LES	p
Proteínas totales (g/dl)	7,1±0,6	7,2±0,9	0,450
Albumina, (g/dl)	4,4±0,5	4,4±0,6	0,769
Glucosa (mg/dl)	97±15	86±12	0,128
Urea (mg/dl)	38±9	35±9	0,345
Creatinina (mg/dl)	0,9±0,1	0,9±0,2	0,435

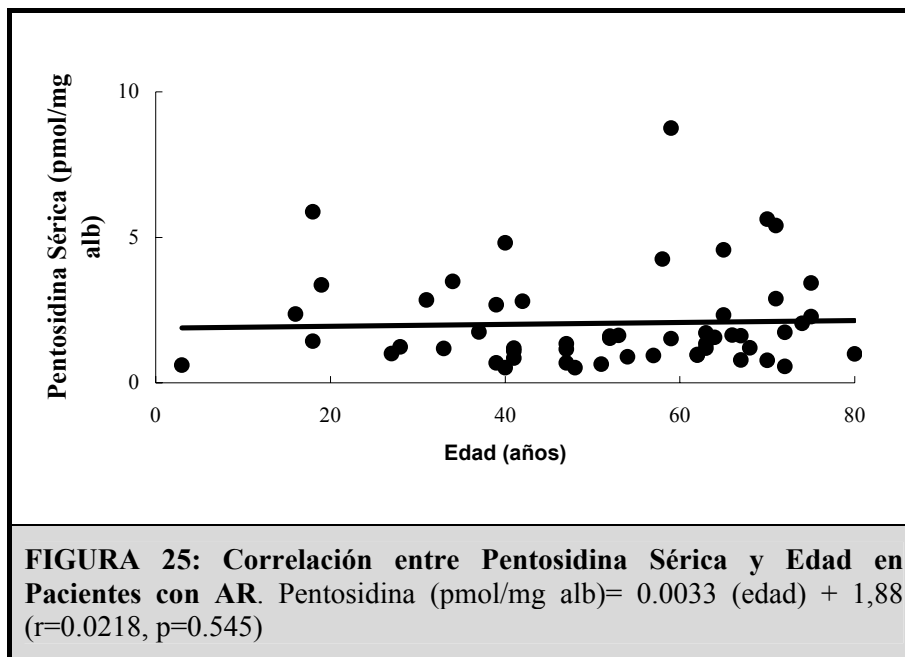
Los valores son medias ± SD

En general, los niveles de pentosidina sérica son significativamente superiores en pacientes con AR cuando se comparan con pacientes con lupus, diabetes o con sujetos control; sin embargo no existen diferencias en los valores de creatinina, edad, proteínas totales, y fructosamina (excepto para los pacientes diabéticos). Los valores para pentosidina fueron $2,22 \pm 2,62$ pmol/mg de albúmina para los pacientes con AR, y de $1,52 \pm 1,19$ pmol/mg de albúmina para los pacientes con LES. Sin embargo, en el grupo de pacientes con LES, estadísticamente no se encuentran diferencias significativas respecto al grupo control, aunque determinados pacientes presentan valores claramente patológicos. Es de destacar que tanto en la AR como en el LES no existe un aumento generalizado de la pentosidina, solamente un porcentaje de pacientes presenta valores elevados, mientras que la mayoría se encuentran agrupados presentando valores normales. (Figura 23). Esta distribución puede considerarse semejante a la observada en los pacientes diabéticos, donde

también se observa que la mayoría de los pacientes presentan valores similares a los normales.



En la Figura 24 se presentan los valores de fructosamina para las mismas muestras. La fructosamina es un producto de Amadori, y precursor reconocido de determinados productos de glicación avanzada. Los valores de fructosamina fueron: 258 ± 43 mmol/L para el grupo control ajustado por edades, 441 ± 82 mmol/L para los diabéticos, 278 ± 43 mmol/L para los pacientes con AR y 278 ± 47 mmol/l para los pacientes con LES. Este ligero incremento en los valores de fructosamina respecto al grupo control, no justifica las diferencias que se observan en los niveles de pentosidina, lo cual descarta en este tipo de patologías la glicación generalizada y los productos de Amadori como precursores de los AGEs. Otra causa posible de elevación de la pentosidina sería la insuficiencia renal, sin embargo, puede descartarse, ya que tal como se ve en la Tabla 25, ninguno de los grupos muestra alteraciones significativas en los niveles de urea y creatinina, consistente con una función renal normal. Finalmente, en la Figura 25 se muestra la ausencia de correlación entre pentosidina y la edad en el grupo de pacientes con AR.



Los radicales libres del oxígeno juegan un papel muy importante en las enfermedades agudas e inflamatorias. En los pacientes con enfermedades autoinmunes, existen anomalías compatibles con daño oxidativo. Actualmente existen datos tanto directos como indirectos que implican a las especies de oxígeno reactivo en la patogénesis de enfermedades inflamatorias, especialmente en la artritis reumatoide (AR) y lupus eritematoso sistémico (LES) (117). Dada la importancia de las reacciones oxidativas en la formación de pentosidina, hemos planteado la hipótesis de que podrían encontrarse niveles séricos elevados de pentosidina en pacientes con AR y en pacientes con Lupus, dos patologías que se presentan con un estrés oxidativo elevado. Los resultados de este estudio sugieren esta posibilidad.

En ausencia de hiperglucemia, la formación acelerada de pentosidina podría deberse a un incremento del estrés oxidativo. Ya que tanto el estrés oxidativo como los radicales libres juegan un importante papel en el daño tisular y en los procesos inflamatorios, y por otra parte, la formación de pentosidina se acelera por las condiciones oxidativas, es de suponer que la pentosidina aparezca implicada en los procesos de la AR y LES. En la AR podría existir un estado de estrés oxidativo, debido a la inflamación crónica, como sugieren el incremento de la peroxidación lipídica, el aumento del daño sobre el DNA medido como 8-oxo-7-hidro-desoxiguanosina y en general, el incremento de los marcadores de oxidación sobre proteínas, lípidos y DNA junto con una disminución de las defensas antioxidantes, lo que confirma el papel de estrés oxidativo en la patogénesis de la AR (118).

El LES, al igual que la AR presenta un origen autoinmune, y se asocia igualmente con una activación de los neutrófilos. Tanto la AR como el LES son enfermedades autoinmunes asociadas con un estrés oxidativo elevado. En la AR, el líquido sinovial de las articulaciones inflamadas contiene grandes cantidades de neutrófilos, muchos de los cuales están activados y producen O_2^-

y H_2O_2 que en presencia de metales se transforman en $OH\cdot$. El hipoclorito (HOCl) también se produce por los neutrófilos activados, por medio de la mieloperoxidasa, y es capaz de oxidar los aminoácidos libres a los correspondientes aldehídos (119). Recientemente se ha demostrado que el HOCl puede oxidar la serina a glicolaldehído, que en presencia de proteínas genera carboximetil-lisina (CML), otro producto de glicoxidación que se ha caracterizado estructuralmente (108). Reacciones similares iniciadas por hipoclorito, superóxido, o radicales hidroxilo, pueden conducir a la formación de especies reactivas como los compuestos dicarbonílicos, capaces de reaccionar con proteínas para formar pentosidina.

La presencia de concentraciones elevadas de pentosidina en suero, podría indicar que las moléculas precursoras generadas en las reacciones oxidativas difunden desde los lugares de inflamación hacia la circulación, lo cual podría llevar a un incremento generalizado de pentosidina tisular. El LES, al igual que la AR tiene un origen autoinmune, y se asocia igualmente con una mayor activación de los neutrófilos. Estudios recientes demuestran que los anticuerpos anti-cardiolipina, frecuentemente presentes en el LES, se dirigen frente a epitopos que se forman durante la peroxidación lipídica en presencia de proteínas (120). En este sentido, se ha visto que la CML, otro producto de glicoxidación, se forma durante la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados en presencia de proteínas (27). Probablemente este proceso implique la formación de compuestos carbonílicos muy reactivos, de cadena corta, como por ejemplo el glioxal. Se podría esperar que en las enfermedades autoinmunes un incremento del estrés oxidativo genere compuestos carbonílicos altamente reactivos que se unirían a los grupos amino libres de las proteínas, generando pentosidina, CML y otras estructuras todavía no identificadas y algunas de ellas podrían ser inmunogénicas y conducir a la formación de auto-anticuerpos.

La presencia de concentraciones elevadas de pentosidina en patologías distintas a la diabetes o a la insuficiencia renal pone en entredicho el papel patogénico atribuido a los AGEs. En las lesiones derivadas de las complicaciones diabéticas como las vasculares o la retinopatía, están implicados los AGEs; la enfermedad renal conduce a alteraciones similares a las vistas en la diabetes y es en donde los AGEs están en concentraciones más elevadas. Sin embargo, la AR no presenta complicaciones similares a las de la diabetes y es poco probable que los AGEs participen en las manifestaciones patológicas de la enfermedad. En este caso, los AGEs parecen más bien un efecto de la enfermedad originado por la inflamación y el proceso oxidativo, y no su causa. Si tal como se ha supuesto, los AGEs circulantes causan complicaciones por el hecho de que reaccionan con las proteínas tisulares o bien por que se unen a receptores específicos en las células endoteliales y macrófagos, contribuyendo así de forma directa al desarrollo de la microangiopatía y enfermedad macrovascular, deberían producir efectos similares en la AR. Una explicación poco probable es que la pentosidina estaría aumentada en determinadas condiciones sin aumento de los AGEs inmunorreactivos, sin embargo, esto puede descartarse a tenor de lo que se observa en la diabetes, enfermedad renal terminal o en los experimentos llevados a cabo in vitro.

En pacientes con AR los niveles de pentosidina sérica son superiores a los del grupo control, e incluso al grupo de pacientes hiperglucémicos de edades similares. No está claro el mecanismo por el cual se incrementa el nivel de pentosidina en los pacientes con AR. La acumulación de AGEs, incluyendo pentosidina se altera en la diabetes como consecuencia de la hiperglucemia sostenida; sin embargo en la AR o en el LES, los niveles de glucemia son normales, por lo que otro factor o factores deben catalizar la formación de pentosidina. La formación de pentosidina no solo se liga a los procesos de glicación, sino también a los oxidativos, de ahí que se denomine producto de

glicoxidación. Wolff et al (18) han demostrado que los azúcares reductores pueden autooxidarse en presencia de cationes metálicos generando H_2O_2 , especies de oxígeno reactivo y cetoaldehidos que contribuyen a las alteraciones en el color y la fluorescencia de las proteínas características de la formación de AGEs. Baynes (8) ha demostrado que la oxidación es un proceso esencial en la formación de pentosidina. La evidencia experimental de lo anteriormente expuesto consiste en que cuando no está presente el oxígeno no se forma pentosidina en las incubaciones que se realizan *in vitro*, lo que sugiere que el estrés oxidativo asociado a la AR contribuye a la generación de AGEs incluyendo pentosidina.

Aunque posteriormente se ha descrito una cierta correlación entre la pentosidina y marcadores de inflamación tales como proteína C reactiva, factor reumatoide, velocidad de sedimentación globular así como con algunas citoquinas proinflamatorias (121), la pentosidina plasmática viene a ser un marcador del estrés oxidativo a más largo plazo, ya que al estar unida a la albúmina, su concentración plasmáticas dependen del recambio de albúmina, por lo que la pentosidina plasmática a diferencia de los reactantes de fase aguda, puede ser más útil como marcador de inflamación crónica. El distinto grado de actividad de la AR en este grupo de pacientes puede interpretarse en función del amplio intervalo de la desviación estándar para los niveles de pentosidina. En la AR, la concentración de pentosidina plasmática no correlaciona con la duración de la enfermedad en AR. Ya que los pacientes con AR tienen distintos períodos de actividad dentro del proceso patológico, la duración de la enfermedad no tiene porque asociarse con la actividad en un momento determinado. Por tanto, los niveles de pentosidina son significativamente más altos en el suero de pacientes con de AR y podría considerarse como un marcador de inflamación crónica.

En resumen, la presencia de concentraciones elevadas de pentosidina en AR y en determinados pacientes con LES, indica que este compuesto no es un simple marcador de glicoxidación en diabetes, sino que puede utilizarse como un marcador general de estrés oxidativo en diferentes patologías. En cualquier caso, el estudio de la pentosidina y otros AGEs en enfermedades diferentes de la diabetes podría aportar información valiosa sobre la validez de la hipótesis de Maillard y las complicaciones diabéticas.

4.1.8 Insuficiencia renal

En la siguiente Tabla 26 se muestran los niveles de pentosidina y otros parámetros bioquímicos, en pacientes con insuficiencia renal.

TABLA 26: Parámetros Bioquímicos de los Pacientes con Insuficiencia Renal			
	IRC (N=70)	DPCA (N=32)	HD (N=44)
Glucosa (mg/dl)	123±50 (72-317)	112±53 (51-270)	146±102 (62-509)
Urea (mg/dl)	107±60 (19-269)	136±43 (45-224)	180±56 (84-379)
Creatinina (mg/dl)	3,34±1,70 (1,4-8,2)	6,7±2,6 (1,2-11,5)	9,1±2,5 (4,2-14,1)
Proteínas totales (g/dl)	7,0±0,8 (4,9-8,6)	6,1±1,0 (3,7-7,8)	6,6±0,6 (5,4-7,7)
Albúmina (g/dl)	4,4±0,6 (2-6,1)	3,7±0,7 (2,2-4,9)	3,9±0,6 (2,4-5,0)
Pentosidina (pmol/ml)	160±120 (39-820)	319±236 (87-1209)	722±330 (283-1679)
Pentosidina (pmol/mg alb)	2,8±2,1 (0,51-9,44)	9,6±9,8 (2,24-54,9)	18,7±9,54 (6,9-48,96)

Datos expresados como media±SD; rango ()

Por una parte los pacientes con IR crónica a tratamiento conservador (IRC) y por otra pacientes con IR aguda, unos a tratamiento con diálisis peritoneal ambulatoria (DPCA) y otros con hemodiálisis convencional (HD).

4.1.8.1 Insuficiencia renal crónica a tratamiento conservador

En la Tabla 27 se muestran los parámetros bioquímicos de los 70 pacientes con IRC, diferenciados por la presencia o ausencia de diabetes mellitus. El 88% de los diabéticos y el 75% de los no-diabéticos eran hipertensos.

TABLA 27: Parámetros Bioquímicos de los Pacientes con Insuficiencia Renal a Tratamiento Conservador.			
	Diabéticos	No Diabéticos	p
	(N=25)	(N=45)	
Proteínas (g/dl)	7,3±0,6	7,0±0,8	0,124
Albúmina (g/dl)	4,4±0,5	4,4±0,6	0,867
Glucosa (mg/dl)	153±60	98±10	<0,001
Urea (mg/dl)	131±47	124±56	0,682
Creatinina (mg/dl)	3,1±1,8	3,3±1,6	0,411
Edad (años)	65±11	57±16	0,019
Pentosidina (pmol/mg alb)	3,35±3,8	2,91±2,38	0,059

Datos expresados como media ± SD

Tomados como un solo grupo de pacientes, la pentosidina sérica en los pacientes con IRC, correlaciona con la urea ($r=0,657$; $p<0,0001$) y con la creatinina ($r=0,669$; $p<0,0001$; (Figura 27). Sin embargo, no hay correlación con la glucemia ($r=0,125$; $p=0,315$) ni con la edad de los pacientes ($r=0,017$; $p=0,894$) ni con la duración de la enfermedad renal ($r=0,244$; $p=0,073$; (Figura 28).

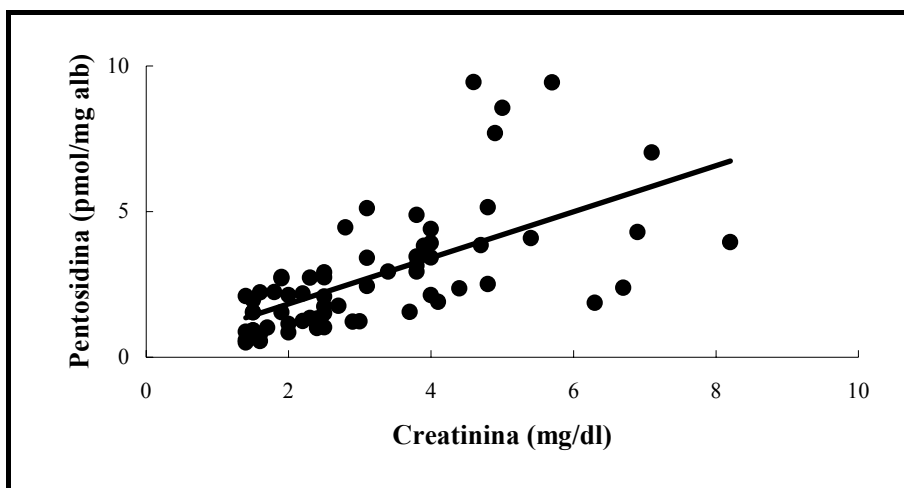


FIGURA 27: Relación entre Pentosidina Sérica y Creatinina en Pacientes con Insuficiencia Renal Leve. Pentosidina (pmol/mg alb)= 0,79 (creatinina) + 0,2581 (r=0,669, p<0,0001)

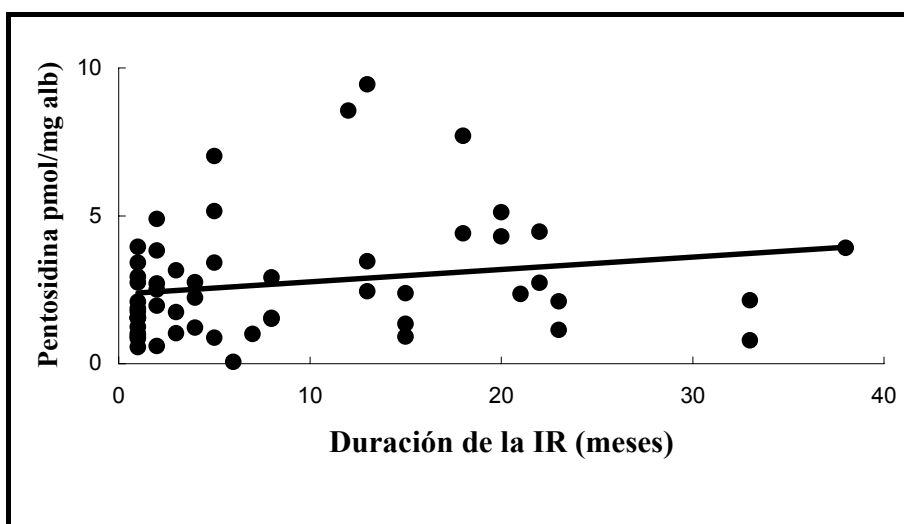
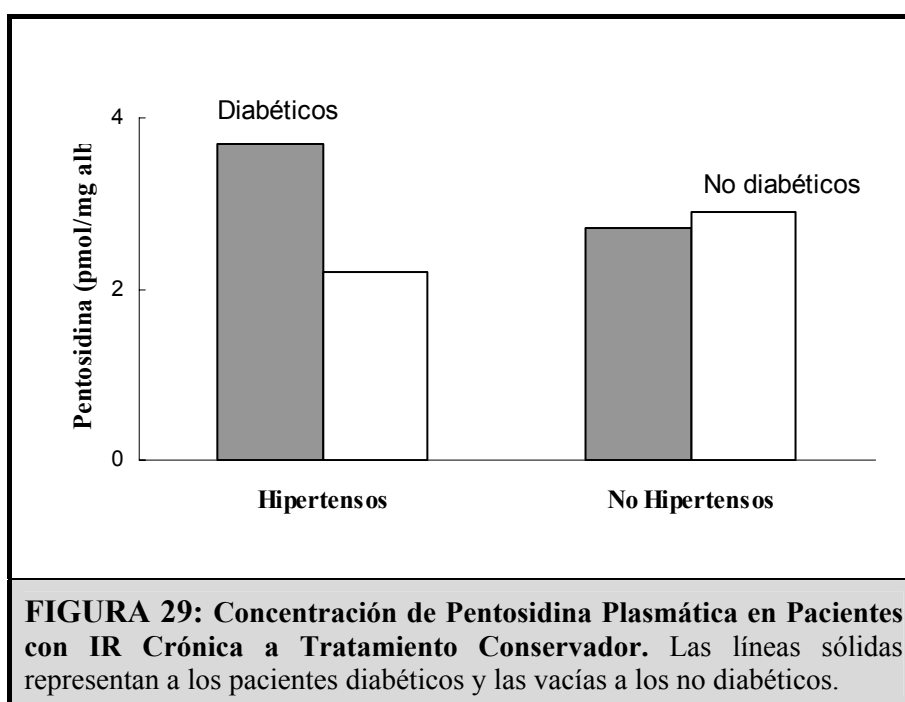


FIGURA 28: Relación entre Pentosidina Sérica y Duración de la Enfermedad Renal. Pentosidina (pmol/mg alb) = 0.0417 (duración enfermedad) + 2.349, (r=0.244, p=0,073)

El análisis mediante regresión múltiple muestra que la función renal es el principal factor que determina la concentración de pentosidina plasmática (Tabla.28).

TABLA 28: Factores que Afectan a la Pentosidina Plasmática en la IRC		
Variable	Coefficiente de regresión estándar	p
Edad (años)	0,009	0,626
Creatinina (mg/dl)	0,521	0,013
Glucosa (mg/dl)	0,111	0,051

Todas las demás variables incluyendo la glucosa, edad, hemoglobina glicosilada, fructosamina, duración de la enfermedad, etc. no influyen significativamente en las concentraciones de pentosidina plasmática.



Clasificados los pacientes de acuerdo a la presencia o no de diabetes y/o hipertensión, los pacientes diabéticos tienen concentraciones de pentosidina más elevada que los no diabéticos; $3,35 \pm 3,80$ vs. $2,91 \pm 2,38$ pmol/mg

albúmina; ($p=0,0592$), pero en cambio, los parámetros de control glucémico no se correlacionan con la pentosidina.

El subgrupo de hipertensos diabéticos es el que presenta los niveles de pentosidina más elevados $3,70\pm 2,68$ pmol/mg alb, pero no se observan diferencias significativas con ninguno de los otros subgrupos (Figura 29).

4.1.8.2 Diálisis peritoneal ambulatoria

TABLA 29: Características Clínicas y Bioquímicas de los Pacientes en DPCA			
	Diabéticos (N=12)	No Diabéticos (N=20)	P
Edad (años)	67±8	57±23	0,5970
Permanencia en diálisis (meses)	15±13	9±9	0,3951
Glucosa (mg/dl)	177±48	83±16	<0,0001
Urea (mg/dl)	147±51	132±35	0,5785
Creatinina (mg/dl)	7,1±2,6	6,8±2,8	0,7597
Pentosidina (pmol/ml)	396±343	307±182	0,4367
Pentosidina (pmol/mg albúmina)	12,1±15,2	8,2±4,6	0,8460

Datos expresados como media ± SD

En la Tabla 29 se muestran los resultados de los parámetros bioquímicos en suero de los 32 pacientes sometidos a DPCA, subdivididos en diabéticos y no-diabéticos.

Los niveles de pentosidina en orina y dializado en el grupo de pacientes en DPCA se representan en la Tabla 30. Las concentraciones de pentosidina plasmática expresadas tanto como pmol/ml o como por pmol/mg albúmina (Tabla 29) son significativamente más elevadas que en los pacientes normales, diabéticos o con insuficiencia renal leve ($p < 0,0001$).

TABLA 30: Parámetros Analíticos Medidos en Orina y Dializado de los Pacientes en DPCA		
Parámetro	Orina	Dializado
Volumen (ml)	820±690 (0-2450)	9200±2350 (6100-18400)
Urea (mg/dl)	757±240 (250-1300)	119±44 (31-208)
Creatinina (mg/dl)	80±49 (33-206)	4,6±1,6 (1,4-7,4)
Proteínas (mg/dl)	149±14 (11-365)	84±51 (16-210)
Albúmina (mg/dl)	70±66 (0,44-211)	37±19 (6,9-620)
Pentosidina total (pmol/ml)	53,3±60,3* (4,5-286)	6,7±4,2** (2,3-23,9)
Pentosidina libre (pmol/ml)	42,3±49,9 (4,5-208)	2,7±2,6 (0,7-14,4)

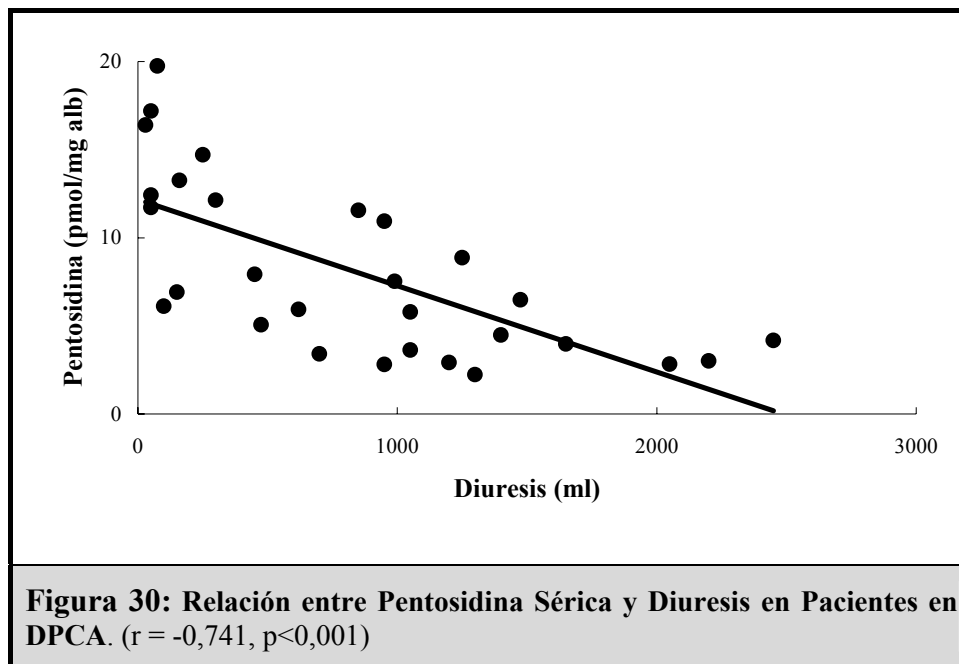
Datos expresados como media ± SD y (rango).

* $p = 0,1637$ entre pentosidina total y libre en orina

** $p < 0,0001$ entre pentosidina total y libre en dializado

La concentración de pentosidina en suero se correlaciona únicamente con la diuresis del paciente ($r = -0,741$, $p < 0,001$), (Figura 30) pero no con el tiempo de permanencia en DPCA, incluso después de excluir aquellos paciente

anúricos. Tampoco se observa correlación entre la pentosidina sérica con la edad ni con otros parámetros bioquímicos estudiados.



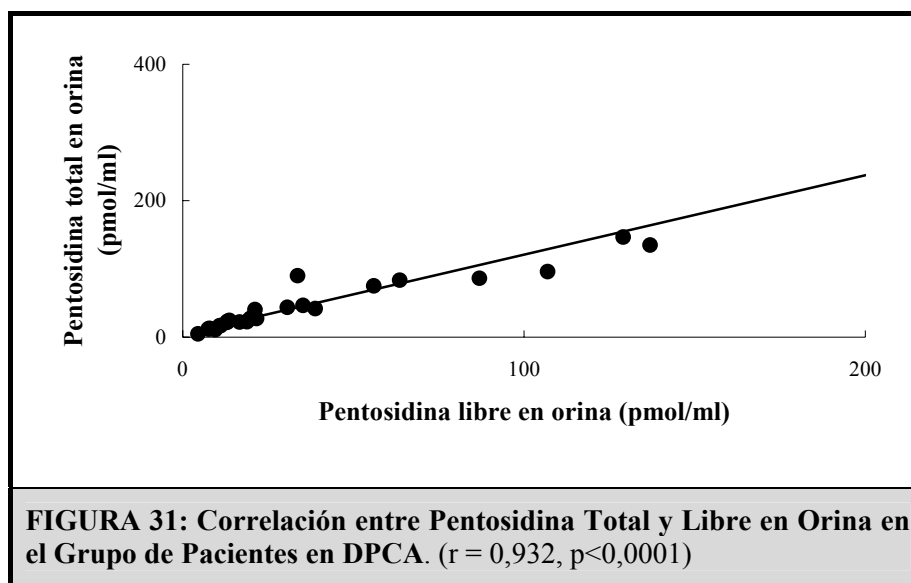
En la Tabla 31 se muestra el porcentaje de pentosidina libre en suero, orina y líquido de diálisis.

TABLA 31: Porcentaje de Pentosidina Libre en Pacientes en DPCA	
Fluido	Pentosidina libre (%)
Suero	3±1
Orina	76±15
Dializado	37±16

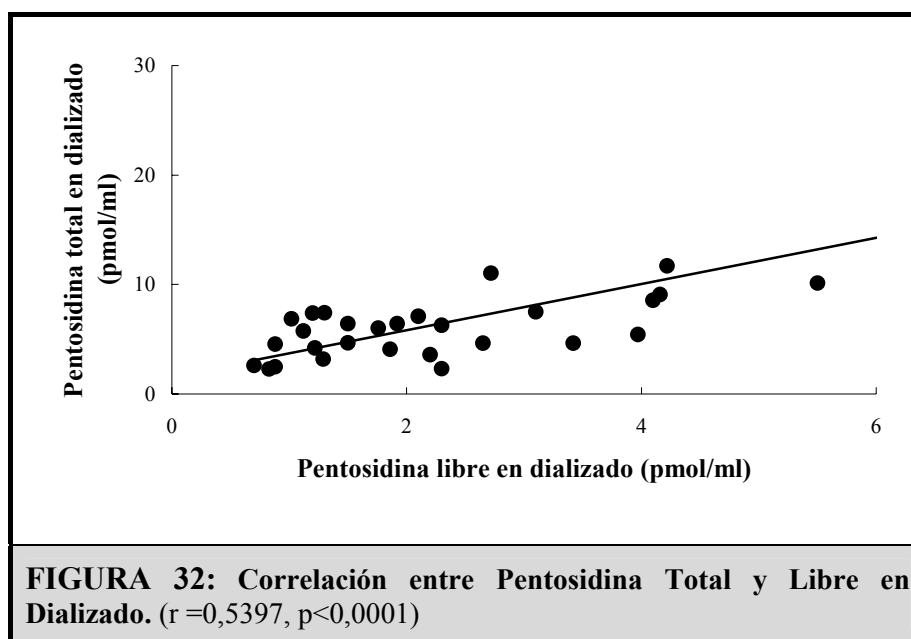
Datos expresados como media ± SD

En suero, el porcentaje de pentosidina libre, medida después de precipitar las proteínas con TCA, es aproximadamente el 3% de la pentosidina total para todos los pacientes, sin embargo, tanto en orina como en dializado, el

porcentaje de pentosidina libre varía considerablemente de unos pacientes a otros, si bien la mayoría de la pentosidina eliminada por orina está en forma libre $76 \pm 15 \%$ (52-100%), mientras que en dializado se elimina por difusión tanto en forma libre como ligada a proteínas; cuantitativamente es más importante la fracción ligada en casi todos los pacientes, la fracción libre en el dializado sólo representa el $37 \pm 16\%$ (15-73%).



La pentosidina libre presente en el plasma se correlaciona con la fracción libre medida en orina ($r=0,882$, $p=0,001$) y la ligada a proteínas en el plasma con la ligada a proteínas en el dializado ($r=0,587$, $p=0,01$). La pentosidina libre y ligada presente en orina correlaciona positivamente ($r=0,461$, $p=0,01$), al igual que la libre y ligada presente en el dializado ($r=0,537$, $p=<0,0001$).



En la Tabla 32 se muestran los aclaramientos (en ml/minuto) de distintos solutos, incluyendo la pentosidina, tanto en orina como en dializado en el grupo de pacientes estudiados.

TABLA 32 Aclaramientos (ml/minuto) en Orina y Dializado de Distintos Parámetros Bioquímicos		
	Orina	Dializado
Urea	3,2±1,77	5,4±1,15
Creatinina	6,8±3,32	4,3±0,86
Pentosidina libre	2,16±1,58	1,9±1,10
Pentosidina ligada		0,11±0,05
Proteínas totales		0,08±0,05

Datos expresados como media ± SD

Existe correlación entre el aclaramiento renal de creatinina y el aclaramiento renal de pentosidina libre ($r=0,551$, $p=0,01$). También entre el aclaramiento peritoneal de creatinina y el de pentosidina libre ($r=0,383$,

p=0,04); asimismo, se observa correlación entre el aclaramiento de proteínas totales a través del peritoneo y la pentosidina unida a proteínas que se elimina a través del peritoneo (r=0,594, p=0,01)

Para estudiar el efecto de la diálisis peritoneal sobre el nivel sérico de pentosidina, a un grupo de 12 pacientes se les determinó la pentosidina en suero, orina y dializado 12 meses después de la primera determinación. A continuación se muestran las variaciones en suero (Tabla 33) y en orina y dializado (Tabla 34) de los distintos parámetros bioquímicos estudiados.

TABLA 33: Niveles de Pentosidina Basales y a los 12 Meses en Suero de Pacientes en DPCA			
	Basal	12 Meses	p
Proteínas Totales (g/dl)	6,2±1,0	5,6±1,1	0,2020
Albúmina (g/dl)	3,8±0,7	3,5±0,7	0,2020
Glucosa (mg/dl)	134±85	105±68	0,3390
Urea (mg/dl)	136±42	134±35	0,7948
Creatinina (mg/dl)	6,4±3,1	6,8±2,0	0,7501
Pentosidina (pmol/ml)	291±220	508±341	0,0302
Pentosidina (pmol/mg alb)	7,9±3,5	15,5±11,3	0,0233

Datos expresados como media ± SD

Como se observa en la Tabla 33, existe una diferencia estadísticamente significativa en la concentración de pentosidina sérica basal y al cabo de un año. En la Figura 34 se muestran las variaciones de cada uno de los individuos estudiados.

TABLA 34: Niveles de Pentosidina Basales y a los 12 Meses en Orina y Dializado de Pacientes con DPCA

	Basal	12 Meses	p
Diuresis (ml/24h)	970±780 (0-2200)	810±884 (0-2450)	0,6107
Volumen dializado (ml)	9000±3400 (6100-18400)	9400±2300 (6000-13400)	0,3259
Pentosidina total en orina (pmol/ml)	34±40 (4,5-135)	68±72 (6,3-196)	0,6911
Pentosidina libre en orina (pmol/ml)	27±42 (4,5-130)	39±39 (5,8-117)	0,6272
Pentosidina total en dializado (pmol/ml)	6,7±2,8 (2,3-11)	8,2±4,7 (2,2-14,9)	0,5796
Pentosidina libre en dializado (pmol/ml)	2,3±1,5 (0,7-5,5)	2,9±2,0 (1,0-7,0)	0,5383

Datos expresados como media ± SD y (rango)

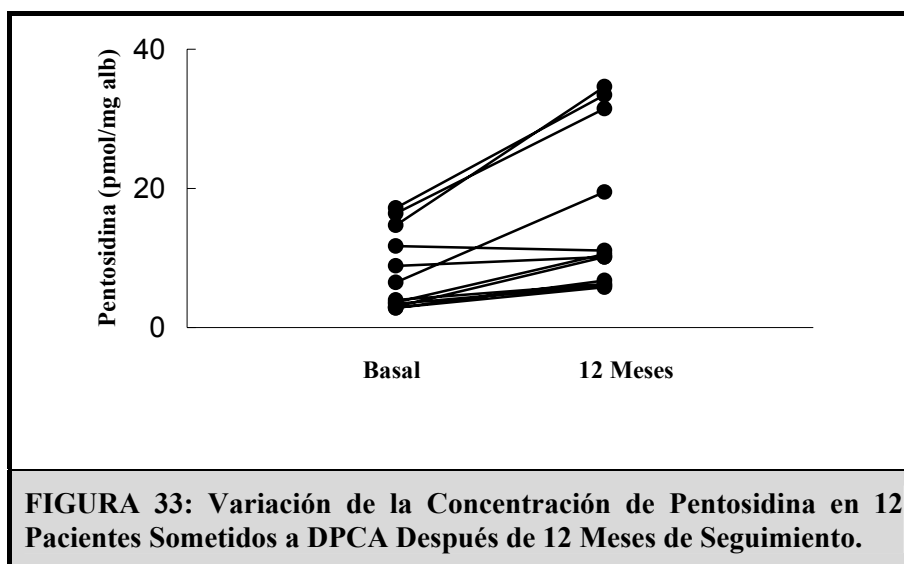


FIGURA 33: Variación de la Concentración de Pentosidina en 12 Pacientes Sometidos a DPCA Después de 12 Meses de Seguimiento.

4.1.8.3 Hemodiálisis

Se han estudiado 34 pacientes con insuficiencia renal aguda, sometidos a hemodiálisis (HD) convencional. La Tabla 35 muestra los datos bioquímicos basales, previos a una sesión de HD para todos los pacientes, clasificados según sean o no diabéticos.

TABLA 35: Características Bioquímicas de los Pacientes en Hemodiálisis.			
	Diabéticos (N=17)	No Diabéticos (N=27)	p
Glucosa (mg/dl)	243±131	97±19	<0,0001
Urea (mg/dl)	194±71	167±55	0,4413
Creatinina (mg/dl)	8,1±2,1	9,8±2,4	0,0331
Pentosidina (pmol/ml)	823±353	690±323	0,4413
Pentosidina (pmol/mg albúmina)	21,1±6,9	18,0±10,4	0,0611

Datos expresados como media ± SD

No existen diferencias significativas entre los dos grupos respecto a la edad, tiempo de permanencia en diálisis ni en la relación hombres/mujeres. Del mismo modo, tampoco hay diferencias significativas en la concentración de pentosidina entre diabéticos y no diabéticos, aunque se observa que son ligeramente más elevadas en el caso de los pacientes diabéticos. Tomados como un solo grupo, la pentosidina sérica en estos pacientes no se correlaciona con la edad ni con el tiempo de permanencia en HD. Tampoco hay correlación con ninguna de los parámetros bioquímicos estudiados; glucosa ($r=0,097$, $p=0,5413$), urea ($r=0,1754$, $p=0,2604$), creatinina ($r=0,0816$, $p=0,6028$); pero

en cambio si existe correlación estadísticamente significativa con la β_2 microglobulina ($r=0,6197$, $p=0,0016$).

En la Tabla 36 se muestran los valores medios de pentosidina pre- y post-HD. La concentración de pentosidina plasmática aumenta ligeramente después de una sesión de hemodiálisis, este aumento es significativo cuando se expresan los resultados por unidad de volumen (pmol/ml), pero no ocurre lo mismo cuando se refieren las concentraciones de pentosidina en relación a la concentración de albúmina.

TABLA 36: Variación de la Concentración de Pentosidina Después de una Sesión de Hemodiálisis.			
	Pre-HD	Post-HD	p
Pentosidina (pmol/ml)	690±377	733±391	<0,050
Pentosidina (pmol/mg alb)	19,1±11,9	18,7±11,8	0,436

Datos expresados como media \pm SD

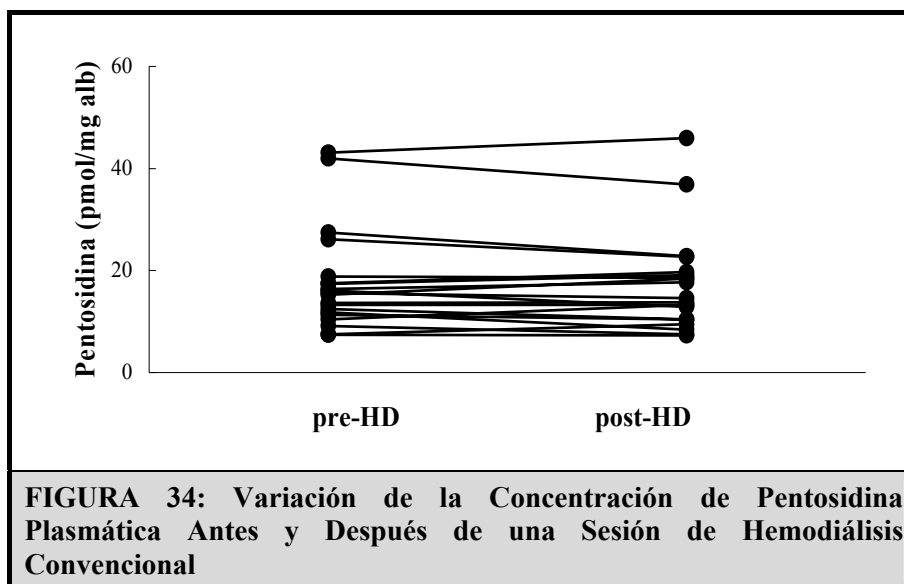


FIGURA 34: Variación de la Concentración de Pentosidina Plasmática Antes y Después de una Sesión de Hemodiálisis Convencional

En la Figura 34 se representan las variaciones individuales en la concentración de pentosidina en 22 pacientes antes y después de una sesión de HD. La eficiencia de la hemodiálisis (%), para eliminar del plasma la pentosidina, se calculó usando la fórmula siguiente:

$$\text{Eficiencia}(\%) = \frac{\text{Conc. pre-HD} - \text{Conc. post-HD}}{\text{Conc. pre-HD}} \times 100$$

TABLA 37: Eficiencia de la Hemodiálisis Convencional Eliminando Diversos Metabolitos en 22 Pacientes.	
	Eficiencia (%)
Pentosidina (pmol/ml)	-8±1,7
Pentosidina (pmol/mg alb)	3±1,6
β ₂ Microglobulina	-5±2,7
Urea (mg/dl)	61±14
Creatinina (mg/dl)	53±13

Datos expresados como media ± SD

Como se muestra en la Tabla 37 la hemodiálisis parece no ser efectiva a la hora de eliminar del plasma urémico la pentosidina y la β₂M en comparación con la urea o creatinina.

Las variaciones de la pentosidina plasmática en 15 pacientes, se determinó a los 12 meses de la primera intervención (Tabla 38). No se observan cambios significativos en ninguna de las variables estudiadas, incluyendo la pentosidina. Las variaciones individuales se muestran en la Figura 35.

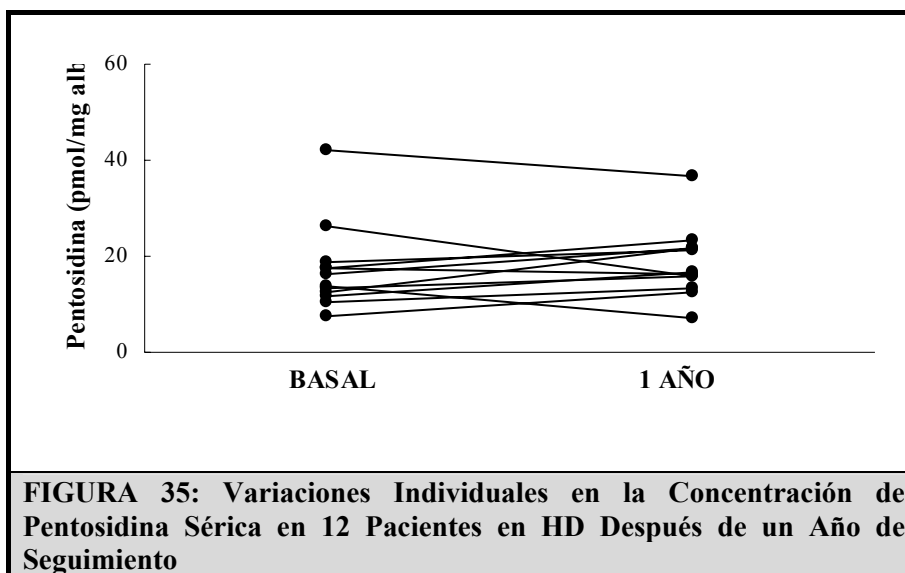


TABLA 38: Variaciones Analíticas de los Pacientes en HD al Inicio del Estudio y Después de 12 Meses de Seguimiento

	Basal	12 meses	p
Proteínas	6,4±0,5	6,8±0,6	0,1111
Albúmina	3,8±0,6	4,0±0,6	0,2038
Glucosa	130±63	125±41	0,7827
Urea	171±86	142±56	0,2701
Creatinina	9,1±2,8	9,0±2,6	0,7828
Pentosidina (pmol/ml)	684±366	745±246	0,2148
Pentosidina (pmol/mg alb)	19,7±12,4	21,2±11,1	0,9863

Datos expresados como media ± SD

4.1.8.4 Discusión

Las denominadas toxinas urémicas son sustancias químicamente caracterizadas que pueden ser cuantificadas y que independientemente que provoquen o no síntomas, se acumulan en los pacientes con fallo renal, acelerando el deterioro de la función renal, alterando el funcionamiento de las proteínas celulares y las de la matriz y acaban provocando la aparición de complicaciones.

Dos aproximaciones permiten entender las modificaciones no enzimáticas de las proteínas en la insuficiencia renal. El primer mecanismo es el de la reacción de Maillard, que ha sido ampliamente estudiado en la química alimentaria y nutricional. La cuantificación de AGEs específicos como la pentosidina y la CML ha puesto de manifiesto que sus concentraciones tanto en suero como en tejido son significativamente más elevadas en pacientes urémicos que en individuos sanos o pacientes diabéticos sin complicaciones renales. Los niveles plasmáticos de CML y pentosidina no se correlacionan con los niveles de fructosalisina en la uremia, lo que sugiere que otros factores son los responsables de la formación de AGEs en la uremia. Estudios posteriores demostraron la acumulación de muchos otros AGEs en la circulación de los pacientes urémicos ([122](#)).

El segundo mecanismo para entender las modificaciones no reversibles que ocurren sobre las proteínas se deriva del estudio del metabolismo lipídico, especialmente de la peroxidación de los lípidos. Recientemente se ha sabido que en la circulación de los pacientes en hemodiálisis se acumulan proteínas modificadas con MDA, un producto derivado de la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados tales como el araquidónico. Esas proteínas modificadas por MDA y otros lípidos se denominan colectivamente productos de lipoxidación avanzada (ALEs) ([123](#)).

La uremia está pues caracterizada por la acumulación simultánea de proteínas modificadas de forma irreversible tanto por carbohidratos como por lípidos esto es, AGEs y ALEs.

La hiperglucemia sostenida provoca una elevación de los denominados productos de Amadori, cuya degradación da lugar a compuestos más reactivos que los azúcares originales. Los compuestos carbonílicos que actúan como propagadores de la reacción son deoxiglucosonas, tales como 3-deoxiglucosona (20) y productos de fragmentación de los azúcares. Concretamente la 3-deoxyglucosona es mucho más reactiva que la glucosa a la hora de formar AGEs. En algunas circunstancias, el proceso es incluso más rápido, afectando a una amplia variedad de proteínas. Este es el caso de la enfermedad renal, donde los AGEs se acumulan independientemente de la glucemia, y juegan un papel importante en alteraciones tales como la aceleración de la enfermedad vascular, formación de los depósitos amiloides o estimulación de la respuesta inflamatoria (124). Estos hallazgos han suscitado un considerable interés por los fenómenos implicados en la glicación avanzada con la esperanza de encontrar medidas terapéuticas encaminadas a evitar los efectos tóxicos de la uremia.

La mayoría de la pentosidina plasmática se encuentra unida a la albúmina, y sólo una pequeña fracción se encuentra en forma libre. Mientras la acumulación de pentosidina libre puede ser debida a una disminución de la filtración glomerular, la acumulación de pentosidina ligada no puede ser explicada por una formación acelerada debido a la glucosa ni por una deficiente eliminación a través del glomérulo, lo que sugiere que un catalizador o precursor de origen desconocido se acumula en los pacientes con insuficiencia renal. La uremia se caracteriza por un elevado estrés oxidativo, bajo cuyas condiciones, las proteínas se ven modificadas directamente por especies de oxígeno reactivo, o bien de forma indirecta por los productos

resultantes de la autooxidación de los carbohidratos y lípidos, con la consiguiente formación de AGEs tales como la pentosidina.

En nuestro grupo de pacientes con insuficiencia renal leve o moderada, las concentraciones de pentosidina sérica son superiores a las observadas en un grupo control, ajustado por edades; también son más elevadas que las observadas en un grupo de pacientes diabéticos sin complicaciones de similares características, aunque muy inferiores a las observadas en los pacientes con enfermedad renal terminal, tratados con hemodiálisis o DPCA. La pentosidina plasmática en estos pacientes con IRC, parece estar determinada principalmente por el grado de conservación de la función renal, como se deduce de la correlación entre pentosidina y creatinina ($r=0,669$, $p<0,0001$). Mediante análisis de regresión múltiple, encontramos que de todas las variables estudiadas, solamente la creatinina sérica tiene influencia en la concentración de pentosidina ($p=0.013$). La duración de la enfermedad al igual que otros parámetros como edad o la glucemia no afectan significativamente a la concentración de pentosidina en este grupo de pacientes.

Nuestros resultados también muestran que en pacientes hipertensos existen concentraciones más elevadas de pentosidina que en los no hipertensos, especialmente los hipertensos diabéticos, que poseen concentraciones más elevadas que los no diabéticos. El hecho de que los pacientes hipertensos presenten valores más elevados de pentosidina sérica puede ser particularmente importante a la hora de valorar la utilidad de la concentración de pentosidina como marcador de riesgo cardiovascular, ya que la diabetes, la enfermedad renal y la hipertensión, son todos factores de riesgo, pero a menudo coexisten y conjuntamente predisponen fuertemente a la enfermedad coronaria. La hipertensión aparece relacionada con alteraciones en el estatus anti-oxidante, lo que hace que el estrés oxidativo sea importante en la patogénesis de la hipertensión y en el daño arterial asociado con la hipertensión. Es conocido que

en la hipertensión aumentan los marcadores de estrés oxidativo tales como el ácido tiobarbitúrico (125) el MDA y los anticuerpos anti-LDL oxidada (126), asimismo disminuye la capacidad de defensa antioxidante (127). Esto está en consonancia, con el hecho de que la pentosidina se haya definido como un producto de glicoxidación, debido a que además de la glicación, se necesitan condiciones oxidantes para su formación in vitro. Las reacciones de oxidación se encuentran estrechamente asociadas con las de glicación, y juntas causan alteraciones permanentes e irreversibles en las proteínas, proceso denominado glicoxidación. El hecho de que las concentraciones más elevadas correspondan a los pacientes hipertensos podría implicar que la hipertensión favorece de alguna forma la formación de pentosidina sobre las proteínas séricas en estos pacientes aunque también es de destacar que los pacientes hipertensos son los que presentan unos valores de creatinina más elevados, y es de esperar que también sean los que presentan mayor número de complicaciones. Investigaciones futuras se han de centrar en si estos eventos son solamente consecuencia del daño tisular observado en la hipertensión o si por el contrario los AGEs son los agentes causantes de la patogénesis de la enfermedad.

En los pacientes en diálisis peritoneal, hemos encontrado que las concentraciones de pentosidina son sensiblemente más elevadas que el grupo de pacientes con insuficiencia renal crónica, independientemente de que sean diabéticos o no. Observamos una correlación inversa entre la pentosidina plasmática y la diuresis ($r = -0,741$, $p < 0,001$). De tal forma, que la pentosidina sérica aumenta en suero a medida que se deteriora la función renal, así, los pacientes con diuresis inferior a 300 ml son los que tienen valores de pentosidina más elevados. La diálisis peritoneal, aunque es bastante eficaz a la hora de eliminar determinados productos del catabolismo, no ocurre lo mismo con los precursores o catalizadores de la formación de pentosidina. De ello se deduce el beneficio que reporta para el paciente conservar aunque sea mínimamente la función renal, ya que esta vía parece mucho más eficaz para

eliminar aquellas toxinas que inducen la formación de productos de glicoxidación.

No hemos encontrado correlación entre la pentosidina sérica y el tiempo de permanencia en DPCA, probablemente debido a la coexistencia en el mismo grupo de pacientes anúricos (con valores elevados de pentosidina aunque con poco tiempo en DPCA) y otros pacientes con diuresis parcialmente conservada y largo tiempo de permanencia en DPCA. Lo que si se observa es que de forma individual, en todos los pacientes aumenta la concentración de pentosidina con la duración del tratamiento. En los pacientes en DPCA el aclaramiento de pentosidina se lleva a cabo tanto en su forma libre (en orina y dializado) como en su forma ligada, mayoritariamente en el líquido de diálisis. En los pacientes con diuresis residual, la pentosidina eliminada por orina se encuentra mayoritariamente en forma libre (52-100%), aunque también se elimina una pequeña fracción ligada a proteínas, dependiendo de la proteinuria del paciente, aunque la cantidad de pentosidina ligada que se elimina por orina es minoritaria.

La pentosidina libre difunde a través de la membrana peritoneal; el aclaramiento peritoneal de las distintas formas de la pentosidina depende fundamentalmente de su peso molecular, lo que sugiere que este fenómeno es una difusión. La pentosidina libre presente en el suero difunde libremente hacia la cavidad abdominal atraída por el efecto osmótico ejercido por el líquido de diálisis, sin embargo, el aclaramiento de pentosidina por el peritoneo es inferior al de urea y creatinina, ya que su peso molecular es más elevado (PM 379). Así, se observa que en los pacientes con diuresis residual parcialmente conservada, se produce un aclaramiento de pentosidina libre inferior al de urea y creatinina, pero que sin duda es una importante vía de eliminación. No se producirá aclaramiento de pentosidina ligada a través de la orina, ya que la

albúmina no debe aparecer en orina en cantidades significativas excepto en pacientes con proteinuria muy acusada.

El aclaramiento de pentosidina a través del dializado ocurre tanto en forma libre como ligada, si bien el aclaramiento de la forma libre es muy superior (1,9 ml/min vs 0,11 ml/min), tal como se espera por su menor peso molecular. El aclaramiento de pentosidina libre es comparable al de otros compuestos de bajo peso molecular, mientras que el de pentosidina ligada a albúmina es muy inferior, reflejo del aclaramiento de albúmina que ocurre en CAPD, que se pierde en el líquido de diálisis a una velocidad aproximada de 8 g/día. La observación de que la concentración de pentosidina plasmática es inferior en DPCA que en HD puede ser explicada por las distintas cinéticas que sigue la albúmina en esos dos grupos de pacientes. Los pacientes en DPCA experimentan una pérdida neta de proteínas totales y albúmina a través de la membrana peritoneal. El incremento en la síntesis de albúmina por parte del hígado surge como respuesta a esta pérdida lo que implica que la albúmina circulante sea una albúmina más joven y por tanto menos glicada que la de aquellos pacientes en HD. En el dializado, la proporción de pentosidina libre oscila individualmente entre el 15 y el 73% del total presente en el dializado, (frente a un 3% en plasma) y no se correlaciona con la pentosidina ligada a proteínas a través del peritoneo, mientras que en la orina la fracción libre representa en algunos casos el 100% de la pentosidina eliminada por orina.

La diálisis peritoneal se diferencia de la hemodiálisis en que es el peritoneo del paciente, y no un riñón artificial, el que actúa como membrana de diálisis. En los pacientes tratados con diálisis peritoneal, la membrana peritoneal está continuamente expuesta a las elevadas concentraciones de glucosa que contienen los líquidos de diálisis (74-214mM), muy superior a la correspondiente a los pacientes diabéticos. Ello puede dar lugar a la glicación de proteínas y generación local de AGEs. Una consecuencia de la acumulación

de AGEs en la membrana peritoneal es el posible deterioro de esta membrana biológica. Los AGEs se acumulan en el peritoneo a medida que aumenta el tiempo en DPCA y junto con la expresión de RAGE correlaciona inversamente con el volumen de ultrafiltración (128) Aunque inicialmente se pensó que dicha acumulación era debida a la elevada concentración de glucosa utilizada como agente osmótico presente el fluido de diálisis, diversos estudios muestran la contribución significativa de otros factores (129) como son los productos de degradación de la glucosa formados como resultado de la esterilización con calor de los fluidos de diálisis durante la fabricación (130). Estos productos de degradación de la glucosa como metilglioxal, glioxal y 3-desoxi-glucosona son reconocidos precursores de AGEs y aunque estén en concentraciones micromolares son mucho más reactivos que la glucosa y la infusión de 2 litros de fluido una media de cuatro veces al día, supone un suministro continuo de precursores de AGEs.

En nuestro grupo de pacientes urémicos tratados con hemodiálisis, las concentraciones de pentosidina son muy elevadas; todos ellos presentan valores superiores a 10 pmol/mg de albúmina, más de diez veces superior a lo observado en individuos normales, llegando incluso algunos pacientes a más de 50 pmol/mg de albúmina. Al contrario de lo observado en los otros grupos de sujetos normales, pacientes con diabetes o insuficiencia renal leve, la concentración de pentosidina parece independiente de la concentración de creatinina. En los pacientes en HD no se observa correlación entre la pentosidina y ningún otro parámetro de los estudiados. En la diabetes, se considera que la elevación de pentosidina se debe a la interacción continua de un exceso de glucosa con los residuos de aminoácidos. Ya que la elevación es mucho más marcada en la uremia y no depende de la glucemia, el mecanismo causante de estas elevaciones ha de ser diferente del existente en la diabetes.

La escasa o nula eficiencia de la HD para eliminar pentosidina indica que su elevación en la uremia está causada principalmente por su retención. La mayoría de las proteínas de bajo peso molecular se eliminan mayoritariamente por el riñón. La β_2 M es uno de los componentes más importantes responsables de la amiloidosis en pacientes a tratamiento con HD (131) donde además se observa que la concentración de β_2 M aumenta de acuerdo con la duración de la HD. En el presente estudio, los niveles de pentosidina correlacionan significativamente con la concentración de β_2 M y la eliminación durante la HD ha sido prácticamente nula para ambos compuestos. El peso molecular de la β_2 M es 11,8 kDa y el de la pentosidina 379 Da. Al encontrarse la mayoría de la pentosidina ligada a proteínas de elevado peso molecular, principalmente albúmina, la HD no elimina pentosidina al igual que tampoco elimina β_2 M. El aumento aparente de pentosidina durante una sesión de HD no se debe, más que a la hemoconcentración que se genera durante una sesión de HD, consecuencia de la extracción de agua del plasma sanguíneo. Cuando se expresan los resultados en función de la albúmina no se observan diferencias significativas entre las concentraciones pre y post diálisis.

La cantidad de pentosidina eliminada durante una sesión de HD, se debe únicamente a una parte de la fracción libre presente en el plasma, y aunque esta fracción libre representa menos del 5% de la pentosidina total, es el único mecanismo de eliminación en estos pacientes. La concentración de pentosidina libre previa a una sesión de diálisis es más elevada en los pacientes en HD que en los de DPCA. Esto refleja la naturaleza intermitente de la HD (tres veces a la semana) donde se observa un máximo en el momento de la prediálisis comparado con la DPCA que es un proceso continuo y por tanto está en estado estacionario. La pentosidina libre se elimina tanto en HD como en DPCA en una extensión similar a otros compuestos de bajo peso molecular, mientras que la ligada a albúmina solamente se elimina de forma significativa

aunque a baja velocidad en DPCA (aproximadamente 0,11 ml/minuto según nuestros resultados).

La baja eficiencia de la HD para eliminar pentosidina, contribuye de forma significativa a las elevadas concentraciones de pentosidina en la enfermedad renal terminal. De la misma manera que la acumulación de β_2M causa amiloidosis, la acumulación de pentosidina plasmática en estos pacientes puede causar complicaciones tales como las complicaciones vasculares observadas en los pacientes urémicos.

Una de las complicaciones más devastadoras de los pacientes en HD es la amiloidosis derivada de la diálisis (DRA). Aunque el componente mayoritario de la DRA es la β_2M , su potencial patológico es objeto de controversia. Tres AGEs distintos se generan sobre la β_2M : pentosidina- β_2M , CML- β_2M y la imidazolona- β_2M . Actualmente se cree que el complejo AGE- β_2M es el principal agente patogénico de la DRA, capaz de mediar en la inflamación y en la artropatía erosiva mediante quimiotaxis de los monocitos, producción de colagenasa en las células sinoviales, síntesis de interleuquina 1 β , TNF- α , e interleuquina 6, por parte de los macrófagos (57). De esto se deduce, que los AGEs sean toxinas potenciales de la uremia, ya que, son resistentes a las técnicas de diálisis y probablemente estén implicadas en muchas de las complicaciones de los pacientes en diálisis de larga duración.

El estrés oxidativo característico de la enfermedad renal terminal se ve aumentado en la HD a consecuencia de la interacción con las membranas bioincompatibles usadas en los equipos de HD y que activan los leucocitos de los que se derivan especies de oxígeno reactivo, incremento de la peroxidación lipídica y alteración de las defensas antioxidantes (132). La utilización de membranas biocompatibles parece inducir en menor medida la generación de

especies de oxígeno reactivo, pero sin embargo, las especies derivadas de la oxidación de proteínas no se ven afectadas por el tipo de membrana e incluso aumentan un 20% tras una sesión de HD (133), sin que este incremento pueda ser atribuido a la hemoconcentración y ello sugiere que el estrés oxidativo es independiente del tipo de membrana.

La principal causa de mortalidad entre los pacientes en diálisis es la enfermedad cardiovascular y esta mortalidad es muy superior a la que se puede predecir por los factores de riesgo de Framingham solamente. Para los pacientes en HD la tasa de mortalidad por causas cardiovasculares es aproximadamente del 9%, lo cual es de 10-20 veces superior a la de la población general después de ajustar por edad, sexo, raza y presencia o ausencia de diabetes (134). Esta observación no deja de ser sorprendente si se considera que las lipoproteínas plasmáticas están sólo marginalmente elevadas en estos pacientes, caracterizados por un incremento de los niveles de triglicéridos, reducción de la HDL y un ligero incremento de los niveles de LDL, y aunque esto aumenta el riesgo, este perfil no justifica el incremento de riesgo observado, lo que sugiere que otros procesos, además de la hiperlipidemia, juegan un importante papel en la incidencia de la enfermedad cardiovascular. El estrés oxidativo y las modificaciones de las proteínas por AGEs y ALEs son factores de riesgo adicionales que predisponen a estos pacientes a sufrir frecuentes accidentes cardiovasculares.

El único método efectivo para disminuir los AGEs en la uremia es el trasplante renal. Con una buena función renal, la pentosidina y los AGEs de bajo peso molecular retornan rápidamente a su valor normal, mientras que la CML y pentosidina ligadas a albúmina requieren meses para normalizarse (135), probablemente ello sea un reflejo de la vida media larga de la albúmina. De forma similar, los AGEs tisulares también disminuyen, pero a una velocidad mas baja (136).

4.2 Estudio del gap de glicación

4.2.1 Estabilidad

La estabilidad del gap de glicación (*gg*) fue investigada a través de distintos análisis. En primer lugar, examinando la distribución del coeficiente de variación (CV) intra-paciente del *gg*. Así, entre un total de 2314 pacientes, el primero, segundo y tercer cuartil del CV intra-paciente para el *gg* fueron respectivamente: 17.1%, 26.7% y 38.3%. En los grupos con valores bajo-, medio- y alto-GG, definidos por los tertiles del GG, los valores medios de los CVs intra-paciente de *gg*, fueron respectivamente 22.6%, 93.4% y 29.1% (Tabla 39)

TABLA 39: Valores Medios del gap de Glicación y CVs Intra-paciente del <i>gg</i>			
Grupo	N	GG	CV intra-paciente <i>gg</i>
		%	%
Bajo-GG	771	-1.07±0.51	22.6
Moderado-GG	772	-0.03±0.24	93.4
Alto-GG	771	1.07±0.63	29.1

Los resultados muestran valores muy similares del CV intra-paciente en los bajos y altos glicadores, ya que los valores medios del GG en términos absolutos son similares. Sin embargo, en el grupo con moderado-GG el CV es mucho mayor, dado que el nivel medio del GG es muy bajo. Estos datos, indican que la distribución de los CV intra-paciente del *gg* (17.1, 26.7 y 38.3%), muestran una notable estabilidad, ya que las variaciones más altas se corresponden con pacientes con niveles más bajos del GG.

En un segundo tipo de análisis, en 1044 pacientes que tenían valores del *gg* en dos visitas separadas por 24 ± 2 semanas, se realizó la regresión del *gg* en una visita (gg_t) con el *gg* en la siguiente visita, aproximadamente 24 semanas después (gg_{t+24}); también se realizó la regresión del gg_t sobre el gg_{t+72} entre 467 de los 1044 pacientes que tenían una visita a las 72 ± 2 semanas del momento en que se obtuvo la gg_t . Los resultados fueron los siguientes:

$$gg_t = 0.87 gg_{t+24} - 0.05 \quad (r = 0.841, p < 0.0001)$$

$$gg_t = 0.91 gg_{t+72} - 0.07 \quad (r = 0.901, p < 0.0001)$$

Los resultados muestran que existe una fuerte correlación entre la primera y la segunda determinación, con un corte del eje de ordenadas que no difiere de 0 y una pendiente que fue positiva pero distinta de 1. Las medidas pareadas no difieren (*t* test). Basado en esto, el signo del GG aparece como muy reproducible y las magnitudes de las determinaciones repetidas se encuentran estrechamente relacionadas. Esto se demuestra en una ventana de tiempo lo suficiente grande, para excluir los efectos sobre el GG de diferencias fisiológicas en la albúmina frente al recambio de hematíes.

Finalmente, un tercer análisis consiste en ver si difieren las medidas pareadas del *gg* de la primera y segunda visita realizada a las 24 semanas, para ello se aplicó el test de Wilcoxon de los rangos con signo. El análisis muestra que no existen diferencias entre la primera y segunda determinación de *gg* ($p=0.38$).

4.2.2 Variabilidad de la HbA_{1c}

La distribución estadística del GG fue normal, con un valor medio en la población estudiada de 0.01 y una desviación estándar de 1.01; en 336 pacientes (14.5%) el GG fue >1%, y en 363 (15.7%) fue <-1%. La Tabla 40. muestra los valores medios actuales de la fructosamina, GG y HbA_{1c} por categorías de GG. En promedio, la HbA_{1c} media aumenta en el orden bajo-GG < moderado-GG < alto-GG ($p < 0.001$), mientras que la fructosamina media, cómo era de esperar, no se afecta por la categoría del GG.

TABLA 40: Fructosamina, GG y HbA_{1c} entre Todas las Visitas para Sujetos Clasificados por Niveles Bajos, Moderados y Altos de GG.							
GG grupo	n (sujetos)	n (Obs)	Fructosamina		GG		HbA_{1c}
Bajo (<-0.45)	771	6885	353	(96)	-1.07	(0.51)	6.6 (1.1)
Moderado(-0.45 a 0.38)	772	7581	339	(88)	-0.03	(0.24)	7.4 (1.0)
Alto (>0.38)	771	7502	357	(87)	1.07	(0.63)	8.7 (1.2)

Los datos son medias (SD). Obs, valores de visitas.

En la Figura 36 se muestra la regresión de la HbA_{1c} sobre la fructosamina en los tres grupos de GG ($r = 0.800$, 0.922 y 0.806 para bajos, moderados y altos niveles de GG respectivamente) y en la muestra total de estudio. Para esta última, la ecuación de regresión fue:

$$\mathbf{HbA_{1c} = 0.012 \times Fructosamina + 3.16 \ (r=0.680)}$$

En estos análisis, los datos de fructosamina y HbA_{1c} fueron los valores crudos obtenidos en cada visita, la muestra se ponderó adecuadamente para que

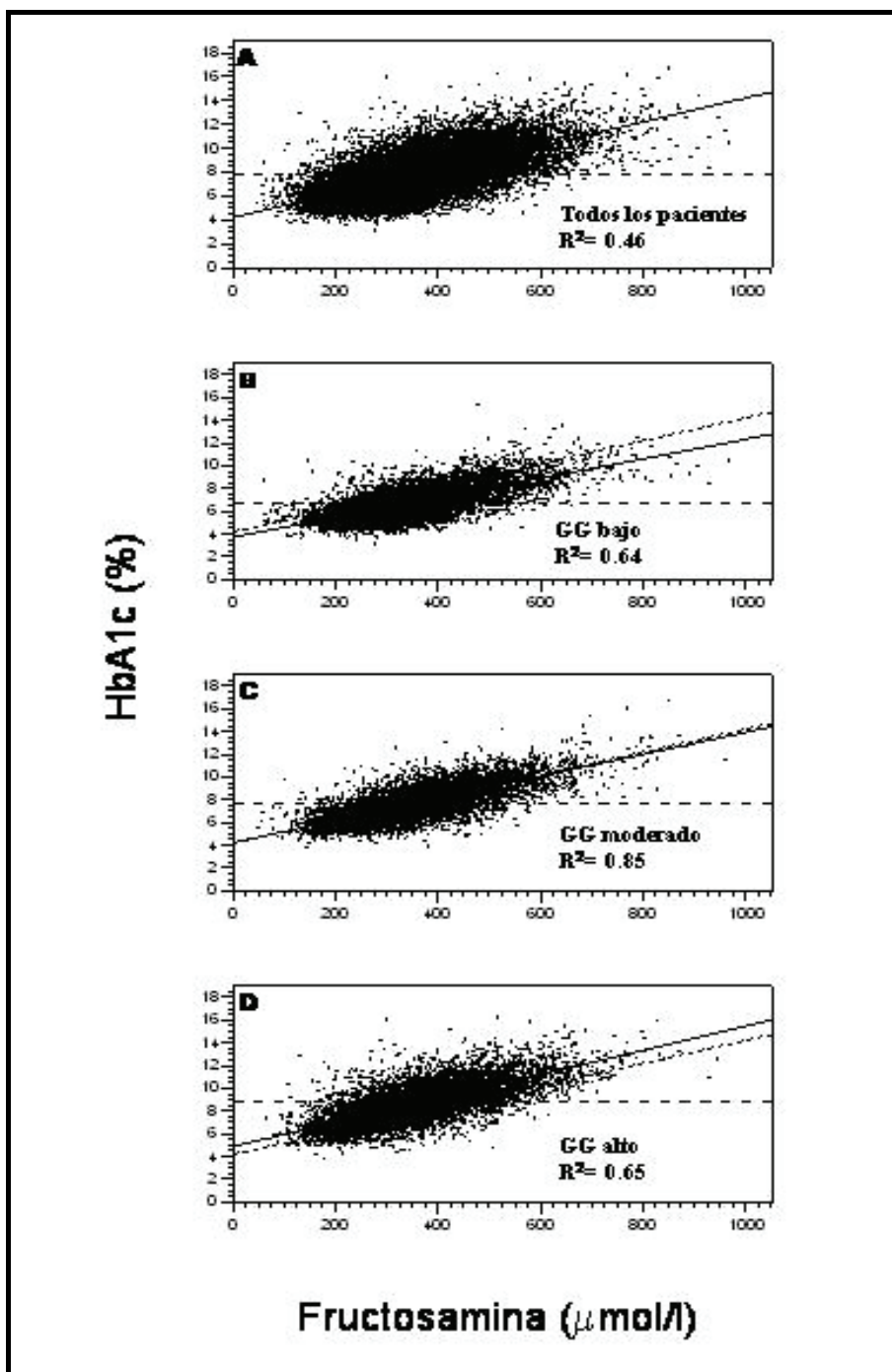


FIGURA 36: Dispersión de los Valores de HbA1C Observados Frente a los Valores de Fructosamina. (datos de todas las visitas) y la correspondiente recta de regresión (líneas continuas). A, grupo completo, B, C, D representan los grupos con GG bajo, moderado y alto respectivamente. Las líneas discontinuas en B, C, y D representan la recta de regresión del grupo completo (A). $HbA1C=0.012 \times Fructosamina + 3,16$

la variación entre-individuos tenga en cuenta el número de visitas de cada sujeto. En la muestra total, el gap de glicación crudo (gg) no correlaciona con la fructosamina cruda, sin embargo correlaciona fuertemente con la HbA_{1c} ($r=0.778$). Después de ajustar por la edad, duración de la diabetes, albúmina, sexo, cohorte y terapia, la correlación entre la HbA_{1c} cruda y la fructosamina cruda en la muestra total se reduce a 0.632, y aumenta la correlación entre la HbA_{1c} y el gg a 0.822.

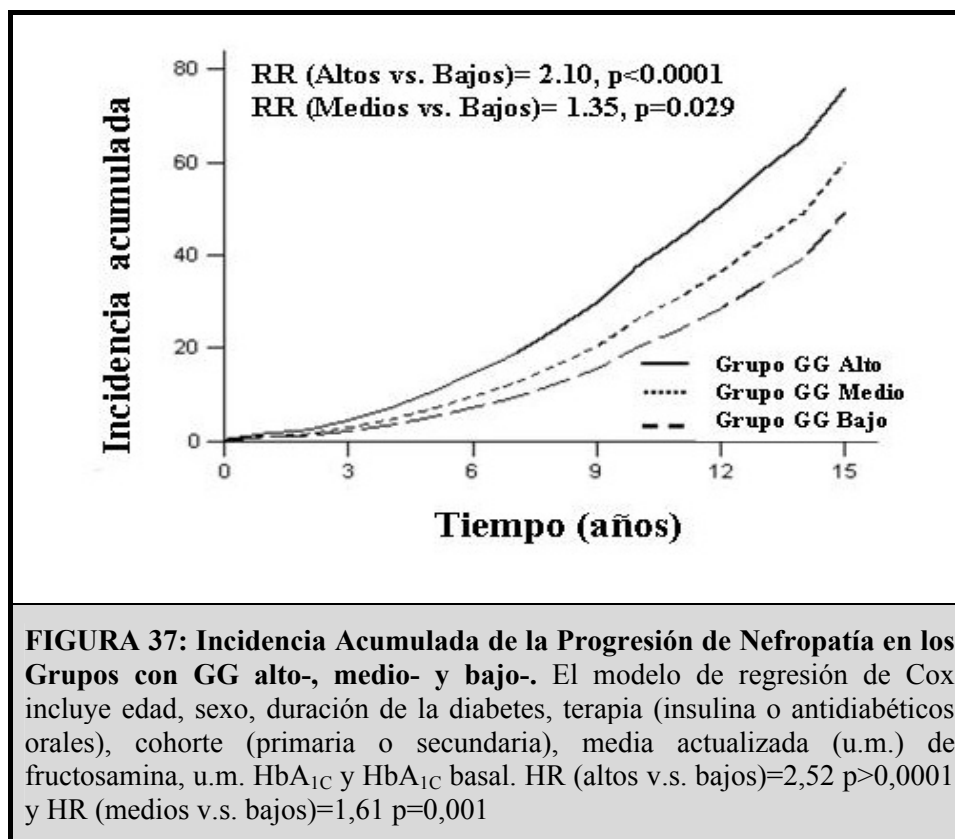
4.2.3 Progresión de nefropatía

A través de los análisis de regresión de Cox, la adición de una covariable (GG, u.m. fructosamina, u.m. HbA_{1c}) a las “covariables básicas” (edad, sexo, duración de la diabetes, tipo de terapia y cohorte), muestra que el riesgo de progresión de nefropatía aumenta significativamente por el GG (hazard ratio, HR= 1.49, 95% CI 1.35-1.64; $P<0.0001$), por la u.m. HbA_{1c} (HR= 1.04, 95% CI 1.01-1.10; $p= 0.007$) y ligera pero significativamente reducido por la u.m. fructosamina (HR= 0.998, 95% CI 0.997-0.999; $P= 0.001$).

El análisis multivariado de Cox que incluye las “covariables básicas” y las tres variables adicionales (u.m. fructosamina, u.m. HbA_{1c} y el GG), el predictor más significativo de progresión de nefropatía fue el GG (HR= 1.43, 95% CI 1.28-1.54; $p<0.0001$), seguido de la u.m. fructosamina (HR= 1.001, 95% CI 1.000-1.001; $p= 0.003$), sin embargo, la u.m. HbA_{1c} no fue significativa ($p= 0.91$).

En la Tabla 41, se muestran los valores de χ^2 de distintos modelos de Cox para progresión de nefropatía. Se han utilizado dos procedimientos para la

construcción de los modelos. El primero, incluye para cada paciente un solo valor de la u.m. fructosamina y u.m. HbA_{1c} en la última visita. El segundo, incluye para cada paciente todos los valores de la u.m. fructosamina y u.m. HbA_{1c} en todas las visitas.



La adición individual del GG, la u.m. fructosamina o la u.m. HbA_{1c} a un modelo con las “covariables básicas”, siempre muestra los mayores valores de χ^2 para la adición del GG (modelo 3 vs modelos 1 ó 2, Tabla 41). La adición del GG a un modelo ajustado por la fructosamina (GG / FA) ó por la HbA_{1c} (GG / HbA_{1c}), siempre aumenta más significativamente el valor de χ^2 que la adición de la HbA_{1c} a un modelo ajustado por la fructosamina (HbA_{1c} / FA) o por el GG (HbA_{1c} / GG).

TABLA 41: Valores de χ^2 para distintos modelos análisis multivariado de Cox para progresión de nefropatía

Modelo	Covariables	Comparado con modelo 1 ^a		Comparado con modelo establecido			
		$\Delta\chi^2$	<i>p</i>	$\Delta\chi^2$	<i>p</i>	Modelo	Comparación
Valores de media actualizada para FA y HbA _{1c} en la última visita ^b							
1	Basico (B) ^c						
2	B + um FA	11.9	0.0006				
3	B + um HbA _{1c}	12.4	0.0004				
4	B + GG	60.7	<0.0001				
5	B + um FA + um HbA _{1c}	71.2	<0.0001	59.3	<0.0001	2	HbA _{1c} FA
				59.8	<0.0001	3	FA HbA _{1c}
6	B + um FA + GG	76.3	<0.0001	64.4	<0.0001	2	GG FA
				15.6	<0.0001	4	FA GG
7	B + um A1C + GG	71.0	<0.0001	58.6	<0.0001	3	GG HbA _{1c}
				10.3	0.0013	4	HbA _{1c} GG
Valores de media actualizada para FA y HbA _{1c} en todas las visitas ^d							
1	Basico (B) [*]						
2	B + um FA	124.8	<0.0001				
3	B + um HbA _{1c}	180.8	<0.0001				
4	B + GG	466.1	<0.0001				
5	B + um FA + um HbA _{1c}	188.5	<0.0001	63.7	<0.0001	2	HbA _{1c} FA
				7.7	0.0055	3	FA HbA _{1c}
6	B + um FA + GG	590.3	<0.0001	465.5	<0.0001	2	GG FA
				124.2	<0.0001	3	FA GG
7	B + um A1C + GG	496.5	<0.0001	315.7	<0.0001	3	GG HbA _{1c}
				30.44	<0.0001	4	HbA _{1c} GG

^aComparado con modelo 1 es un test que muestra el efecto de añadir las covariables al modelo

^bValor medio de fructosamina (FA) y HbA_{1c} de todas las visitas (2314 individuos, 2314 casos).

^cEdad al inicio, sexo, duración de la diabetes al inicio, terapia (insulina o antidiabéticos orales) y cohorte (primaria o secundaria).

^dMedia actualizada (u.m.) para FA y HbA_{1c} en todas las visitas (2314 individuos, 21,960 casos).

GG: gap de glicación. $\Delta\chi^2$ de 3.842 o superior se considera estadísticamente significativo (*P* <0.05, 1 grado de libertad). El valor de -2log L sin covariables es el mismo para todos los modelos descritos (6425.8 con 2314 casos y 40127.2 con 21,960 casos).

Esto es especialmente patente cuando se construyen los modelos con todos los valores de las medias actualizadas de la fructosamina y HbA_{1c} en todas las visitas. Así, existe un aumento muy significativo en la capacidad explicativa del modelo cuando el GG se añade al modelo con HbA_{1c} (GG / HbA_{1c}, *modelo 7*, $\chi^2 = 315.7$) o cuando el GG se añade al modelo con fructosamina (GG / FA, *modelo 6*, $\chi^2 = 466.5$). Por otra parte, la adición del GG a la fructosamina, tiene un efecto mayor que la adición de la HbA_{1c} a la fructosamina (HbA_{1c} / FA, *modelo 5*, $\chi^2 = 63.7$) de aproximadamente un 732%. Por tanto, el GG es materialmente mucho mejor que la HbA_{1c}, cuando se ajustan los modelos por la fructosamina.

Cuando se realiza el análisis de Cox con los sujetos tricotomizados como altos, medios o bajos glicadores, y utilizando como covariables las “covariables básicas” más la u.m. fructosamina, la u.m. HbA_{1c} y la HbA_{1c} basal, similarmente se observa que el grupo de GG tiene una influencia significativamente más elevada sobre el riesgo de progresión de nefropatía ($P < 0.0001$), siendo el riesgo en los grupos con valores medios- y altos de GG 1.6 y 2.5 veces el riesgo del grupo con bajo-GG ($p = 0.001$ y $p < 0.0001$, respectivamente; (Figura 37.). La inclusión o exclusión de la HbA_{1c} basal y/o de la u.m. HbA_{1c} virtualmente no muestran diferencias en relación a estos resultados; resultados similares se encuentran, si para el cálculo de los correspondientes gaps de glicación de cada visita se utiliza la medida de la fructosamina utilizando el método del NBT no transformado.

Si la distribución de las medias de la HbA_{1c} se divide en tertiles, la proporción de sujetos alto glicadores y la proporción de sujetos que sufren progresión de nefropatía aumentan ambos en el orden bajo HbA_{1c} < medio HbA_{1c} < alto HbA_{1c}, mientras que la proporción de sujetos bajo glicadores muestra la tendencia contraria (resultados no mostrados). Por otra parte, en la Figura 38 se muestra en subgrupos definidos por los tertiles de GG y de

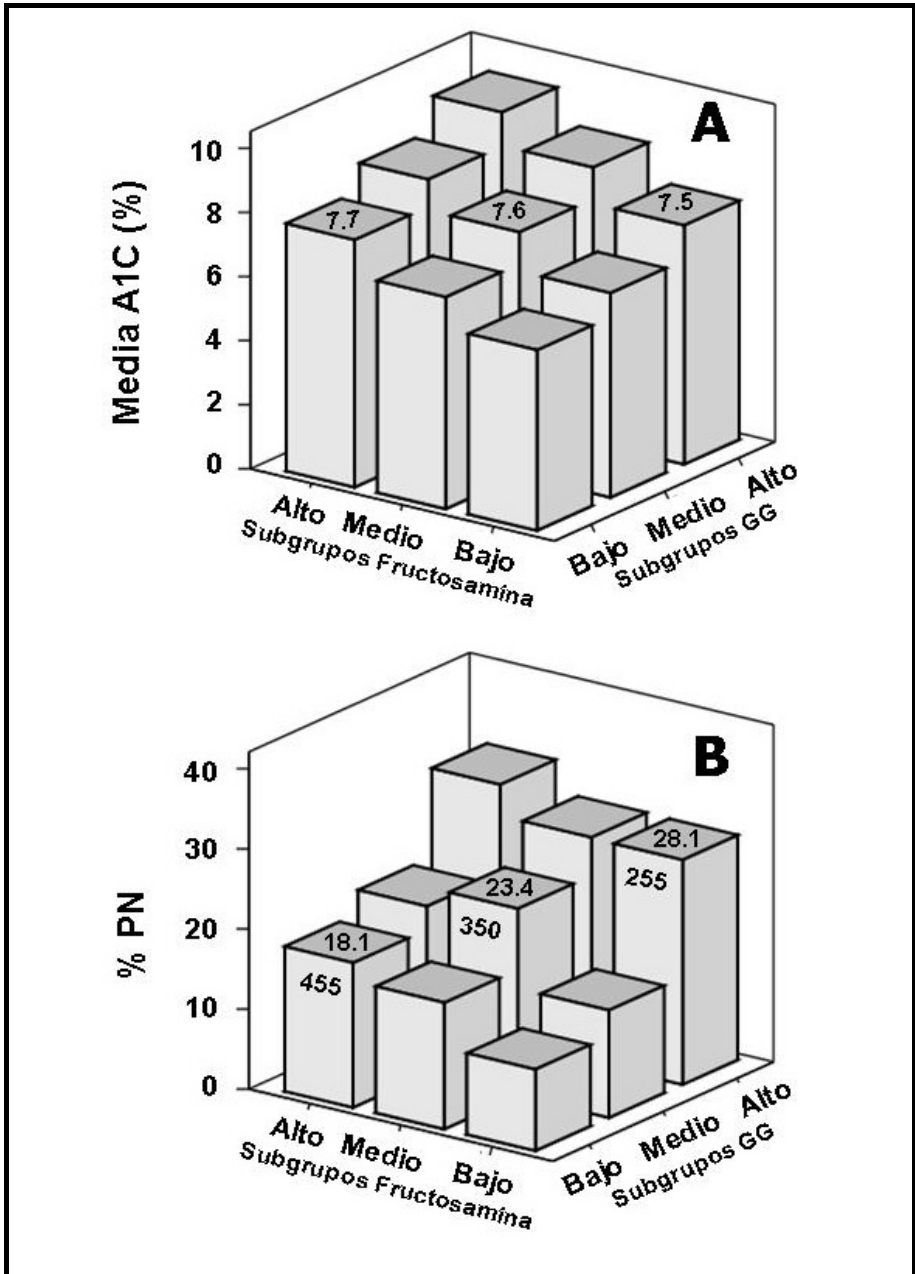


FIGURA 38: HbA1C Media (A) e Incidencia de Progresión de Nefropatía (%PN) (B) en Subgrupos Definidos por Tertiles de GG y Fructosamina Media (donde media significa media actualizada a la última visita): Para los distintos subgrupos en la diagonal de izquierda a derecha, GG aumenta mientras la fructosamina disminuye, los valores medios de las variables dependientes se muestran sobre las columnas, y en la figura B los valores medios de fructosamina se muestran en el lateral de la columna.

fructosamina media, la distribución de los valores de HbA_{1c} media (Fig. 38A) y la incidencia de progresión de nefropatía (Fig. 38B).

Se observa como el GG aumenta mientras que la fructosamina media cae (i.e. diagonal de cada figura de izquierda a derecha) y la HbA_{1c} permanece constante, sin embargo, la incidencia de progresión de nefropatía aumenta. Es decir, de los tres subgrupos en diagonal, el subgrupo con mayor incidencia de pacientes con progresión de nefropatía está constituido por altos glicadores y tiene prácticamente el mismo nivel medio de HbA_{1c} que el subgrupo con menor incidencia de progresión de nefropatía, sin embargo, este último está constituido por pacientes bajo-glicadores.

4.2.4 *Discusión*

En este amplio estudio, se muestra que en pacientes con diabetes de tipo 2, el gap de glicación –la diferencia media entre un nivel observado de HbA_{1c} de un paciente y el nivel predicho a partir de la regresión de la HbA_{1c} sobre la fructosamina en el grupo total de estudio- es estable con el tiempo y es un predictor significativo de progresión de nefropatía, que además, es independiente y más potente que la HbA_{1c} misma. La progresión de nefropatía es significativamente más frecuente en los grupos constituidos por altos y moderados glicadores que en el grupo de bajos glicadores, incluso después de ajustar por la HbA_{1c} media actualizada, la HbA_{1c} basal y otras covariables.

En el estudio del DCCT, se ha visto que el índice de glicosilación de la hemoglobina (HGI), es un fuerte predictor de retinopatía y nefropatía entre pacientes con diabetes de tipo 1 (81). Esta conclusión ha sido criticada, por el hecho de la fuerte correlación existente entre el HGI y la HbA_{1c}, ya que, si es válido el modelo estadístico de la regresión entre la HbA_{1c} y la MBG, la

correlación entre el HGI y la HbA_{1c} es una necesidad matemática, por tanto, pudiera ser que el HGI fuese únicamente un subrogado de la HbA_{1c}. Es decir, la asociación entre HGI y complicaciones microvasculares, se derivaría de la notable correlación existente entre HGI y HbA_{1c}. De esta forma, los autores críticos (93) volvieron a analizar los datos del DCCT y no encontraron ninguna influencia significativa del HGI sobre las complicaciones microvasculares si el modelo de regresión de Cox se ajustaba, no sólo por los niveles de MBG, sino también por los valores de HbA_{1c}. Chalew et al (94) admiten esto, pero indican que lo que es importante para los investigadores, no es si la HbA_{1c} se asocia con el riesgo de complicaciones diabéticas, lo cual está bien establecido, sino que si esta asociación se debe totalmente a los niveles de glucemia inherentes a la HbA_{1c} o si esta asociación también se debe parcialmente a determinantes no-glucémicos de la HbA_{1c}. Esto es una cuestión abierta, en parte debido a que las medidas de la MBG en el DCCT (perfiles de siete puntos registrados en un único día cada 3 meses), que aunque se han utilizado con éxito para predecir el desarrollo de la retinopatía (86) pueden ser medidas no totalmente exactas del nivel medio de glucemia para los propósitos de McCarte et al. (81). En otras palabras, los datos del DCCT no clarifican de forma inequívoca si el HGI refleja los efectos de los determinantes no-glucémicos de la HbA_{1c}, ó bien refleja la inexactitud en la medida de la glucemia media (95). Contrariamente en nuestro estudio, es mínima la posibilidad de que el gap de glicación, refleje inexactitud en la medida de la fructosamina.

A diferencia de lo visto por Cohen et al. (82) en su estudio sobre el gap de glicación en pacientes con diabetes de tipo 1, nosotros encontramos, que no solo los pacientes con GG elevados, sino también los que poseen niveles elevados de HbA_{1c}, se asocian con una nefropatía más avanzada; es probable, que el resultado negativo del estudio de estos autores se deba al pequeño tamaño de su muestra (40 pacientes). Sin embargo, en ambos estudios, el análisis ordinal de regresión logística ó la regresión de Cox, muestran que el

GG se asocia más estrechamente con la progresión de nefropatía que la HbA_{1c} o la fructosamina, y que una asociación significativa persiste cuando se ajusta por los niveles de HbA_{1c} y otros factores.

En este estudio, la HbA_{1c} media actualizada no es un predictor significativo de nefropatía, cuando en el análisis se incluye el GG. Por otra parte, la inclusión del GG en cualquier modelo que inicialmente no incluya el GG o la HbA_{1c}, siempre mejora el ajuste del modelo más que la inclusión de la HbA_{1c}. Es decir, los modelos que incluyen el GG son más explicativos de la progresión de nefropatía, que los modelos que incluyen la HbA_{1c}. Esto sugiere que el valor predictivo de la HbA_{1c} puede deberse menos a su asociación con la fructosamina (una medida de lo cual puede denominarse presión de glicación), que a su asociación con el gap de glicación (una medida de los determinantes no-glucémicos de la glicación de la hemoglobina, ó “glicabilidad”).

En individuos hematológicamente normales, una gran proporción de la variación en la HbA_{1c}, se debe a diferencias en la edad media de los eritrocitos circulantes (74). Sin embargo, no se han observado diferencias significativas en el nivel de creatina eritrocitaria entre los grupos de glicación, por lo cual, no existe ninguna indicación de que el aumento en la proporción de sujetos con un HGI elevado (79) ó un GG elevado (este estudio), que acompaña al aumentar la HbA_{1c} media, sea debido a una reducción en el recambio de eritrocitos. En otra dirección, Cohen et al (82) indica que el aumento del recambio que se asocia con la enfermedad renal, debería de conducir a que la proporción de pacientes alto-glicadores disminuya al aumentar la HbA_{1c}, tendencia opuesta a lo observado. En nuestro estudio, los grupos con GG bajo o alto presentan proporciones similares de pacientes con concentraciones patológicas de creatinina (3.5% y 3.9%, respectivamente), de tal forma que la prevalencia de enfermedad renal no ha tenido influencia en nuestros resultados.

Una proporción sustancial de la variación en la HbA_{1c} entre individuos, es de origen genético, y es independiente de los genes que afectan a la glucosa en ayunas (137). Ilustrativo de esto, es el hecho de que existe una diferencia consistente de aproximadamente un 0.4%, no explicada por su control glucémico, entre los niveles de HbA_{1c} en caucasianos y los niveles de otros grupos raciales (138). También se ha indicado, que en individuos no diabéticos, los niveles de fructosamina no están determinados genéticamente, y que aproximadamente un 70% de la variación en los valores de GG está genéticamente determinada, y que aproximadamente un tercio de la fracción no genética de la HbA_{1c} es explicada por la fracción no genética del GG (97). Estos resultados genéticos, apoyan las implicaciones de la estabilidad temporal del gg y HGI, en el sentido de que los niveles de HbA_{1c} deben de estar determinados por múltiples factores, no todos relacionados con la glucemia. Varios estudios han indicado la existencia de distintos componentes como posibles factores no-glucémicos. En sujetos no diabéticos con elevado HGI, se ha encontrado que tienen niveles más altos de 2,3-difosfoglicerato eritrocitario que los correspondientes sujetos con bajo HGI, y que la HbA_{1c} correlaciona positivamente con el pH y negativamente con los aminoácidos totales del plasma (74). También se ha indicado que los peróxidos lipídicos aumentan *in vitro* la glicación de la hemoglobina eritrocitaria, y que antioxidantes (especialmente, el ácido lipoico y la taurina) pueden inhibir parcialmente la formación de HbA_{1c} bajando los niveles de lipoperóxidos (139). También se ha implicado la concentración o actividad de enzimas glucolíticas y deglicantes (79), (80), (140) o diferencias en la vida media de los eritrocitos y procesos de transporte relacionados con el GLUT1 (97). Otros autores, han encontrado que marcadores de la glicabilidad de otras proteínas, como la furosina y la carboximetil-lisina del colágeno de la piel, predicen similarmente la progresión de retinopatía y nefropatía en pacientes con diabetes de tipo 1, independientemente de los niveles precedentes ó subsiguientes de HbA_{1c} (92)

Cuando factores como los indicados anteriormente, se conozcan y se relacionen más claramente con la glicabilidad de la hemoglobina y/o de otras proteínas glicadas en la diabetes, existirán menos dudas para emplear esos factores en la evaluación del riesgo de complicaciones. Mientras tanto, puede preguntarse si el GG, como una medida grosera de la glicabilidad, puede utilizarse para este propósito, incluso, aún teniendo en cuenta que aún siendo el residuo de la regresión de la HbA_{1c} sobre la fructosamina, contenga algún elemento aleatorio sin significado biológico. En otras palabras, cuando se evalúa el riesgo de complicaciones, ¿Es mejor utilizar la HbA_{1c}, es decir, el resultado de la interacción entre la presión de glicación y la glicabilidad de la hemoglobina, o bien, distinguir entre estos dos factores, utilizando la fructosamina como una medida del primero y el GG como una medida (imperfecta) del último? Nuestros resultados sugieren que lo último es preferible.

Aunque nuestros resultados muestran una notable estabilidad del GG, para obtener una evaluación satisfactoria y adecuada del GG en cada paciente, este ha de encontrarse en una situación de tratamiento estable, dado que existen diferencias en los tiempos necesarios para que se equilibre la HbA_{1c} (6 a 12 semanas) y la fructosamina (de 1 a 3 semanas). En nuestra experiencia la mejor evaluación del GG del paciente se consigue obteniendo 3 determinaciones del GG a intervalos de 2 semanas, en períodos de tiempo con tratamiento estable. O bien en el momento del diagnóstico y antes de iniciar el tratamiento. Sin embargo, esto requiere más estudios para estandarizar y optimizar las condiciones de determinación del GG.

En conclusión, los resultado de este estudio realizados en una amplia muestra de pacientes con diabetes de tipo 2 y seguidos un promedio de 6.5 años, muestran que el gap de glicación es un predictor de progresión de nefropatía, que es independiente y claramente más potente que la HbA_{1c} o la

fructosamina. En series de grupos definidos por tertiles de HbA_{1c}, el riesgo de progresión de nefropatía aumenta al hacerlo la prevalencia de altos glicadores. La asociación de la HbA_{1c} con el riesgo de nefropatía en estos pacientes, puede deberse menos al hecho de que refleje su nivel promedio de glucemia que a su asociación con el gap de glicación, el cual puede reflejar la influencia de factores no-glucémicos que afectan a las complicaciones relacionadas con la glicación. Estos hallazgos implican que la utilización conjunta del gap de glicación y de la fructosamina como marcadores de glicabilidad y presión de glicación, respectivamente, puede mejorar la evaluación de los pacientes diabéticos, permitiendo dianas de control glucémico que estén de acuerdo con la predisposición individual de los pacientes a la glicación de proteínas. Estudios futuros, deben de centrarse en la posible asociación entre el gap de glicación y otras complicaciones de la diabetes, y la investigación en los mecanismos moleculares responsables de la variabilidad no-glucémica en la glicación debe de continuar con la vista puesta en el desarrollo de nuevas aproximaciones terapéuticas.

5. CONCLUSIONES

1^a) Mediante cromatografía líquida de alto rendimiento y combinando la cromatografía de intercambio catiónico y la fase reversa, hemos estandarizado un método para la determinación de pentosidina en hidrolizados de proteínas. El método, se caracteriza por una linealidad hasta 2000 pmol/ml, una recuperación analítica entre 93 y 95%, una imprecisión intraensayo de un 4.5% e interensayo de un 6.1%, y un límite de detección de 200 fmol.

2^a) A diferencia de lo que ocurre con los AGEs inmunoreactivos, unidos en su mayor parte a proteínas con PM < 10 kDa, nuestros resultados muestran que mayoritariamente la pentosidina se encuentra ligada covalentemente a proteínas de elevado PM y que la concentración de pentosidina libre es inferior al 5% de la total. Asimismo, hemos identificado a la albúmina como la proteína sérica sobre la que se acumula la pentosidina.

3^a) Los niveles normales de pentosidina en suero oscilan entre 0.3 y 1.8 pmol/mg de albúmina y no se observan diferencias significativas entre hombres y mujeres. En orina más del 80% de la pentosidina se corresponde con la forma libre. El análisis de regresión múltiple, muestra que la pentosidina sérica correlaciona significativamente con la edad ($r= 0.404$, $p=0.0008$), siendo esta asociación independiente del nivel de fructosamina, glucosa, urea y creatinina. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la pentosidina está implicada en los procesos bioquímicos básicos del envejecimiento.

4^a) Nuestros resultados muestran que las diferencias que se han descrito para las concentraciones de pentosidina en vítreos de pacientes con o sin diabetes y vítreos control, son debidas a los distintos niveles de proteínas que existen en dichos vítreos como consecuencia de la rotura de la barrera hematorretiniana.

5^a) Los pacientes con diabetes mellitus, presentan niveles circulantes de pentosidina claramente superiores a los existentes en sujetos control, no observándose diferencias significativas en cuanto al tipo de diabetes o al sexo de los pacientes. Por otra parte, la pentosidina plasmática se ve afectada por el control glucémico, la edad y la función renal, y en los diabéticos de tipo 2 únicamente por la edad y función renal.

6^a) Los niveles de pentosidina son claramente superiores en diabéticos con macroangiopatía e hipertensión. La pentosidina plasmática es un predictor significativo de retinopatía, neuropatía y nefropatía diabética en diabéticos de tipo 2. En general, la pentosidina sérica es un buen marcador de complicaciones microvasculares y cardiovasculares en la diabetes mellitus.

7^a) La presencia de concentraciones elevadas de pentosidina en pacientes con artritis reumatoide o lupus sistémico eritematoso, indica que la pentosidina no es sólo un marcador de glicoxidación de la diabetes mellitus, sino que es un marcador de estrés oxidativo en diferentes patologías y podría valorarse como un índice de inflamación crónica.

8^a) De todos los pacientes estudiados, las concentraciones séricas más elevadas de pentosidina se encuentran en pacientes con insuficiencia renal crónica y dentro de estos en los sometidos a tratamiento con hemodiálisis. La función renal es el principal factor que determina la concentración plasmática de pentosidina, de tal forma que esta correlaciona estrechamente con la diuresis residual del paciente y con la pentosidina en orina y en líquido de diálisis.

9^a) La escasa o nula eficiencia de la diálisis para eliminar la pentosidina, sugiere que su elevación en la uremia está causada principalmente por su retención. Consecuentemente, la pentosidina plasmática en la insuficiencia

renal está determinada fundamentalmente por el grado de conservación de la función renal.

10^a) El gap de glicación, calculado como la diferencia entre la HbA_{1c} medida y la predicha a partir de la fructosamina, es estable con el tiempo y constituye una variable idiosincrática de cada individuo.

11^a) La glicación de la hemoglobina es el resultado de dos acciones; la que se deriva de la acción de la glucemia media, una medida de la cual es la fructosamina y que representa la “presión de glicación”, y otra la que se deriva del gap de glicación, que refleja los efectos de los determinantes no glucémicos y que representa la “glicabilidad”.

12^a) En una cohorte de 2,314 pacientes con diabetes de tipo 2 seguidos prospectivamente por término medio 6.5 años, el gap de glicación es un predictor significativo de progresión de nefropatía, que además, es independiente y más potente que la hemoglobina glicada misma.

13^a) En los diabéticos de tipo 2, la progresión de nefropatía es significativamente más frecuente en los altos glicadores que en los bajos glicadores, incluso después de ajustar por la hemoglobina glicada basal y media, la fructosamina, la edad de los pacientes, el sexo, la duración de la enfermedad y el tipo de cohorte y tratamiento.

14^a) La utilización conjunta del gap de glicación y de la fructosamina, como marcadores de glicabilidad y de presión de glicación, respectivamente, puede mejorar la evaluación del riesgo de nefropatía y el grado de control glucémico necesario para el paciente individual.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Maillard LC. Reaction generale des acides amines sur les sucres: ses consequences biologiques. *Presse medicale* 1912;71:546.
2. Monnier VM, Cerami A. Nonenzymatic browning in vivo. Possible process for aging of long-lived proteins. *Science* 1981;211:491-494.
3. Brownlee M, Vlassara H, Kooney A, Ulrich P, Cerami A. Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. *Science* 1986;232:1629-32.
4. Ulrich P, Cerami A. Protein glycation, diabetes and aging. *Recent Prog Horm Res* 2001;56:1-21.
5. Baynes JW, Monnier VM, Ames JM, Thorpe S. The Maillard Reaction: Chemistry at the Interface of Nutrition, Aging, and Disease. *Annals of the New York Academy of Science: Editorial Wiley-Blackwell*, 2005.
6. Brownlee M, Cerami A, Vlassara H. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med* 1988;318:1315-21.
7. Miyata T, Inagi R, Iida Y, Sato M, Yamada N, Oda O, et al. Involvement of beta 2-microglobulin modified with advanced glycation end products in the pathogenesis of hemodialysis-associated amyloidosis. Induction of human monocyte chemotaxis and macrophage secretion of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1. *J Clin Invest* 1994;93:521-8.
8. Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications. A new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 1999;48:1-9.
9. Bucala R, Makita Z, Vega G, Grundy S, Koschinsky T, Cerami A, et al. Modification of low density lipoprotein by advanced glycation end products contributes to the dyslipemia of diabetes and renal insufficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:9441-9445.
10. Miyata T, Ueda Y, Yamada Y, Izuhara Y, Wada T, Jadoul M, et al. Accumulation of carbonyls accelerates the formation of pentosidine, an

- advanced glycation end product: carbonyl stress in uremia. *J Am Soc Nephrol* 1998;9:2349-56.
11. Miyata T, Ueda Y, Saito A, Kurokawa K. 'Carbonyl stress' and dialysis-related amyloidosis. *Nephrol Dial Transplant*. 2005;15:25-28.
 12. Reddy VP, Obrenovich ME, Atwood CS, Perry G, Smith MA. Involvement of Maillard reactions in Alzheimer disease. *Neurotox Res* 2002;4:191-209.
 13. Rodríguez-García J, Requena JR, Rodríguez-Segade S. Increased concentrations of serum pentosidine in rheumatoid arthritis. *Clin Chem* 1998;44:250-5.
 14. Mortensen hB, Christopherson C. Glucosylation of human haemoglobin a in red blood cells studied in vitro. Kinetics of the formation and dissociation of haemoglobin A1c. *Clin Chim Acta* 1983;15:317-26.
 15. McDonald MJ, Bleichman M, Bunn HF, Noble RW. Functional properties of the glycosylated minor components of human adult hemoglobin. *J Biol Chem* 1979;254:702-7.
 16. Bernstein RE. Nonenzymatically glycosylated proteins. *Adv Clin Chem* 1987;26:1-78.
 17. Kawamura N, Ookawara T, Suzuki K, Konishi K, Mino M, Taniguchi N. Increased glycated Cu,Zn-superoxide dismutase levels in the erythrocytes of patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;74:1352-4.
 18. Wolff SP, Dean RT. Glucose autooxidation and protein modification: the potential role of autoxidative glycosylation in diabetes. *Biochem J* 1987;245:243-250.
 19. Wells-Knetch KJ, Zyzak DV, Litchfield JE, Thorpe SR, Baynes JW. Mechanism of autoxidative glycosylation: identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autoxidative modification of proteins by glucose. *Biochemistry* 1995;34:3702-3709.
 20. Niwa T. 3-Deoxyglucosone: metabolism, analysis, biological activity, and clinical implication. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 1999;731:23-36.
 21. Dyer DG, Blackledge JA, Thorpe SR, Baynes JW. Formation of pentosidine during nonenzymatic browning of proteins by glucose.

- Identification of glucose and other carbohydrates as possible precursors of pentosidine in vivo. *J Biol Chem* 1991;266:11654-60.
22. Sell DR, Monnier VM. Structure elucidation of a senescence cross-link from human extracellular matrix. Implication of pentoses in the aging process. *J Biol Chem* 1989;264:21597-602.
 23. Grandhee SK, Monnier VM. Mechanism of formation of the Maillard protein cross-link pentosidine. Glucose, fructose, and ascorbate as pentosidine precursors. *J Biol Chem* 1991;266:11649-11653.
 24. Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 1991;40:405-12.
 25. Taneda S, Monnier VM. ELISA of pentosidine, an advanced glycation end product, in biological specimens. *Clin Chem* 1995;41:1766-73.
 26. Ahmed MU, Thorpe SR, Baynes JW. Identification of N-carboxymethyl-lysine as a degradation product of fructoselysine in glycated protein. *J Biol Chem* 1986;261:4889-4894.
 27. Fu MX, Requena JR, Jenkins AJ. The advanced glycation end product Nepsilon-(carboxymethyl)lysine, is a product of both lipid peroxidation and glycoxidation reactions. *J Biol Chem* 1996;271:9982-6.
 28. Portero-Otin M, Nagaraj RH, Monnier VM. Chromatographic evidence for pyrroline formation during protein glycation in vitro and in vivo. *Biochim Biophys Acta* 1995;1247:74-80.
 29. Smith MA, Taneda S, Richey PL, Miyata S, Yan SD, Stern D, et al. Advanced Maillard reaction end products are associated with Alzheimer disease pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:5710-4.
 30. Ienaga K, Nakamura K, Hichi T, Nakazawa Y, Fukunaga Y, Kakita H, et al. Crosslines, fluorophores in the AGE-related cross-linked proteins. *Contrib Nephrol* 1995;112:42-51.
 31. Frye EB, Degenhardt TP, Thorpe SR, Baynes JW. Role of the Maillard reaction in aging of tissue proteins. *J Biol Chem* 1998;273:18714-18719.
 32. Niwa T. Recent progress in the analysis of uremic toxins by mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 2008.

33. Koyama H, Yamamoto H, Nishizawa Y. RAGE and soluble RAGE: Potential therapeutic targets for cardiovascular diseases. *Mol Med* 2007;13:625-635.
34. Vlassara H. Advanced glycation endproducts and atherosclerosis. *Annal Med* 1996;28:419-426.
35. Haitoglou CS, Tsilibary EC, Brownlee M, Charonis AS. Altered cellular interactions between endothelial cells and nonenzymatically glycosylated laminin/type IV collagen. *J Biol Chem* 1992;267:12404-7.
36. Kass DA, Shapiro EP, Kawaguchi M, Capriotti AR, Scuteri A, deGroof RC, et al. Improved arterial compliance by a novel advanced glycation end-product crosslink breaker. *Circulation* 2001;104:1464-70.
37. Throckmorton DC, Brodgen AP, Min B, Rasmussen H, Kashgarian M. PDGF and TGF-beta mediate collagen production by mesangial cells exposed to advanced glycosylation end products. *Kidney Int* 1995;48:111-7.
38. Forbes JM, Cooper ME, Oldfield MD, M.C.Thomas. Role of advanced glycation end products in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14:s254-8.
39. Twigg SM, Cao Z, MCLennan SV, Burns WC, Brammar G, Forbes JM, et al. Renal connective tissue growth factor induction in experimental diabetes is prevented by aminoguanidine. *Endocrinology*. 2002;143:4907-15.
40. McRobert EA, Gallicchio M, Jerums G, Cooper ME, Bach LA. The amino-terminal domains of the ezrin, radixin, and moesin (ERM) proteins bind advanced glycation end products, an interaction that may play a role in the development of diabetic complications. *J Biol Chem* 2003;278:25783-9.
41. Goldin A, Beckman JA, Schimdt AM, Creager MA. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation* 2006;114:597-605.
42. Schiekofe S, Andrassy M, Chen J, Rudofsky G, Schneider J, Wendt T, et al. Acute hyperglycemia causes intracellular formation of CML and activation of ras, p42/44 MAPK, and nuclear factor kappaB in PBMCs. *Diabetes*. 2003;52:621-33.

43. Yan SD, Smith MA, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS, et al. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptor/binding proteins. *J Biol Chem* 1994;269:9889-97.
44. Li J, Schmidt AM. Characterization and functional analysis of the promoter of RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J Biol Chem* 1997;272:16498-506.
45. Kohn RR, Cerami A, Monnier VM. Collagen aging in vitro by nonenzymatic glycosylation and browning. *Diabetes* 1984;33:57-9.
46. Brownlee M, Vlassara H, Cerami A. Nonenzymatic glycosylation products on collagen covalently trap low-density lipoprotein. *Diabetes* 1985;34:938-941.
47. Vlassara H, Brownlee M, Cerami A. Nonenzymatic glycosylation of peripheral nerve protein in diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981;78:5190-2.
48. Garner MH, Bahador A, Sachs G. Nonenzymatic glycation of Na,K-ATPase. Effects on the ATP hydrolysis and K⁺ occlusion. *J Biol Chem* 1990;265:15058-66.
49. Kirstein M, Brett J, Radoff S, Ogawa S, Stern D, Vlassara H. Advanced protein glycosylation induces transendothelial human monocyte chemotaxis and secretion of platelet-derived growth factor: role in vascular disease of diabetes and aging. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1990;87:9010-4.
50. Kim W, Hudson BI, Moser B, Guo J, Rong LL, Lu Y, et al. Receptor for advanced glycation end products and its ligands: a journey from the complications of diabetes to its pathogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1043:553-61.
51. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001;414:813-20.
52. Makita Z, Bucala R, Rayfield EJ, Friedman EA, Kaufman AM, Korbet SM, et al. Reactive glycosylation endproducts in diabetic uraemia and treatment of renal failure. *Lancet* 1994;343:1519-22.
53. Kume S, Takeya M, Mori T, Araki N, Suzuki H, Horiuchi S, et al. Immunohistochemical and ultrastructural detection of advanced glycation

end products in atherosclerotic lesions of human aorta with a novel specific monoclonal antibody. *Am J Pathol* 1995;147:654-67.

54. Sell DR, Monnier VM. End-stage renal disease and diabetes catalyze the formation of a pentose-derived crosslink from aging human collagen. *J Clin Invest* 1990;85:380-4.
55. Makita Z, Radoff S, Rayfield EJ, Yang Z, Skolnik E, Delaney V, et al. Advanced glycosylation end products in patients with diabetic nephropathy. *N Engl J Med* 1991;325:883-4.
56. Miyata T, Taneda S, Kawai R, Ueda Y, Horiuchi S, Hara M, et al. Identification of pentosidine as a native structure for advanced glycation end products in beta-2-microglobulin-containing amyloid fibrils in patients with dialysis-related amyloidosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:2353-8.
57. Niwa T. Dialysis-related amyloidosis: pathogenesis focusing on AGE modification. *Semin Dial* 2001;14:123-6.
58. Takeuchi M, Yamagishi S. Possible involvement of advanced glycation end-products (AGEs) in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des* 2008;14:973-8.
59. Sell DR, Nagaraj RH, Grandhee SK, Odetti O, Lapolla A, Fogarty J, et al. Pentosidine: a molecular marker for the cumulative damage to proteins in diabetes, aging, and uremia. *Diabetes Metab Rev* 1991;7:239-51.
60. Odetti P, Fogarty J, Sell DR, Monnier VM. Chromatographic quantitation of plasma and erythrocyte pentosidine in diabetic and uremic subjects. *Diabetes* 1992;41:153-9.
61. Hricik DE, Schulak JA, Fogarty J, Monnier VM. Pentose-derived glycation of plasma proteins after kidney or kidney-pancreas transplantation in patients with diabetic nephropathy. *Kidney Int* 1993;43:398-403.
62. Hammes HP, Brownlee M, Edelstein D, Saleck M, Martin S, Federlin K. Aminoguanidine inhibits the development of accelerated diabetic retinopathy in the spontaneous hypertensive rat. *Diabetologia* 1994;37:32-5.
63. Bucala R, Vlassara H. Advanced glycosylation end products in diabetic renal and vascular disease. *Am. J Kidney Dis.* 1995;26:875-88.

64. Bolton WK, Cattran DC, Williams ME, Adler SG, Appel GB, Cartwright K, et al. ACTION I Investigator Group. Randomized trial of an inhibitor of formation of advanced glycation end products in diabetic nephropathy. *Am J Nephrol* 2004;24:32-40.
65. Whittier F, Spinowitz B, Wuerth JP. Primagedine safety profile in patients with type 1 diabetes. *J. Am Soc Nephrol* 1999;10:184A (Abstract).
66. Peyroux J, Sternberg M. Advanced glycation endproducts (AGEs): pharmacological inhibition in diabetes. *Pathologie Biologie* 2006;54:405-419.
67. Peters AL, Davidson MB, Schringer DL, Hasselblad V. A clinical approach for the diagnosis of diabetes mellitus: an analysis using glycosylated hemoglobin levels. *JAMA* 1996;276:1246-1252.
68. Kilpatrick ES, Maylor PW, Keevil BG. Biological variation of glycated hemoglobin. *Diabetes Care* 1998;21:261-264.
69. Harris EK. Effects of intra- and interindividual variation on the appropriate use of normal ranges. *Clin Chem* 1974;12:1535-1542.
70. Lacher DA, Hughes JP, Carroll MD. Estimate of biological variation of laboratory analytes base on the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Clin Chem* 2005;51:450-452.
71. Yudkin JS, Forrest RD, Jackson CA, Ryle AJ, Davie S, Gould BJ. Unexplained variability of glycated hemoglobin in nondiabetic subjects not related to glycemia. *Diabetologia* 1990;33:208-215.
72. Goldstein DE, Little RR, Lorenz RA, Malone JL, Nathan D, Peterson CM. Tests of glycemia in diabetes. *Diabetes Care* 1995;18:896-909.
73. Rohlfing CL, Wiedmeyer H, Little RR, England JD, Tennill A, Goldstein DE. Defining the relationships between plasma glucose and HbA_{1c}. *Diabetes Care* 2002;25:275-278.
74. Gould BJ, Davie SJ, Yudkin JS. Investigation of the mechanism underlying the variability of glycated haemoglobin in non-diabetic subjects not related to glycaemia. *Clin Chim Acta* 1997;260:49-64.
75. Modan M, Meytes D, Roseman P, Yosef SB, Sehayek E, Yosef NB. Significance of high HbA_{1c} levels in normal glucose tolerance. *Diabetes Care* 1988;11:422-428.

76. Service FJ. Correlation between glycemia and glycated hemoglobin. *Comprehensive Therapy* 1990;16:33-40.
77. DCCT Research Group. Diabetes Control and Complications Trial (DCCT): Results of feasibility study. *Diabetes Care* 1987;10:1-19.
78. Hempe J, Gomez R, McCarter R, Chalew S. High and low hemoglobin glycation phenotypes in type 1 diabetes: A challenge for interpretation of glycemic control. *J Diabet Complications* 2002;16:313-320.
79. Hudson PR, Child DF, Jones H, Williams CP. Differences in rates of glycation (glycation index) may significantly affect individual HbA_{1c} results in type 1 diabetes. *An Clin Biochem* 1999;36:451-459.
80. Madsen H, Kjaergaard JJ, Ditzel J. Relationship between glycosylation of haemoglobin and the duration of diabetes: A study during the third trimestre of pregnancy. *Diabetologia* 1982;22:37-40.
81. McCarter RJ, Hempe JM, Gomez R, Chalew SA. Biological variation in HbA_{1c} predicts risk of retinopathy and nephropathy in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2004;27:1259-1264.
82. Cohen RM, Holmes YR, Chenier TC, Joiner CH. Discordance between HbA_{1c} and fructosamine. *Diabetes Care* 2003;26:163-167.
83. Chalew SA, McCarter RJ, Thomas J, Thomson JL, Hempe JM. A comparison of the glycosylation gap and hemoglobin glycation index in patients with diabetes. *J Diabet Complications* 2005;19:218-222.
84. Rendell M, Stephen PM, Paulsen R, Valentine JL, Rasbold K, Hestorff T, et al. An interspecies comparison of normal levels of glycosylated hemoglobin and glycosylated albumin. *Com Biochem Physiol* 1985;81B:819-822.
85. Higgins PJ, Garlick RL, Bunn HF. Glycosylated hemoglobin in human and animal red cells. Role of glucose permeability. *Diabetes* 1982;31:743-748.
86. Service FJ, O'Brien PC. The relation of glycaemia to the risk of development and progression of retinopathy in the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetologia* 2001;44:1215-1220.
87. DCCT Research Group: The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993;329:977-986.

88. DCCT Research Group: The relationship of glycemic exposure (HbA_{1c}) to the risk of development and progression of retinopathy in the DCCT. *Diabetes* 1995;44:968-983.
89. Singer DE, Nathan DM, Keaven MA, Wilson PWF, Evans JC. Association of HbA_{1c} with prevalent cardiovascular disease in the original cohort of the Framingham Heart Study. *Diabetes* 1992;41:202-208.
90. Vitelli LL, Shahar E, Heiss G, McGovern PG, Brancati FL, Eckfeldt JH. Glycosylated hemoglobin level and carotid intimal-medial thickening in non-diabetic individuals. *Diabetes Care* 1997;20:1454-1458.
91. Khaw KT, Wareham N, Luben R, Bingham S, Oakes S, Welch A, et al. Glycated haemoglobin, diabetes and mortality in men in Norfolk cohort of European Prospective Investigation of Cancer and Nutrition (EPIC-Norfolk). *BMJ* 2001;322:15-18.
92. Genuth S, Lachin JM, Nathan DM. Biological variation in HbA_{1c} predicts risk of retinopathy and nephropathy in type 1 diabetes (Letter). 2005.
93. Lachin JM, Genuth S, Nathan DM, Rutledge BN. The hemoglobin glycation index is not an independent predictor of the risk of microvascular complications in the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes* 2007;56:1913-1921.
94. Chalew SA, Hempe J, McCarter R. The hemoglobin glycation index is not an independent predictor of the risk of microvascular complications in the DCCT.(Letter). *Diabetes* 2008;57.
95. Nathan DM, Genuth S, Rutledge B, Lachin J. The hemoglobin glycation index is not an independent predictor of the risk of microvascular complications in the DCCT (Letter). *Diabetes* 2008;57:e5,DOI: 10.23337/db07-1638.
96. Nathan DM, Turgeon H, Regan S. Relationship between glycated haemoglobin levels and mean glucose levels over time. *Diabetologia* 2007;50:2239-2244.
97. Cohen RM, Snieder H, Lindsell CJ, Beyan H, Hawa M, Blincko S, et al. Evidence for independent heritability of the glycation gap (glycosylation gap) fraction of HbA_{1c} in non-diabetic twins. *Diabetes Care* 2006;29:1739-1743.

98. Takahashi M, Kushida K, Kawana K, Ishihara C, Denda M, Inoue T, et al. Quantification of the cross-link pentosidine in serum from normal and uremic subjects. *Clin Chem* 1993;39:2162-5.
99. Vlassara H, Striker LJ, Teichberg S, Fuh H, Li YM, Steffes M. Advanced glycation end products induce glomerular sclerosis and albuminuria in normal rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:11704-8.
100. Obrenovich ME, Monnier VM. Apoptotic killing of fibroblasts by matrix-bound advanced glycation endproducts. *Sci Aging Knowledge Environ* 2005;4:pe3.
101. Baynes JW. The role of AGEs in aging: causation or correlation. *Exper Geront* 2001;36:1527-37.
102. Sell DR, Lane MA, Johnson WA, Masoro EJ, Mock OB, Reiser KM, et al. Longevity and the genetic determination of collagen glycoxidation kinetics in mammalian senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:485-490.
103. López JM, Imperial S, Valderrama R, Navarro S. An improved Bradford protein assay for collagen proteins. *Clinica Chimica Acta* 1993;220:91-100.
104. Sebag J, Buckingham B, Charles MA, Reiser K. Biochemical abnormalities in vitreous of humans with proliferative diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 1992;110:1472-1476.
105. Stitt AW, Moore JE, Sharkey JA, Murphy G, Simpson DAC, Bucala R, et al. Advanced glycation end products in vitreous: structural and functional implications for diabetic vitreopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:2517-2523.
106. Matsumoto Y, Takahashi M, Chikuda M, Araki K. Levels of mature cross-links and advanced glycation end product cross-links in human vitreous. *Jpn J Ophthalmol* 2002;46:510-517.
107. Wolff SP. Diabetes mellitus and free radicals. Free radicals, transition metals and oxidative stress in aetiology of diabetes mellitus complications. *Br Med Bull* 1993;49:642-52.
108. Anderson MM, Requena JR, Crowley JR, Thorpe SR, Heinecke JW. The myeloperoxidase system of human phagocytes generates Nepsilon-(carboxymethyl)lysine on proteins: a mechanism for producing

- advanced glycation endproducts at sites of inflammation. *J Clin Invest* 1999;104:103-113.
109. Oldfield MD, Bach LA, Forbes JM, Nikolic-Paterson D, McRobert A, Thallas V, et al. Advanced glycation end products cause epithelial-myofibroblast transdifferentiation via the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *J. Clin Invest.* 2001;108:1853-63.
 110. Murata T, Nagai R, Ishibashi T, Inomuta H, Ikeda K, Horiuchi S. The relationship between accumulation of advanced glycation end products and expression of vascular endothelial growth factor in human diabetic retinas. *Diabetologia* 1997;40.
 111. Stitt AW. Advanced glycation: an important pathological event in diabetic and age related ocular disease. *Br J Ophthalmol.* 2001;85:746-53.
 112. Wada R, Yagihashi S. Role of advanced glycation end products and their receptors in development of diabetic neuropathy. *Ann N.Y. Acad. Sci.* 2005;1043:598-604.
 113. Zhang L, Zalewski A, Lui Y, COMPLETAR. Diabetes-induced oxidative stress and low-grade inflammation in porcine coronary arteries. *Circulation* 2003;108:472-8.
 114. Bucala R, Tracey KJ, Cerami A. Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilatation in experimental diabetes. *J Clin Invest* 1991;87:432-8.
 115. Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest* 1991;88:1785-1792.
 116. Berliner JA, Heinecke JW. The role of oxidized lipoprotein in atherogenesis. *Free Radical Biol Med* 1996;20:707-727.
 117. Kurien BT, Hensley K, Bachmann M, Scofield RH. Oxidatively modified autoantigens in autoimmune diseases. *Free Radical Biol Med* 2006;41:549-556.
 118. Seven A, Güzel S, Aslan M, Hamuryudan V. Lipid, protein, DNA oxidation and antioxidant status in rheumatoid arthritis. *Clin Biochem* 2008;41:538-543.
 119. Anderson MM, Hazen SL, Hsu FF, Heinecke JW. Human neutrophils employ myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system to convert

hydroxy-amino acids into glycolaldehyde, 2-hydroxypropional and acrolein. *J Clin Invest* 1997;99:424-32.

120. Hörkkö SE, Miller E, Dudl PD, N.J.Reaven, Zvaifler R, Terkeltaub SS, et al. Antiphospholipid antibodies are directed against epitopes of oxidized phospholipids. Recognition of cardiolipin by monoclonal antibodies to epitopes of oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest* 1996;98:815-825.
121. Hein GE, Köhler M, Oelzner P, Stein G, Franke S. The advanced glycation end product pentosidine correlates to IL-6 and other relevant inflammatory markers in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int* 2005;26:137-141.
122. Thornalley PJ. Advanced glycation end products in renal failure. *Journal of Renal Nutrition* 2006;16:178-184.
123. Shanmugam N, Figarola JL, Li Y, Swiderski PM, Rahbar S, Natarajan R. Proinflammatory effects of the advanced lipoxidation end products in monocytes. *Diabetes* 2008;57:879-88.
124. Miyata T, Strihou CvYd, Kurokawa K, Baynes J. Alterations in nonenzymatic biochemistry in uremia: origin and significance of 'carbonyl stress' in long-term uremic complications. *Kidney Int.* 1999;55:389-99.
125. Parik T, Allikmets K, Teesalu R, Zilmer M. Oxidative stress and hyperinsulinemia in essential hypertension: different facets of increased risk. *J Hypertens* 1996;14:407-410.
126. Maggi E, Marchesi E, Ravetta V, Martignoni A, Finardi G, Bellomo G. Presence of autoantibodies against oxidatively modified low-density lipoprotein in essential hypertension: a biochemical signature of an enhanced in vivo low-density lipoprotein oxidation. *J Hypertens* 1995;13:129-138.
127. Jun T, Ke-yan F, Catalano M. Increased superoxide anion production in humans: a possible mechanism for the pathogenesis of hypertension. *J Hum Hypertens* 1996;10:305-309.
128. Nakamura S, Tachikawa T, Tobita K, Miyazaki S, Sakai S, Morita T, et al. Role of advanced glycation end products and growth factors in peritoneal dysfunction in CAPD patients. *Am J Kidney Dis* 2003;41:S61-S67.

129. Lamb EJ, Cattell WR, Dawnay A. In vitro formation of advanced glycation end products in peritoneal dialysis fluid. *Kidney Int.* 1995;47:1768-1774.
130. Schalkwijk CG, Posthuma N, Brink HJt, Wee PMt, Teerlink T. Induction of 1,2-dicarbonyl compounds, intermediates in the formation of advanced glycation end-products, during heat-sterilization of glucose-based peritoneal dialysis fluids. *Perit Dial Int* 1999;19:325-333.
131. Geijo F, Homma N, Suzuki Y, Arakawa M, COMPLETAR. Plasma levels of beta-2-microglobulin as a new form of amyloid protein in patients undergoing long-term hemodialysis. *N Engl J Med* 1986;314:585-586.
132. Becker BN, Himmelfarb J, Henrich WL, Hakim RM. Reassessing the cardiac risk profile in chronic hemodialysis patients: a hypothesis on the role of oxidant stress and other nontraditional cardiac risk factors. *J Am Soc Nephrol* 1999;8:475-486.
133. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int.* 1996;49:1304-13.
134. Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Am J Kidney Dis* 1998;32:112-119.
135. Yoshida K, Yoneda T, Fujimoto K, Hirao Y, Konishi N. Pentosidine and its deposition in renal tissue in renal transplantation. *Transplantation Proceedings* 2005;37:4266-72.
136. Yoshida S, Yamada K, Hamaguchi K, Nishimura M, Hatakeyama E, Tsuchida H, et al. Immunohistochemical study of human advanced glycation end-products (AGE) and growth factors in cardiac tissues of patients on maintenance dialysis and with kidney transplantation. *Clin Nephrol* 1998;49:273-80.
137. Snieder H, Sawtell PA, Ross L, Walker J, Spector TD, Leslie RD. A1C levels are genetically determined even in type 1 diabetes: evidence from healthy and diabetic twins. *Diabetes* 2001;50:2858-2863.
138. Herman WH, Ma Y, Uwaifo G. Differences in A1C by race and ethnicity among patients with impaired glucose tolerance in the Diabetes Prevention Program. *Diabetes Care* 2007;30:2453-2457.

139. Selvaraj N, Bobby Z, Sathiyapriya V. Effect of lipid peroxides and antioxidants on glycation of haemoglobin: an in vitro study on human erythrocytes. *Clin Chim Acta* 2006;366:190-195.
140. Delpierre G, Collard F, Fortpied J, Schaftingen EV. Fructosamine 3-kinase is involved in a intracellular deglycation pathway in human erythrocytes. *Biochem J* 2002;365:801-808.

RESUMEN

Tesis doctoral (Director: Santiago Rodríguez-Segade): **Estudio de Diferentes Marcadores de Glicación en las Complicaciones Crónicas de la Diabetes Mellitus** que presenta Javier Rodríguez García para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas. Programa de Doctorado en Bioquímica y Biología Molecular; Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Santiago de Compostela.

La glicación o glicosilación no enzimática consiste en la reacción de grupos amino libres de las proteínas con grupos aldehído o cetona de los azúcares reductores como la glucosa, dando lugar a los denominados productos de Amadori que son aductos entre la proteína y el azúcar. Este fenómeno afecta a todas las proteínas del organismo, tanto séricas como tisulares, y será más marcado en el caso de los pacientes diabéticos donde hay una glucemia mas elevada. Los compuestos de Amadori, representan los denominados productos de glicación “temprana”, es decir, productos iniciales de glicación, entre los que cabe destacar la hemoglobina A_{1C} (HbA_{1C}) y la fructosamina.

Los productos de Amadori, si se forman sobre proteínas de vida media lo suficientemente larga, evolucionan mediante reacciones de oxidación, fragmentación etc originando a veces puentes moleculares entre distintas cadenas polipeptídicas originando un grupo heterogéneo de estructuras químicas, la mayoría aún sin caracterizar que se denominan colectivamente productos finales de glicación avanzada (Advanced Glycation End-products, AGEs)

Uno de los AGEs mejor caracterizados es la pentosidina, que se considera como marcador de los productos de glicación avanzada. Nosotros hemos desarrollado un método analítico de HPLC para su cuantificación en hidrolizado de proteínas y se ha estudiado su distribución en las proteínas séricas y en orina, concluyendo que se encuentra mayoritariamente ligada a la albúmina y solamente un 5% se encuentra en forma libre. Se han establecido valores normales en suero y orina para la pentosidina, encontrándose que su concentración aumenta con la edad, lo que apoya la hipótesis de que los AGEs están implicados en los procesos básicos del envejecimiento.

Los niveles de pentosidina en los pacientes diabéticos son significativamente mas elevados que en la población normal, especialmente en aquellos diabéticos que presentan macroangiopatía e hipertensión. La pentosidina plasmática es un predictor

significativo de retinopatía, neuropatía y nefropatía diabética en diabéticos de tipo 2. En general, la pentosidina sérica es un buen marcador de complicaciones microvasculares y cardiovasculares en la diabetes mellitus.

Se ha estudiado la pentosidina en otras patologías como la artritis reumatoide, lupus o insuficiencia renal. Se encuentran concentraciones elevadas de pentosidina en pacientes con artritis reumatoide ó lupus eritematoso sistémico, lo que indica que la pentosidina no es sólo un marcador de glicoxidación de la diabetes mellitus, sino que es un marcador de estrés oxidativo en diferentes patologías y podría valorarse cómo un índice de inflamación crónica. En la enfermedad renal se observan los valores mas elevados de pentosidina, especialmente en la enfermedad renal terminal, con independencia de que los pacientes sean o no diabéticos. Se observa además que la concentración sérica aumenta a medida que se deteriora la función renal y los valores mas elevados de pentosidina se dan en los pacientes anúricos tratados con hemodiálisis.

Se ha estudiado la pentosidina en otros fluidos biológicos como vítreos o líquidos provenientes de derrames serosos. En todos los casos se observa que la concentración de pentosidina se correlaciona con el contenido de proteínas del citado líquido.

Respecto a los productos de glicación “temprana” se ha calculado el gap de glicación, definido como la diferencia entre la HbA_{1c} medida y la predicha a partir de la fructosamina, encontrándose que es estable a los largo del tiempo y característica de cada individuo. La glicación de la hemoglobina está determinada por dos factores: la glucemia media del individuo y otro que se deriva del gap de glicación, que refleja los efectos de los determinantes no glucémicos y que representa la “glicabilidad”.

En 2,314 pacientes con diabetes de tipo 2 seguidos prospectivamente por término medio 6.5 años, el gap de glicación es un predictor significativo de progresión de nefropatía, que además, es independiente y más potente que la hemoglobina glicada misma.

En los diabéticos de tipo 2, la progresión de nefropatía es significativamente más frecuente en los altos glicadores que en los bajos glicadores, incluso después de ajustar por la hemoglobina glicada basal y media, la fructosamina, la edad de los pacientes, el sexo, la duración de la enfermedad y el tipo de cohorte y tratamiento.

La utilización conjunta del gap de glicación y de la fructosamina, como marcadores de glicabilidad y de presión de glicación, respectivamente, puede mejorar la

evaluación del riesgo de nefropatía y el grado de control glucémico necesario para el paciente individual.