



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

**ESTUDIO DE LOS NIVELES DE PRODUCTOS  
FINALES DE GLICACIÓN AVANZADA EN  
PACIENTES CON PREECLAMPSIA**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
QUÍMICA FARMACEÚTICA BIÓLOGA

**PRESENTA:**

MARIANA GABRIELA BOBADILLA BRAVO

**TUTOR**

DR. MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES

CIUDAD UNIVERSITARIA, Cd. Mx., SEPTIEMBRE 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Prof. Ignacio Camacho Arroyo  
**VOCAL:** Prof. Marco Antonio Cerbón Cervantes  
**SECRETARIO:** Prof. Ignacio González Sánchez  
**1er. SUPLENTE:** Prof. Verónica Garrocho Villegas  
**2° SUPLENTE:** Prof. Francisca Morayna Gutiérrez Luna

Este trabajo se realizó en la Unidad de Investigación en Reproducción Humana del Instituto Nacional de Perinatología-Facultad de Química, UNAM.

Se realizó también en el laboratorio del Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán en colaboración con el Dr. Eulises Díaz Díaz.

**ASESOR DEL TEMA:** Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes

**SUPERVISOR TÉCNICO:** Dr. Edgar Ricardo Vázquez Martínez

**SUSTENTANTE:** Mariana Gabriela Bobadilla Bravo

# ÍNDICE

	<b>Página</b>
Índice de figuras	i
Índice de tablas	iii
Abreviaturas	iv
1. Resumen	0
2. Introducción	1
3. Marco Teórico	
3.1. Productos finales de glicación avanzada (AGEs)	
3.1.1. Definición de AGEs	3
3.1.2. Formación de AGEs	3
3.1.3. Propiedades y detección de AGEs	6
3.1.4. Tipos de AGEs	7
3.1.5. Función fisiológica de los AGEs	9
3.2. Importancia médica	
3.2.1. AGEs en envejecimiento y enfermedad	12
3.2.2. Daños causados por AGEs	13
3.2.3. AGEs como fuente de disfunción vascular	15
3.2.4. AGEs y sus efectos placentarios	16
3.3. Preeclampsia (PE)	
3.3.1. Definición e incidencia de PE	17
3.3.2. Diagnóstico de PE	18
3.3.3. Etiología de PE	19
3.3.4. PE como enfermedad vascular	20
3.3.5. Activación de receptores para AGEs en PE	22
3.4. Antecedentes	
3.4.1. Estudios previos sobre niveles de AGEs en PE	23

4. Planteamiento	
4.1. Problema	27
4.2. Hipótesis	27
5. Objetivos	
5.1. Objetivo general	28
5.2. Objetivos particulares	28
6. Materiales y metodología	29
6.1. Diseño experimental	30
6.2. Muestras	
6.2.1. Población y grupos de estudio	30
6.2.2. Tamaño de la muestra	31
6.2.3. Criterios de inclusión	31
6.2.4. Criterios de exclusión	32
6.2.5. Criterios de eliminación	32
6.2.6. Técnica de muestreo	33
6.3. Técnicas de medición	
6.3.1. Datos antropométricos y diagnósticos en gestantes	34
6.3.2. Datos antropométricos y generales en neonatos	35
6.3.3. Determinación de perfil hepático	36
6.3.4. Determinación de perfil lipídico	36
6.3.5. Determinación de perfil metabólico	36
6.3.6. Ensayo de Inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) competitivo para AGEs	
6.3.6.1. Fundamento	37
6.3.6.2. Procedimiento	39
6.3.7. Radioinmunoensayo (RIA) competitivo para AGEs	
6.3.7.1. Fundamento	41
6.3.7.2. Procedimiento	41
6.4. Análisis estadístico	43

7. Resultados	
7.1. Variables clínicas	45
7.2. Niveles de AGEs totales medidos por ELISA competitivo	49
7.3. Niveles de AGEs intactos medidos por RIA competitivo	50
7.4. Distribución de los datos	52
7.5. Comparación de niveles plasmáticos de AGEs	53
7.6. Correlaciones entre variables clínicas y AGEs	
7.6.1. Perfil hepático y AGEs	55
7.6.2. Perfil lipídico y AGEs	57
7.6.3. Perfil metabólico y AGEs	59
7.6.4. Resumen de las correlaciones	62
8. Discusión	
8.1. Determinación de AGEs en plasma	63
8.2. Variables clínicas	63
8.3. Niveles de AGEs	64
8.4. Relación entre AGEs y perfil hepático	66
8.5. Relación entre AGEs y perfil lipídico	68
8.6. Relación entre AGEs y perfil metabólico	70
9. Conclusiones	72
10. Referencias	73

# ÍNDICE DE FIGURAS

No. Figura	Descripción	Página
1	Formación de AGEs	5
2	Ejemplos de AGEs y sus precursores	8
3	Tamaño de los AGEs	9
4	Unión de AGEs a sus receptores	10
5	Cómo causan daño los AGEs	14
6	Cambios en la presión arterial (PA) durante el embarazo	21
7	Diagrama de flujo de la metodología	29
8	Fundamento del ELISA de tipo competitivo	38
9	Fundamento del RIA de tipo competitivo	42
10	Variables diagnósticas para PE	47
11	Curva estándar de ELISA para medir AGEs totales	49
12	Niveles de AGEs plasmáticos totales para gestantes y neonatos	50
13	Curva estándar de RIA para medir AGEs intactos	51
14	Niveles de AGEs plasmáticos intactos para gestantes y neonatos	52
15	Relación de AGEs totales de gestante/neonato	54
16	Variables de perfil hepático	56

17	Correlación entre AGEs totales y variables hepáticas en gestantes	57
18	Variables de perfil lipídico	58
19	Correlación entre AGEs totales y Lipoproteínas de alta densidad (HDL) en gestantes	59
20	Variables de perfil metabólico	60
21	Correlación entre AGEs totales y variables metabólicas en gestantes	61



# ÍNDICE DE TABLAS

<b>No. Tabla</b>	<b>Descripción</b>	<b>Página</b>
1	Criterios clínicos para el diagnóstico de PE	18
2	Valores clínicos obtenidos para las gestantes	46
3	Valores clínicos obtenidos para los neonatos	48
4	Resultados obtenidos para la distribución de frecuencias en la prueba de normalidad de <i>Kolmogorov-Smirnov</i>	52
5	Resultados obtenidos para concentraciones plasmáticas de AGEs totales e intactos	53
6	Resultados obtenidos para la correlación de variables clínicas con respecto a AGEs totales en gestantes	62

# ABREVIATURAS

<b>3DG</b>	3Deoxiglucosona	<b>ERK</b>	Cinasas reguladas extracelularmente
<b>AGE-BSA</b>	Albúmina sérica bovina glicada	<b>GestCTR</b>	Grupo de gestantes control
<b>AGE-R1</b>	Subunidad R1 del complejo receptor de AGEs	<b>GestPE</b>	Grupo de gestantes con preeclampsia
<b>AGE -R2</b>	Subunidad R2 del complejo receptor de AGEs	<b>GGT</b>	Gamma-glutamil transferasa
<b>AGE-R3</b>	Subunidad R3 del complejo receptor de AGEs	<b>GLU</b>	Glucosa
<b>AGEs</b>	Productos finales de glicación avanzada	<b>GO</b>	Glioxal
<b>ALE</b>	Productos finales de lipoperoxidación avanzada	<b>GOLD</b>	Dímero de lisina y glioxal
<b>ALT</b>	Alanina transaminasa	<b>HDL</b>	Lipoproteínas de alta densidad
<b>Apo</b>	Apolipoproteína	<b>HELLPS</b>	Síndrome de hemólisis, enzimas hepáticas elevadas y plaquetas bajas
<b>AST</b>	Aspartato transaminasa	<b>HMGB1</b>	Proteínas de alta movilidad de caja del grupo 1
<b>AU</b>	Ácido úrico	<b>HOMA</b>	Índice de modelo homeostático
<b>BSA</b>	Albúmina bovina sérica	<b>HOMA-IR</b>	Índice de modelo homeostático para resistencia a la insulina
<b>CEL</b>	Carboxi-etil lisina	<b>IL1</b>	Interleucina 1
<b>CMA</b>	Carboxi-metil arginina	<b>iNOS</b>	Sintetasa de óxido nítrico inducible
<b>CMC</b>	Carboxi-metil citosina	<b>INPer</b>	Instituto Nacional de Perinatología
<b>CML</b>	Carboxi-metil lisina	<b>INS</b>	Insulina
<b>CML-BSA</b>	Albúmina sérica bovina modificada por carboxi-metil lisina	<b>IR</b>	Resistencia a la insulina
<b>COL</b>	Colesterol	<b>IUGR</b>	Restricción del crecimiento intrauterino
<b>CREAT</b>	Creatinina	<b>JAK/STAT</b>	Janus cinasa y activador de la transcripción y transductor de señales
<b>DAMPs</b>	Patrones moleculares asociados a daño		
<b>DDOST</b>	Gen codificante para AGE-R1		
<b>ELISA</b>	Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas		

<b>JNK</b>	Cinasa c-Jun N-terminal	<b>NO<sup>2-</sup></b>	Ión nitrito
<b>LDH</b>	Lactato deshidrogenasa	<b>NOX</b>	NADPH oxidasa
<b>LDL</b>	Lipoproteínas de baja densidad	<b>PA</b>	Presión arterial
<b>LGALS3</b>	Gen codificante para AGE-R3	<b>PBS</b>	Solución salina amortiguadora de fosfatos
<b>Mac1</b>	Antígeno 1 de macrófagos	<b>PE</b>	Preeclampsia
<b>MAPK</b>	Protein cinasas activadas por mitógenos	<b>PM</b>	Peso molecular
<b>MG</b>	Metilglioxal	<b>POD</b>	Peroxidasa
<b>MOLD</b>	Dímeros de lisina y metal-glioxal	<b>PRKCSH</b>	Gen codificante para AGE-R2
<b>MPTP</b>	Poros de transición de permeabilidad mitocondrial	<b>PRR</b>	Receptor de reconocimiento de patrones
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucleico mensajero	<b>RAGE</b>	Receptor para AGEs de la familia de inmunoglobulinas
<b>mtDNA</b>	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial	<b>RIA</b>	Radioinmunoensayo
<b>NADP+</b>	Nicotinamida adenin dinucleótido fosfato oxidado	<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenin dinucleótido fosfato reducido	<b>RT-PCR</b>	Transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa
<b>NeonatCTR</b>	Grupo de neonatos control	<b>S100</b>	Proteína S100 de unión a Ca <sup>2+</sup>
<b>NeonatPE</b>	Grupo de neonatos de embarazo con preeclampsia	<b>Th1</b>	Tipo de respuesta inmune proinflamatoria
<b>NFκB</b>	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas	<b>Th17</b>	Tipo de respuesta inmune proapoptótica y proinflamatoria
<b>NO</b>	Óxido nítrico	<b>TNFα</b>	Factor de necrosis tumoral alfa
		<b>TG</b>	Triglicéridos

# 1. RESUMEN

La acumulación de productos finales de glicación avanzada (AGEs) en el cuerpo humano está asociada a un aumento en el estrés oxidativo y a la disfunción endotelial en padecimientos que se caracterizan por presentar un estado inflamatorio exacerbado, aún en condiciones de normoglicemia. Un desorden obstétrico que presenta estas características es la preeclampsia (PE), donde la acumulación de AGEs se ha demostrado en tejido placental y en suero. En este trabajo se determinaron los niveles de AGEs plasmáticos en mujeres con embarazo normoevolutivo (n=28) y sus neonatos (n=18) y en pacientes diagnosticadas con PE (n=15) y sus neonatos (n=8). Los niveles plasmáticos de AGEs totales (intactos + parcialmente degradados) y solo de AGEs intactos se determinaron mediante ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y radioinmunoensayo (RIA) respectivamente. Todas las muestras se obtuvieron previo consentimiento informado de embarazos con 35 a 40 semanas de gestación atendidos en el Instituto Nacional de Perinatología entre 2015-2017. Los niveles plasmáticos de AGEs totales en mujeres con PE fueron significativamente mayores con respecto a los observados en el grupo control ( $8.90 \pm 0.897$  U/mL vs  $5.90 \pm 0.72$  U/mL respectivamente), mientras entre los grupos de neonatos no existieron diferencias significativas. En cuanto a los niveles solo de AGEs intactos, estos no mostraron diferencias significativas en ninguno de los grupos de estudio. Adicionalmente, se realizó el análisis de correlación entre los niveles de AGEs totales y las variables clínicas, donde se observó una correlación positiva estadísticamente significativa entre los niveles plasmáticos de AGEs totales con los niveles de enzima gamma-glutamyl transferasa ( $r=0.75$ ), ácido úrico ( $r=0.81$ ), glucosa ( $r=0.62$ ), insulina ( $r=0.77$ ), y marcador de resistencia a la insulina en la homeostasis de la glucosa HOMA-IR ( $r=0.81$ ). Estos resultados sugieren que los niveles plasmáticos de AGEs totales en pacientes con PE, contribuyen a las manifestaciones clínicas que caracterizan el síndrome materno en esta enfermedad.

## 2. INTRODUCCIÓN

Los productos finales de glicación avanzada (AGEs por sus siglas en inglés: *Advanced Glycation End Products*) son un grupo heterogéneo de compuestos constituido en su mayoría por proteínas glicadas [1] y constituyen junto con ciertos receptores de la inmunidad innata (AGE-R1, AGE-R2 y AGE-R3), un sistema que permite establecer en el cuerpo humano un equilibrio entre la tasa de formación y la tasa de eliminación de proteínas de vida media larga [2].

Sin embargo, la acumulación excesiva de estos AGEs activa otras vías alternas de receptores de reconocimiento específicos o receptores para productos finales de glicación avanzada (RAGEs), que generan una respuesta inflamatoria asociada a estrés oxidativo, apoptosis y activación del endotelio vascular [3]. La activación de la vía RAGE-AGE en patologías caracterizadas por disfunción endotelial está ampliamente reportada, principalmente porque el endotelio vascular es un tejido en el cual los RAGEs están altamente expresados [4]. Se han encontrado altos niveles de AGEs circulantes en pacientes con lupus, enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y aterosclerosis, asma, artritis reumatoide, y las más estudiadas han sido las complicaciones vasculares asociadas a diabetes y fallo renal [5-11].

En el embarazo normal se sabe que en el tercer trimestre existe un aumento en los niveles de AGEs circulantes, que se atribuye tanto a la cantidad de proteínas circulantes de origen fetal en la circulación materna como a la glucemia fluctuante producto del aumento de resistencia a la insulina característico del embarazo [12]. Existen estudios de los niveles de glicación en complicaciones del embarazo como diabetes gestacional y parto prematuro, sin embargo, en cuanto a preeclampsia (PE) existen pocos estudios sobre los niveles de AGEs plasmáticos. Su impacto en la fisiopatología de esta enfermedad es aún desconocido y siendo éste el desorden obstétrico de mayor incidencia en el mundo, es necesario el estudio de cualquier factor que potencialmente contribuya a su aparición y al incremento de su incidencia.

En este trabajo se investigó la relación entre PE y los niveles plasmáticos de AGEs en gestantes mexicanas y neonatos que fueron atendidos en el Instituto Nacional de Perinatología entre 2015-2017. Además se estudió la correlación de estos niveles de glicación con algunos parámetros clínicos alterados en esta enfermedad.

Las determinaciones de AGEs totales, que consisten en AGEs intactos y AGEs parcialmente degradados, se realizaron mediante ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA), y para AGEs intactos únicamente, se realizó radioinmunoensayo (RIA). El estudio de la asociación entre los niveles de glicación y la PE puede, además de contribuir a entender los factores que desencadenan o agravan este padecimiento, explicar la evolución del daño en órganos antes de que los síntomas maternos se presenten, esto con el fin de contribuir a estudios posteriores que permitan diseñar estrategias para la detección temprana no invasiva y/o para el manejo terapéutico de las complicaciones sistémicas.

# 3. MARCO TEÓRICO

## 3.1. Productos finales de glicación avanzada (AGEs)

### 3.1.1. Definición de AGEs

Los productos finales de glicación avanzada (AGEs) son un grupo heterogéneo de compuestos que se forman por una reacción de glicación no enzimática conocida como reacción de *Maillard*, quien la describió por primera vez en 1912 [13]. Esta reacción se da por el ataque nucleofílico de un grupo amino, generalmente de los residuos de lisina, arginina e histidina de proteínas, contra un grupo aldehído reductor que generalmente proviene de un carbohidrato que puede ser glucosa, fructosa, triosas o sus correspondientes derivados fosforilados. Estos compuestos pueden ser formados de manera endógena o provenir de fuentes exógenas, principalmente a través de la dieta [14].

### 3.1.2. Formación de AGEs

Entre los carbohidratos que pueden ser fuente de glicación, la glucosa es la menos reactiva debido a que en solución, una alta proporción se encuentra en una configuración ciclada como hemiacetal (más del 99%) [15], su baja reactividad cuando está en esta configuración se asocia con su selección evolutiva como principal proveedora de energía. Sin embargo, cuando la glucemia o la oxidación en el medio se ve aumentada, se altera el equilibrio entre la forma extendida y la forma ciclada exponiendo los grupos carbonilo reductores y favoreciendo la formación de AGEs [16,17].

Otros carbohidratos fisiológicamente relevantes son la fructosa, que tiene un poder de glicación mayor comparado con la glucosa [18] y los azúcares fosfato, que a nivel

intracelular poseen una capacidad de glicación hasta 200 veces mayor que la glucosa dada su proporción en forma abierta [19]. También pueden contribuir a la glicación los niveles de sorbitol procedente de la vía de los polioles y los intermediarios de la vía de las hexosaminas [14].

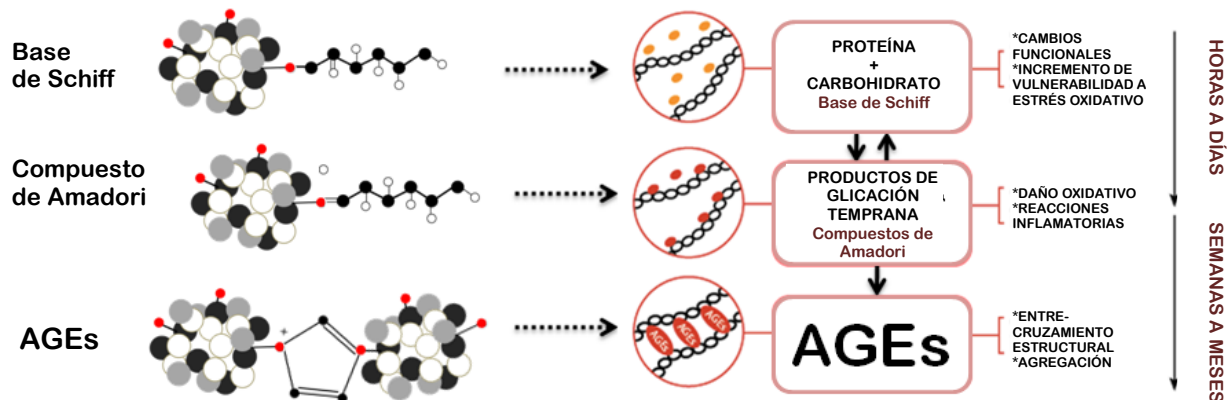
En cuanto a los sitios susceptibles de ser modificadas por glicación en proteínas, el grupo amino terminal es el más reactivo, seguido de los grupo amino de la cadena lateral de lisina y con menor reactividad, los grupos amino de los residuos de arginina e histidina [20,21]. Existen además de su reactividad intrínseca, otras condiciones para que se lleve a cabo la reacción de glicación como: la disponibilidad espacial de estos residuos dentro de la estructura tridimensional de la proteína y el entorno generado por los aminoácidos vecinos que determinan localmente la basicidad, cuanto más básico es el entorno de un grupo amino más fácilmente reaccionará con un grupo carbonilo cercano [4]; de la misma forma, la glicación se ve favorecida también si el entorno es altamente oxidante [22].

Además de la hemoglobina que sirve en su forma glicada como el marcador más conocido de hiperglicemia en la clínica [23], se ha observado glicación en proteínas como colágena, elastina, mielina, fibronectina, proteoglicanos, fibrinógeno, apolipoproteínas, inmunoglobulinas, albúmina y hasta insulina, entre otras [24-35].

Los AGEs se denominan productos finales de glicación avanzada debido a que para consolidar su formación, se llevan a cabo diferentes rearrreglos moleculares después de la reacción inicial de glicación. En la etapa inicial, la reacción de *Maillard*, conduce en horas a la formación de una imina o base de *Schiff*, el mecanismo de reacción consiste en un ataque nucleofílico de la amina sobre el carbonilo electrofílico del aldehído, formando un compuesto hemiaminal intermedio que al perder una molécula de agua forma la imina o base de *Schiff* [36]. Esta reacción depende de la temperatura, pH, agentes quelantes en el medio y principalmente de la concentración de reactivos, mientras estas concentraciones se mantengan altas la reacción se verá favorecida, pero si alguno de los reactivos disminuye, la reacción se revertirá [1].



Posteriormente se llevan a cabo rearrreglos moleculares, y en cuestión de semanas se forman los compuestos de *Amadori*, llamados así en honor del químico que los describió en 1929 [37], estos productos intermedios de glicación generalmente son cetoaminas o fructosaminas (Figura 1).



**Figura 1. Formación de AGEs.** Primero se forman los productos iniciales de glicación o bases de *Schiff* a partir de un grupo amino nucleofílico básico, que ataca al grupo carbonilo electrofílico, después se da la formación de cetoaminas, productos intermedios de glicación o productos de *Amadori* a partir de rearrreglos moleculares formando compuestos carbonílicos reactivos.

En este punto, otros compuestos reactivos importantes que contienen grupos carbonilo pueden tomar parte en el proceso, ejemplo de estos compuestos son: el glioxal (GO), la 3-desoxiglucosona (3DG) y el metilglioxal (MG), que son oxoaldehídos que se forman por la vía glucolítica [38]. Algunos de los intermediarios, se forman también por autooxidación de la glucosa [14], son lípidos peroxidados [39] o son productos de reacciones de la mieloperoxidasa en macrófagos cuando estos tienen alta actividad fagocítica [40].

Con el paso de los meses, se llevan a cabo interacciones adicionales entre los compuestos de Amadori, los intermediarios dicarbonílicos y los grupos funcionales de otras proteínas. A través de reacciones de oxidación, deshidratación, condensación y ciclación hay una acumulación de cargas negativas y se establecen uniones entre las

moléculas reactivas que terminan generando la consolidación de AGEs muy diversos [14].

La glicación ocurre preferentemente en proteínas de vida media larga [41], pero también ocurre con otras biomoléculas que presentan grupos funcionales capaces de reaccionar con un grupo aldehído como los lípidos [39] y los ácidos nucleicos [42].

En los lípidos que poseen grupos amino libres, se forman productos liposolubles con propiedades e inmunorreactividad característica de los AGEs; la formación de estos compuestos está asociada con la oxidación de ácidos grasos, en este caso los productos se denominan productos finales de lipoperoxidación avanzada (ALEs) [14].

En cuanto a los ácidos nucleicos, existen evidencias de que estos se pueden glicar en sus bases nitrogenadas, creando alteraciones en el patrón estructural; dado que los ácidos nucleicos son moléculas de larga vida en la célula en reposo, la acumulación de estos productos se ha propuesto como un mecanismo para la disminución de la viabilidad genética o los efectos debidos a los errores de reparación [42].

### **3.1.3. Propiedades y detección de AGEs**

Los AGEs son compuestos coloreados debido a la formación de melanoidinas que van desde el color amarillo hasta el color café marrón [43], se pueden detectar por espectrofotometría en la región visible en una longitud de onda de 380 a 420 nm, pero en general la espectrofotometría no es muy específica; algunos también presentan fluorescencia [44]. Una técnica que también se utiliza para su estudio es espectrometría de masas, sobre todo en muestras clínicas abundantes y en alimentos, sin embargo, la baja abundancia de glicoproteínas funcionales en muestras complejas genera problemas en las determinaciones [45].

Actualmente una característica que es muy utilizada para la detección de estos compuestos es su inmunorreactividad, ya que los AGEs son moléculas inmunogénicas

y existen anticuerpos comerciales para muchos de los AGEs más representativos. Los principales tipos de inmunoensayos son los ensayos de inmunoadsorción ligada a enzimas (ELISA) y los radioinmunoensayos (RIA), que permiten una detección y estimación rápidas desde péptidos glicosados hasta complejos moleculares completos, la prueba es muy sensible, se puede procesar un gran número de muestras simultáneamente y proporciona resultados rápidos. La desventaja es que la especificidad del anticuerpo a menudo impide conocer la concentración absoluta de AGEs presentes, ya que las unidades empleadas comúnmente se normalizan con respecto a una proteína glicosada de referencia estándar, que es generalmente albúmina glicosada sin tomar en cuenta la contribución de otras proteínas glicosadas.

Por otro lado, tanto para detectar la localización de AGEs como para estudiar sus receptores, se utiliza inmunofluorescencia que permite determinar patrones de glicosación en tejidos [46]. Las desventajas en este tipo de técnicas derivan de la necesidad de utilizar isótopos, debido a su peligro y a que es indispensable disponer de instalaciones adecuadas, son sensibles a las variaciones en la preparación de muestras y varían con el tipo de fluido o tejido usado.

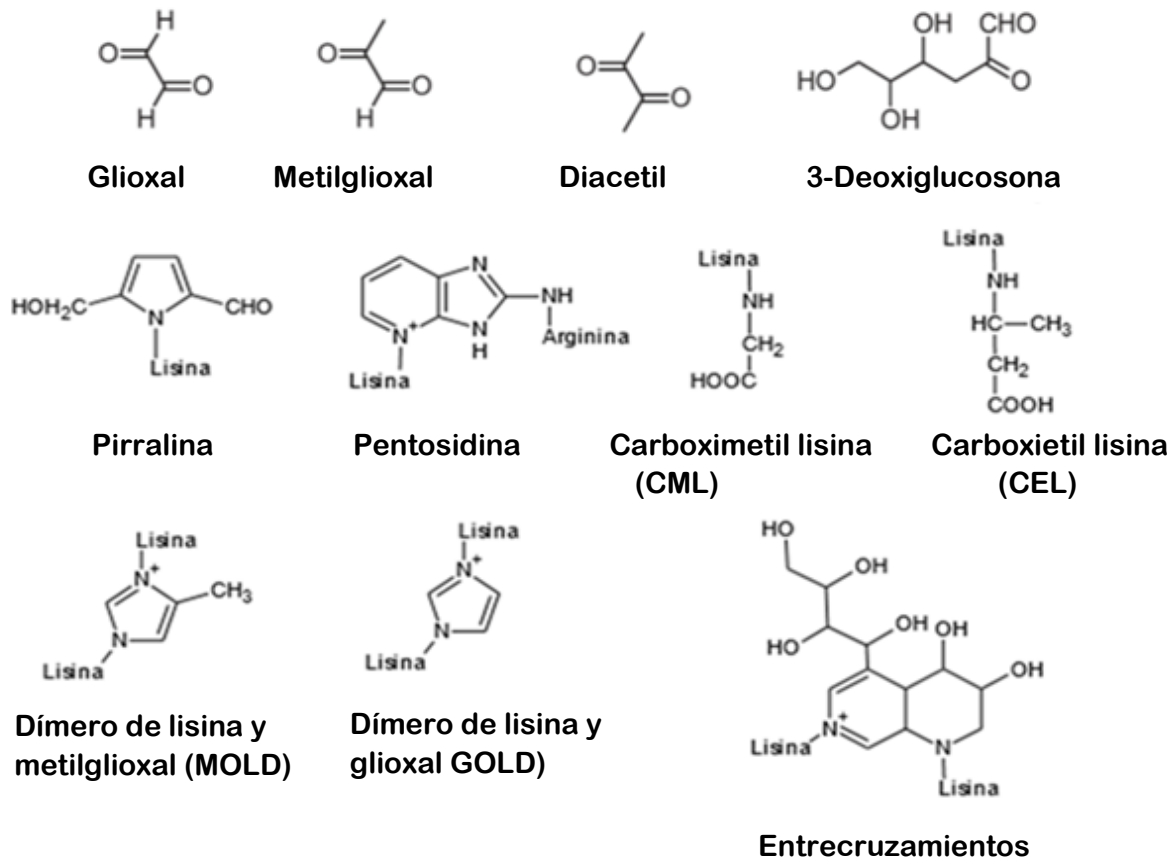
### **3.1.4. Tipos de AGEs**

En la actualidad se conoce la estructura de varios AGEs importantes (Figura 2), los de origen endógeno que se consideran más importantes son los formados con GO, MG Y 3DG, estos tres AGEs son productos del metabolismo que comúnmente se forman por enolización de compuestos de Amadori [38]. Su importancia radica en que, más del 90% del GO y MG presente en matrices biológicas se une covalentemente a residuos de cisteína, lisina y arginina [47,48].

Estos compuestos forman en ocasiones parte de complejos moleculares más grandes que involucran “puentes” entre dos o más proteínas como dímeros de glioxil-lisina (GOLD) o metilglioxil-lisina (MOLD) [49], que tienden a formar agregados que le confieren cierta rigidez al complejo o que favorecen su acumulación en los tejidos

generando grandes daños, lo que ha llevado a estudios que asocian esta acumulación con enfermedades como el Alzheimer o la esclerosis múltiple [6,7,50].

Los compuestos glicados se metabolizan por el sistema hepático de la glioxalasa y pueden a su vez ser intermediarios en otras reacciones con aminoácidos y generar otros AGEs con residuos modificados como carboximetil lisina (CML), carboxietil lisina (CEL) o carboximetil cisteína (CMC) [51].

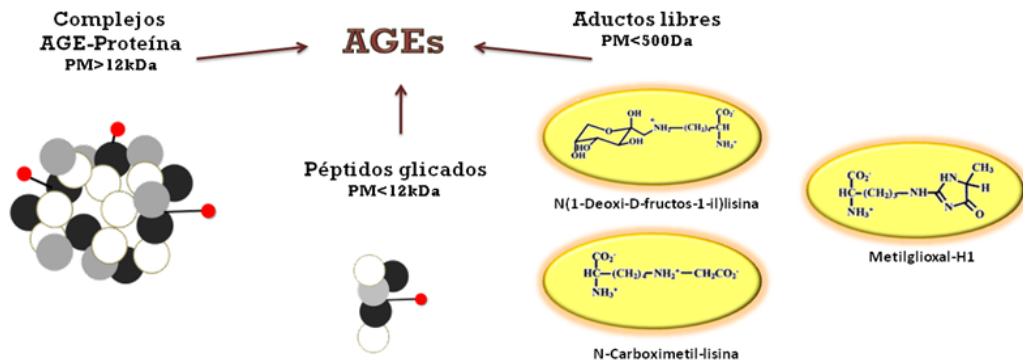


**Figura 2. Ejemplos de AGEs y sus precursores.** Algunas de las estructuras en la imagen, se consideran AGEs completos debido a que pueden unirse a receptores y desencadenar vías de señalización intracelular o bien pueden unirse a dominios de proteína formando complejos AGE-proteína. (Tomado de: Vistoli et al. Free Radical Res. 2013;47:3-27).

Un AGE de relevancia fisiológica es la pentosidina, un AGE fluorescente derivado de la ribosa, es muy estudiada debido a que forma enlaces cruzados fluorescentes característicos entre los residuos de arginina y lisina en la colágena [52]. Se ha

demostrado que CML y pentosidina son las principales estructuras de AGEs antigénicas asociadas a proteínas circulantes [53-55], por lo que la mayoría de los inmunoensayos comerciales miden la concentración de estos AGEs en forma de CML-BSA ó pentosidina-BSA [56].

Los AGEs evaluados en este trabajo, incluyen una serie de moléculas de muy distintos tamaños y pesos moleculares (Figura 3), que pueden ser desde complejos completos de proteínas glicadas en diferentes posiciones (PM > 12kDa), péptidos glicados que son residuos de proteínas que constan de solo algunos aminoácidos (PM < 12kDa), hasta moléculas glicadas libres muy pequeñas (PM < 500Da) que poseen un solo sitio de glicación [57].



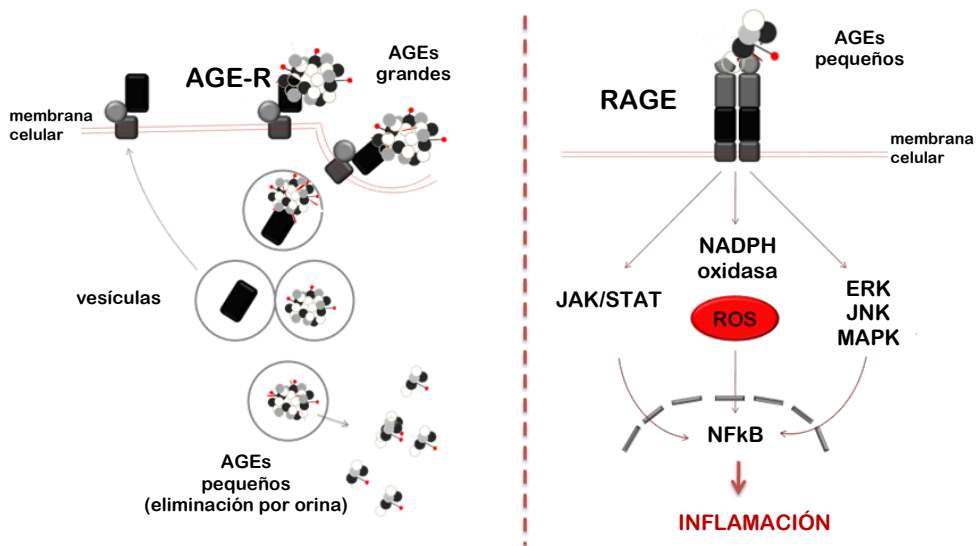
**Figura 3. Tamaño de los AGEs.** Se pueden considerar como AGEs, desde complejos glicados que constan de varias subunidades proteicas, hasta moléculas de muy bajo peso molecular.

### 3.1.5. Función fisiológica de los AGEs

Los AGEs son ligandos de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), son componentes del sistema inmune considerados como patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) [58]. En condiciones normales tienen una función depurativa pues sirven para reconocer a las proteínas de larga vida media que son susceptibles de salir de la circulación [2].

Se degradan por proteólisis mediada por el reconocimiento del complejo AGE-R, formado por AGE-R1 (DDOST), AGE-R2 (PRKCSH) y AGE-R3 (LGALS3) [59-61]. Los AGEs se procesan en endosomas y se convierten en péptidos solubles parcialmente degradados conocidos como AGEs de segunda generación que son de pequeño tamaño y salen de las células por difusión para ser excretados en orina [62], aunque si su concentración en circulación es muy alta, también pueden re-asociarse con otras moléculas para formar nuevos AGEs [63].

Además del complejo AGE-R, existen otros receptores que reconocen AGEs cuando la acumulación de estos compuestos en circulación aumenta; son receptores para AGEs de la superfamilia de las inmunoglobulinas (denominados RAGEs). Esta unión desencadena vías de señalización cuya consecuencia principal es la activación del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NFKB) [64], que es un factor de transcripción que regula genes que codifican para citocinas proinflamatorias, agentes apoptóticos y de activación celular. Otro efecto importante de la unión de AGEs a RAGE, es la activación de NADPH oxidasa (NOX) que cataliza la oxidación del NADPH a  $\text{NADP}^+$ , produciendo radical superóxido [65] (Figura 4).



**Figura 4. Unión de AGEs a sus receptores.** A: El receptor RAGE propicia la formación de ROS mediada por NADPH oxidasa y la activación de factores de transcripción, cuyos genes blanco desencadenan respuestas de tipo inflamatorio. B: El complejo AGE-R internaliza, degrada y finalmente libera los AGEs para su excreción en orina. (Modificada de: Ott et al. Redox Biol. 2014;2:411-429).

Aunque los principales ligandos de RAGE son CML, pentosidina y MGO [54,55], al ser PRRs receptores que reconocen patrones moleculares, los AGEs no son sus ligandos exclusivos, también reconocen otros DAMPs como proteínas de alta movilidad de caja del grupo 1 (HMGB1), proteínas S100, proteínas  $\beta$ -amiloides y antígenos 1 de macrófagos (Mac1) [66]. También se unen a precursores de AGEs y proteínas que han sido modificadas por CML aun cuando ya no estén formando el complejo completo [67].

Existen reportes que sugieren una posible relación inversa entre la vía de detoxificación del complejo AGE-R y la vía de señalización RAGE activada por altos niveles de glicación. Cuando la vía AGE-RAGEs se activa, se ha demostrado que la vía constituida por el complejo AGE-R (1, 2 y 3) se inactiva, generando una mayor acumulación de compuestos tóxicos [68]. La expresión y función de AGE-R demostró estar suprimido en células mesangiales [69], en macrófagos de ratones diabéticos no obesos [70], y en células mononucleares circulantes de sujetos diabéticos con altos niveles de AGEs y nefropatía severa [71].

Los autores de estos estudios proponen que los niveles de AGEs totales puede exceder el límite de saturación del receptor, lo que puede dar como resultado el secuestro citoplasmático o la regulación negativa de este sistema. Este hallazgo es importante porque sugiere una posible relación inversa entre la vía de detoxificación del complejo AGE-R y la vía de señalización RAGE activada por altos niveles de glicación, es decir, al aumentar los niveles de AGEs circulantes, lejos de activarse vías de detoxificación que los saquen de circulación, aumentan las respuestas de citocinas, adhesión celular y apoptosis.

Si los niveles de AGEs se mantienen altos, los procesos inflamatorios se perpetúan. RAGE posee secuencias motivo para NF $\kappa$ B [72], y como este factor es un regulador transcripcional del receptor que lo activa, mientras los niveles de AGEs no desciendan la vía de señalización permanece activada.

Cabe mencionar que la vía RAGE puede ser también benéfica para el organismo dependiendo del tipo celular del que se trate, por ejemplo en neuronas, una activación no crónica de RAGE por unión a sus ligandos aumenta la resistencia a apoptosis, favoreciendo la estimulación y la activación celular [73]. También se ha demostrado que a pesar de no expresarse normalmente en adultos en músculo esquelético, en caso de existir un daño que necesite reparación, RAGE se expresa en células satélite musculares generando proliferación, activándolas y dando lugar a los mioblastos que pueden reparar el daño [74].

La activación de los receptores que reconocen AGEs depende de su localización y de los niveles de AGEs circulantes. En cuanto a los AGEs en circulación, aunque existe alta variabilidad en los estudios debido principalmente a la heterogeneidad de estos compuestos, una concentración normal reportada de AGEs en suero de adultos está entre  $3.3 \pm 1.0$  U/mL a  $11.4 \pm 2.9$  U/mL [75,1], midiendo principalmente aductos formados con CML. La variación en estas concentraciones es la que activa los receptores asociados a inflamación y estrés oxidativo en tejidos y células que tienen contacto con la circulación, estas concentraciones también varían de acuerdo a la edad y el estado de salud del individuo.

## **3.2. Importancia médica**

### **3.2.1. AGEs en envejecimiento y enfermedad**

Generalmente, en procesos normales de envejecimiento, la cantidad de AGEs, sobre todo en circulación aumenta con la edad, haciéndolos buenos marcadores de envejecimiento [76]. Una explicación a este fenómeno podría ser que la glicación de proteínas ocurre constantemente y la tasa de degradación de los AGEs es relativamente baja propiciando su acumulación con el transcurrir de los años, además la eliminación incompleta de las proteínas AGE por los macrófagos puede en última instancia dar lugar a algunos de los cambios fisiológicos que se producen con el envejecimiento normal.



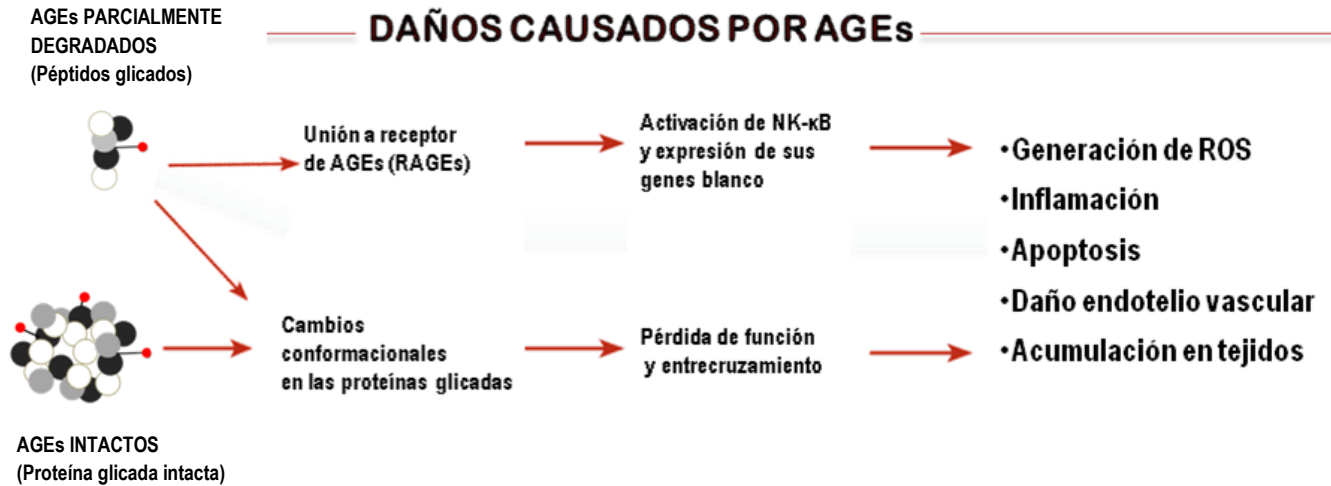
También los hábitos de vida influyen en los niveles de AGEs, se han realizado numerosos estudios que correlacionan ciertos hábitos saludables con bajos niveles de AGEs (actividad física, no fumar, no tomar alcohol, dormir lo suficiente, bajo nivel de estrés mental, desayunar y abstenerse de comer azúcares añadidos y un exceso de comida procesada) [77,78], de hecho muchos efectos sistémicos en hiperglicemia tienen las mismas características que el envejecimiento prematuro ocasionado por malos hábitos de vida.

Actualmente el principal enfoque de estudio de AGEs a nivel mundial está relacionado con la diabetes, debido a su alta prevalencia mundial que era de 8.5% hasta 2014 [79]. La dieta occidental actual es una exacerbada fuente de carbohidratos y de AGEs. En la fabricación de alimentos procesados, muchos aromatizantes y saborizantes son AGEs, lo que explica el alarmante aumento en la incidencia de la diabetes mellitus.

Entre varios mecanismos propuestos, hay evidencias que indican que la glicación conduce a modificaciones químicas de las proteínas que contribuyen a la patogénesis de las complicaciones diabéticas y que la concentración de AGEs está directamente relacionada con la duración de la diabetes y con la severidad del daño vascular [11]. Las implicaciones van desde daños estructurales a proteínas de matriz extracelular, daños reológicos en el flujo sanguíneo generado por daños estructurales en las proteínas circulantes, activación de vías alternas como la vía de los polioles, activación de la protein cinasa C, aumento de estrés oxidativo, disfunción endotelial y daño renal [80].

### **3.2.2. Daños causados por AGEs**

La manera en que los AGEs afectan la función celular normal es mediante dos mecanismos: induciendo cambios conformacionales en las proteínas afectando su función y favoreciendo su acumulación [81], o desencadenando cascadas de señalización al unirse a RAGE, que como ya se mencionó, promueve el estrés oxidante, la inflamación y la apoptosis (Figura 5).



**Figura 5. Como causan daño los AGEs.** Los daños causados por AGEs son mediados por la unión a receptores para AGEs (RAGEs) o por los daños estructurales causados en los tejidos por acumulación y pérdida de función proteica, se observa que el mecanismo depende principalmente del tamaño de los AGEs predominantes.

Está demostrado que una vez formados los AGEs, estos son muy estables y se acumulan tanto dentro como fuera de las células, afectando proteínas de la membrana plasmática, proteínas circulantes y sobre todo proteínas de la matriz extracelular. La formación de hemoglobina glicosada dentro de los eritrocitos es el mejor ejemplo, cuando los valores de esta hemoglobina son altos de manera crónica, se ve disminuida la fluidez de estos eritrocitos, también disminuye su potencial de membrana y su nivel antioxidante y aumenta su resistencia a los cambios térmicos [82]. Todo esto afecta sus propiedades reológicas y genera problemas vasculares en los pacientes; otros ejemplos son la alteración en el transporte de lípidos cuando se glican las apolipoproteínas [83], la disminución de la respuesta inmune cuando se glican inmunoglobinas [84] o la disminución de la sensibilidad a la insulina cuando la insulina está glicosada [35].

Adicional a la pérdida de funcionalidad que las proteínas circulantes glicosadas sufren, los altos niveles de AGEs activan la vía RAGE, que estimula la producción de ROS induciendo daño mitocondrial, produciendo la inhibición de la transferencia de electrones y finalmente la apoptosis por la activación de la vía extrínseca. A nivel mitocondrial también pueden generar un aumento en los niveles de  $Ca^{2+}$  afectando el

potencial de membrana y causando daño a la integridad de la estructura mitocondrial [85]. Existen diversas patologías y procesos relacionados con la acumulación de AGEs, que causan un gran espectro de efectos principalmente por la activación de la vía RAGE, aunque el efecto siempre depende del tejido estudiado [86].

### **3.2.3. AGEs como fuente de disfunción vascular**

El incremento en los niveles de AGEs circulantes se encuentra asociados a aumento en estrés oxidativo, expresión de moléculas proinflamatorias, aumento en la adhesión celular, apoptosis, pérdida de función de proteínas circulantes y alteraciones en la reología del flujo sanguíneo; todas estas alteraciones generan disfunción en el endotelio vascular [87,88], que es la fuente de los daños en la micro y macrovasculatura característicos de trastornos metabólicos como la diabetes.

Es interesante notar que también se han observado altos niveles de AGEs en normoglicemia, en estos casos se ha visto que los efectos dañinos en la vasculatura causados por AGEs están relacionados más bien con un incremento de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y una disminución de lipoproteínas de alta densidad (HDL) [89], un aumento de ROS, la activación de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) [90], y un decremento del óxido nítrico (NO) disponible (91), así como con la expresión de proteínas procoagulantes y vasoconstrictoras, hipoxia y daños de tipo isquemia-reperfusion.

En la aterosclerosis en diferentes modelos animales, se ha observado que la expresión de RAGE está aumentada en fibroateromas en arterias [92], células endoteliales aórticas [93] y tejido de músculo cardíaco [94]. Uno de los estímulos para la disfunción endotelial cuando existe inflamación, es la hiperlipidemia, y al tener los productos de lipoperoxidación ALEs las mismas características estructurales que los AGEs, la activación puede darse por los mismos receptores. Además, después de la entrada de lipoproteínas en la pared del vaso, su rápida modificación da como resultado la generación de epítopes de AGEs y la posterior infiltración de células inflamatorias,

que liberan el receptor de los ligandos del producto final de glicación avanzada (RAGE) en los tejidos y así se sigue generando inflamación que favorece la acumulación de lípidos [95].

### **3.2.4. AGEs y sus efectos placentarios**

Durante el embarazo, la vasculatura sufre remodelación y cambios adaptativos que hacen que la etapa de gestación sea considerada como la prueba de estrés fisiológico más grande que sufre una mujer durante su vida. Son tan importantes los cambios vasculares y la capacidad del cuerpo para enfrentarlos, que se sabe que sus efectos pueden influir en la salud de la madre durante toda la vida y pueden generar programaciones metabólicas que afectan la salud del producto hasta la adultez. En el embarazo, tanto la circulación materna como la circulación fetal están íntimamente ligadas a la placenta como órgano de perfusión y transporte, de ahí la importancia en estudiar como se ve afectado este órgano y su vasculatura durante la gestación por factores circulantes que podrían ser clave en el establecimiento y alteración de la circulación durante el embarazo.

En cuanto a los AGEs, se ha reportado que estimulan la secreción de quimiocinas, inducen apoptosis y suprimen la producción de gonadotropina corionica humana (hCG) en trofoblastos aislados del primer trimestre [96], en otro estudio se ha inducido apoptosis y activación de procoagulantes en cultivos de endotelio de venas umbilicales humanas [97] y en este mismo tejido se ha encontrado que los AGEs pueden generar ROS, de acuerdo con la concentración y el tiempo de incubación [98]. Esto sugiere que el aumento de AGEs puede asociarse a un aumento en la apoptosis, causando más estrés oxidativo e inflamación en general en el sistema de la madre en trastornos obstétricos [99].

Por otro lado, la expresión del receptor RAGE se ha reconocido en la mayoría de los tejidos relacionados con el lecho placentario. Se detectó una intensidad de marcaje

importante en decidua, en placenta, en el músculo liso del miometrio y en las células del endotelio [100-102].

Una de las enfermedades placentarias que cursan con el tipo de daño endotelial que conjunta la disfunción vascular, inflamación sistémica, altos niveles de estrés oxidativo, gran cantidad de liberación de microvesículas por apoptosis y alteración en proteínas de matriz extracelular es la preeclampsia (PE). En esta enfermedad la placenta tiene un papel fundamental, puesto que los signos y síntomas clínicos desaparecen una vez que se interrumpe el embarazo, además la PE se caracteriza por un desarrollo deficiente de este órgano, con una invasión endovascular superficial del trofoblasto y una remodelación inadecuada de las arterias espirales de la decidua y el miometrio [103]. Las características clínicas de la PE, convergen en gran medida con los efectos placentarios observados por la acumulación de AGEs en este tejido, por esto es factible pensar que puede existir una relación entre la glicación de proteínas y el desarrollo de la disfunción del endotelio vascular que se presenta en la PE.

### **3.3. Preeclampsia**

#### **3.3.1. Definición e incidencia de la PE**

La PE es uno de los trastornos obstétricos con mayor incidencia, afecta del 2% al 8% de los embarazos [104] y es la principal causa de muerte materna tanto en México como en el mundo [105]. Se calcula que alrededor del 23% de muertes maternas en México se deben a este padecimiento [106]. Las pacientes con PE dejan de presentar los síntomas cuando se interrumpe el embarazo, que generalmente es la estrategia terapéutica [107], lo cual previene complicaciones graves como derrames cerebrales, edema pulmonar, daño renal, síndrome HELLPS (por sus siglas *Hemolysis, Elevated Liver enzymes or Low Platelet counts*) o eclampsia.

### 3.3.2. Diagnóstico de PE

El estándar para la detección de PE es la presencia de presión arterial (PA) con valores mayores a 140 mmHg para la presión sistólica y/o mayores a 90 mmHg para la presión diastólica y proteinuria sustancial ( $\geq 300$  mg en 24 h) a partir de la semana 20 de gestación en una mujer que era normotensa antes del embarazo [108]. Se puede catalogar la PE como leve o severa de acuerdo a ciertos parámetros. En general se acepta que la PE es leve si la presión no supera valores de 160/110 mmHg, la proteinuria no supera 2 g en 24 h y no aparece ninguno de los criterios de severidad como trombocitopenia, alteración de la función hepática, insuficiencia renal progresiva, edema pulmonar, trastornos cerebrales o visuales de nuevo comienzo [109] (Tabla 1).

**Tabla 1.** Criterios clínicos para el diagnóstico de PE

<b>LEVE</b>	<p><b>PA <math>\geq</math> 140/90 mmHg</b>  <b>en dos ocasiones separadas por al menos 4 horas</b>  <b>después de la semana 20 de gestación en una paciente previamente normotensa</b></p> <p><b>Y</b></p> <p><b>Proteinuria <math>\geq</math> 0.3 g en 24 h medida en orina</b>  <b>o tasa proteína/creatinina <math>\geq</math> 0.3 (mg/mg)</b></p>
<b>SEVERA</b>	<p><b>O</b></p> <p><b>Nueva aparición de hipertensión con nueva aparición de cualquiera de los siguientes síntomas (con o sin proteinuria):</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Conteo de plaquetas &lt; 100,000/<math>\mu</math>L</li> <li>• Creatinina sérica &gt; 1.1 mg/dL</li> <li>• Transaminasas hepáticas al menos dos veces por arriba del límite de concentración normal que utilice el laboratorio local</li> <li>• Edema pulmonar</li> <li>• Síntomas cerebrales o visuales (ej. Dolor de cabeza persistente que no responda a analgésicos, visión borrosa, parpadeos con luces, etc.)</li> </ul>

En México, la Secretaría de Salud se basa en directrices establecidas por el American College of Obstetricians and Gynecologists [108,109]. Los criterios a seguir se encuentran en el Lineamiento Técnico de la SSA (Secretaría de Salud, 2017) [108].

La detección oportuna de la PE es difícil, principalmente por el hecho de que muchas mujeres presentan una constelación de signos y síntomas en ocasiones inconsistentes con los criterios de diagnóstico. De hecho, algunas mujeres que desarrollan hipertensión gestacional severa sin proteinuria tienen una mayor morbilidad materna y perinatal que aquellas con una PE leve [110,111]. Además, la hipertensión y/o proteinuria están ausentes en 10 a 20% de las mujeres que desarrollan el síndrome HELLPs [112] y en el 38% de las mujeres que desarrollan eclampsia [113], al menos en reportes en Estados Unidos y Europa.

### **3.3.3. Etiología de la PE**

En la PE contribuyen tanto genes maternos como fetales [114], sin embargo, las teorías de un origen genético no se han establecido totalmente. Existen diversos factores de riesgo como la edad de la madre, gestaciones múltiples o primer embarazo, enfermedades asociadas (autoinmunes o metabólicas), factores ambientales, dieta o estilo de vida, entre otros [115]. Aunque existen avances significativos, los mecanismos celulares y bioquímicos que llevan a complicaciones sistémicas en la PE no se han elucidado totalmente.

Aunque su etiología es desconocida, diversos estudios han proporcionado suficiente evidencia para considerar que los factores que atribuyen o explican sus características, basándose en un trastorno endotelial subyacente provocado por una deficiente remodelación de las arterias espirales durante el proceso de implantación del embrión son acertados [116]. Se cree que el paso inicial es la isquemia placentaria resultante de una invasión inadecuada del trofoblasto debido a arterias espirales uterinas insuficientemente remodeladas, lo que conduce a una presión de perfusión útero-placentaria reducida y a un daño de tipo isquemia reperusión en la placenta [117]. La

isquemia placentaria induce la liberación de factores biológicamente activos tales como factores antiangiogénicos, citocinas inflamatorias, ROS y factores inducibles por hipoxia [118,119]. Estos factores causan disfunción vascular y el consiguiente aumento de la resistencia vascular y presión sanguínea, así como la endoteliosis glomerular que provoca la proteinuria. Esta disfunción endotelial, también ocasiona cambios en la composición de la matriz extracelular y la actividad de las metaloproteinasas de matriz que promueven la deficiente remodelación vascular y una mayor vasoconstricción en la circulación sistémica y uterina [120].

En cuanto a la respuesta inmune, las mujeres con PE tienen niveles más altos de monocitos no clásicos e intermedios y niveles más bajos de células dendríticas linfoides, es decir, predomina la respuesta inmune innata. Los cambios en los subconjuntos de células T que pueden observarse en la PE incluyen baja actividad de linfocitos T reguladores, un cambio hacia respuestas de tipo Th1 y el aumento de expresión de receptores de la inmunidad innata comparados con un embarazo normal [121].

#### **3.3.4. PE como enfermedad vascular**

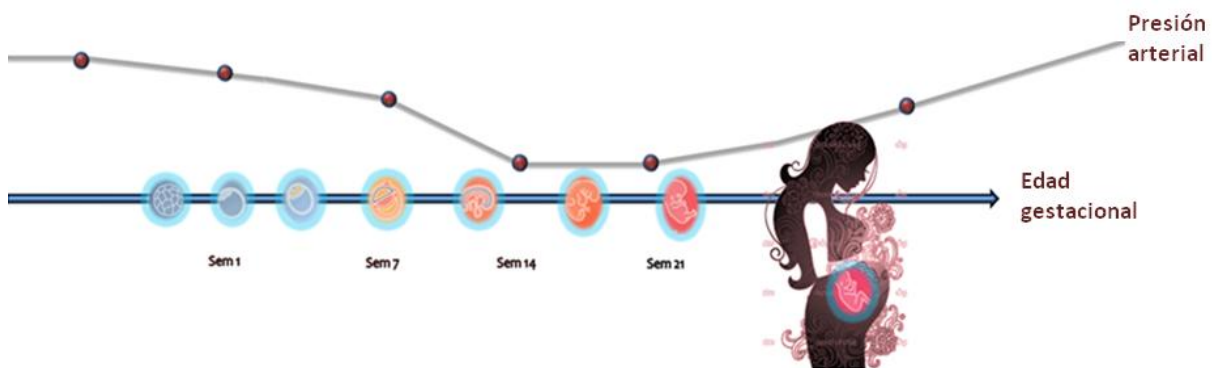
Una de las dificultades en el estudio de la PE ha sido separar la iniciación de eventos relacionados con factores etiológicos de aquellos que podrían atribuirse a mecanismos compensatorios destinados a mantener la homeostasis materna y fetal. Por ejemplo, el aumento en la PA en la madre puede desarrollarse como causa o como consecuencia de una perfusión placentaria deficiente.

Al inicio del embarazo la PA disminuye con el fin de favorecer los procesos de implantación y placentación que darán lugar al establecimiento de la circulación útero placentaria. El proceso de placentación, inicia desde antes de la implantación y se considera terminado hasta que la circulación útero placental está totalmente establecida [122].



La PA en embarazos normales vuelve a sus valores normales alrededor de la mitad del segundo trimestre, pero en PE es en este momento cuando la invasión trofoblástica defectuosa se manifiesta en la embarazada como una resistencia vascular periférica aumentada. De ahí que los síntomas maternos característicos de la PE se inicien alrededor de la semana 20, cuando ya se ha desarrollado un daño fetal por reperusión durante todo el transcurso del primer trimestre (Figura 6).

La característica subyacente en la PE es una activación generalizada del endotelio materno y la presencia de niveles alterados de factores angiogénicos. Se ha demostrado que estos factores pueden perturbar la función de las células endoteliales *in vitro* [123]. A nivel estructural, las proteínas involucradas en la remodelación vascular como colágeno, proteoglicanos y componentes de matriz extracelular se encuentran alteradas [124].



**Figura 6. Cambios en la presión arterial (PA) durante el embarazo.** Hasta aproximadamente la semana 14 la PA disminuye para favorecer el establecimiento de la circulación útero-placentar, y alrededor de la semana 20 comienza a aumentar hasta alcanzar los niveles originales en el embarazo normal. En la PE es en la semana 20 en donde se comienzan a manifestar las alteraciones como hipertensión y proteinuria producto de una defectuosa remodelación de las arterias espirales. (Modificada de: Gardner & Shoback: Greenspan. Endocrinología básica y clínica, 9ed. Mc Gaw-Hill. 2011).

También se ha demostrado que la mayoría de los daños asociados a la disfunción endotelial por glicación ocurre en tejidos y órganos ricos en colágeno, tal es el caso del riñón y el endotelio vascular. Las mujeres con PE pueden desarrollar endoteliosis glomerular y tumefacción de endotelio glomerular mostrando depósitos de fibrina dentro de células mesangiales, y afectación estructural de los proteoglicanos, lo cual da origen al daño renal y la proteinuria característica en este padecimiento [125,126].

Por otro lado, cuando las células endoteliales cultivadas se incuban con muestras de suero o plasma de mujeres con PE, se ha observado que desarrollan una característica endoteliosis y una proliferación anormal en comparación con grupos control [127,128].

Esto ha propiciado que algunos investigadores propongan un amplio repertorio de factores circulantes que afectan las propiedades estructurales del endotelio vascular como posibles marcadores de PE [129,130], sin embargo, ninguno por sí solo ha demostrado tener la especificidad y la sensibilidad necesaria para constituirse como un biomarcador confiable, las propuestas se enfocan en torno al desarrollo de algoritmos formados con combinaciones de estos dependiendo del tiempo de gestación.

### **3.3.5 Activación de receptores de AGEs en PE**

Existe una fuerte evidencia de que la activación del sistema inmune contribuye al desarrollo de la PE [121], y el receptor RAGE al ser un PRR, participa de esta respuesta inmune innata. La activación de este receptor se ha observado aumentada en PE [131] y una de las primeras consecuencias de la activación de esta vía es la generación de ROS en el entorno placentario por la activación de NOX, en este caso las mitocondrias placentarias son la principal fuente y a su vez blanco de este estrés oxidativo [132]. Al verse dañadas las mitocondrias, se genera una isquemia e hipoxia placentarias que podrían participar en la patogénesis de la PE.

Existen evidencias experimentales de que en mitocondrias trofoblásticas tratadas con ligandos de RAGE, el potencial de la membrana mitocondrial es significativamente menor, los poros de transición de permeabilidad mitocondrial (MPTP) están significativamente más abiertos y la cantidad de mtDNA se incrementa significativamente [133,134], esta permeabilidad mitocondrial induce apoptosis y a su vez la liberación de microvesículas y DNA, lo cual fomenta la inflamación sistémica en la paciente preecláptica.

Una de las principales moléculas que aumenta su expresión gracias a la activación de RAGE, es TNF $\alpha$  que además de ser una de las principales moléculas proinflamatorias, ha demostrado que junto al aumento de ROS, afecta la señalización de vías metabólicas importantes durante el embarazo, como la de señalización de insulina [135-137].

## 3.4. Antecedentes

### 3.4.1. Estudios previos sobre niveles de AGEs en PE

Existen varios estudios que han comparado los niveles de AGEs en pacientes con PE y en mujeres con embarazo sano, algunas determinaciones se han hecho en suero, en líquido amniótico y otras en tejidos. En la investigación documental, solo uno de los estudios encontrados determina los niveles de AGEs en plasma, y también incluye correlaciones de los niveles de AGEs con ácido úrico (AU). Este estudio realizado por *Tsukimori* y col. en Japón en 2008 midió los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y de proteínas carboniladas (AGEs) en mujeres con PE (n=17) y controles (n=14), encontrando un aumento en AGEs en PE con respecto al grupo control (7.72 $\pm$ 4.1 nmol/mg vs 2.85 $\pm$ 3.06 nmol/lg), además de una correlación positiva entre AGEs y AU [138].

En suero, el estudio más citado es el de *Chekir* y col., realizado en 2006 en Japón; este grupo midió los niveles séricos de AGEs en pacientes con PE (n=10), en mujeres sin embarazo (n=10) y en embarazos control (n=10) mediante ELISA; también midieron AGEs, RAGE y marcadores de estrés oxidativo (4-hidroxinonenal y 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina) mediante *western blot* e inmunohistoquímica en placenta de grupos con PE y grupos control [139]. Encontraron que los niveles de AGEs en suero de mujeres con PE fueron significativamente mayores que en mujeres embarazadas sanas (157.8 $\pm$ 51.9% vs 116.6 $\pm$ 31.6% respectivamente, los porcentajes están expresados en relación a un valor encontrado en mujeres sanas sin embarazo como 100%). También el nivel de AGEs y la expresión de RAGE en la placenta preecláptica fueron

significativamente mayores que en la placenta normal, así como los niveles de marcadores de estrés oxidativo.

En el mismo año, *Blaauw* y col. en los Países Bajos, detectaron mediante fluorescencia en la piel, niveles altos de AGEs en pacientes con PE (n=26) comparados con los de pacientes con embarazo normal (n=17). Es interesante el hecho de que este grupo correlacionó este aumento de AGEs con variables metabólicas, perfiles de lípidos, hábitos de tabaquismo y diámetro de arteria carótida y femorales. En el grupo con PE, los niveles de AGEs fueron mayores, así como la resistencia a la insulina y el grosor de las arterias. La fluorescencia se correlacionó positivamente con los niveles de tabaquismo y con el grosor de las arterias [140].

Otro grupo, también liderado por *Blaauw* en el mismo país, realizó en 2011 un estudio de medición de fluorescencia de la piel en pacientes que habían sufrido PE severa en su embarazo hacía 4 años y lo relacionó con marcadores de daño cardiovascular como proteína C reactiva, hipertensión y triglicéridos altos [141]. Los niveles de AGEs medidos por fluorescencia fueron mayores en mujeres que habían cursado con PE en sus embarazos comparados con mujeres que tuvieron embarazos sanos, además todas las variables cardiovasculares se correlacionaron de manera positiva con los niveles de AGEs, lo que demuestra que el daño vascular sufrido durante la PE, puede prevalecer en la vasculatura de la mujer predisponiéndola a enfermedades cardiovasculares mediadas por AGEs mucho tiempo después de la resolución del embarazo.

Particularmente en China, existen varios grupos de trabajo que se dedican a estudiar la relación de AGEs y sus receptores en PE. En 2015, *Yan J.* y *Jiang L.* cultivaron células trofoblásticas humanas de embarazo temprano que incubaron con suero de pacientes con PE; otro grupo de células se incubaron con AGEs (600 mg/L) y después se aplicó un ensayo de medición de fluorescencia para medir el potencial de membrana mitocondrial y ELISA para medir la actividad de MPTP. mtDNA fue detectado por RT-PCR. Los niveles de daño por estrés oxidativo de las mitocondrias en el grupo tratado con AGEs y con suero de PE fueron más altos que en el grupo control, el daño

oxidativo entre el cultivo incubado con suero de PE y el cultivo incubado con AGEs no presentó diferencia significativa [142].

En el mismo año *Xian* y col. estudiaron los niveles de AGEs, sRAGE y TNF $\alpha$  en suero materno y en placenta en un grupo de mujeres con PE (n=32) comparado con un grupo control de embarazo sano (n=30), la determinación la realizaron mediante ELISA. También hicieron inmunohistoquímica para AGEs y RAGEs en placenta y expresión placentaria mediante RT-PCR y *western blot*. Los niveles séricos de AGE, sRAGE y TNF- $\alpha$  fueron significativamente más altos en el grupo con PE que los del grupo control (AGEs: 454 $\pm$ 50 ng/L vs 538 $\pm$ 75 ng/L respectivamente). Los niveles de AGEs se correlacionaron positivamente con los niveles de TNF- $\alpha$ . Las proteínas que formaban AGEs y RAGE se encontraron localizadas principalmente en el sincitiotrofoblasto, en macrófagos y células endoteliales vasculares en las placentas de los dos grupos. La mayor cantidad de AGEs se presentaba principalmente en el citoplasma y RAGE estaba expresado en el citoplasma y las membranas celulares. Los mRNA de RAGE y TNF- $\alpha$  fueron significativamente más altos en el grupo con PE que en el grupo control [143].

También en 2015, resultados semejantes en cuanto a la expresión de RAGEs en PE, sumados a diabetes gestacional y restricción del crecimiento intrauterino (IUGR) fueron observados por *Alexander* y col. en Estados Unidos, usando las mismas técnicas de cultivo trofoblástico sometido a incubación con AGEs. En comparación con el control de la placenta, observaron una disminución de la expresión del gen RAGE durante la diabetes gestacional, un aumento de la proteína RAGE en la placenta con PE y la disminución de la proteína RAGE en la placenta con IUGR. En células de trofoblasto expuestas a AGEs, observaron disminución de la invasión de trofoblasto, aumento de JNK, de ERK y aumento en la secreción de TNF- $\alpha$  e IL -1 $\beta$  [144]. Estos resultados son interesantes porque muestran que la activación de RAGEs es relativamente específica para PE, al separar los resultados en cuanto a diabetes gestacional y IUGR, además de relacionar los efectos que los AGEs pueden tener sobre la invasión trofoblástica.

Asimismo, existen trabajos referidos a la relación entre la activación de la vía AGE-RAGE y los niveles de marcadores de estrés oxidativo y lipoperoxidación. Con respecto a la activación de RAGE y su presencia en tejidos específicos durante la PE, demuestran que este receptor está altamente expresado en pacientes con PE comparándolo con grupos control [102] y esto sugiere la presencia de altos niveles de AGEs circulantes.

Como se mencionó anteriormente, la unión de AGEs a su receptor, activa NFκB que es el factor transcripcional del mismo RAGE. Sin embargo, en estudios más recientes, en los cuales se determinan diferencialmente la expresión de genes mediante técnicas de microarreglos o secuenciación masiva estudiando directamente los transcritos, ya sea circulantes o en tejido, no se ha reportado que el transcrito que codifica para RAGE se encuentre aumentado en PE con respecto a grupos control [145-148].

Por otro lado, en un estudio de *Harsem* y col. en 2008 no encontraron cambios estadísticamente significativos en niveles de AGEs en embarazo normal y embarazo complicado con PE [149] y *Naruse* y col. en 2012, tampoco encontraron evidencia de cambios en niveles de AGEs séricos en el embarazo complicado con PE severa con respecto al embarazo normal [150].

## **4. PLANTEAMIENTO**

### **4.1. Problema**

La PE presenta alteraciones vasculares que se relacionan con un defectuoso proceso de implantación y placentación, pero las manifestaciones sistémicas en la madre se detectan tiempo después de que la circulación útero placental ya ha sido establecida, desafortunadamente la interrupción del embarazo es en la mayoría de los casos necesaria para evitar el avance de los procesos patológicos. Por ello ha surgido la necesidad de contar con marcadores bioquímicos de detección temprana y con agentes farmacológicos capaces de interferir el avance del daño a los tejidos iniciado por los procesos oxidativos, apoptóticos e inflamatorios. Esto no se puede lograr sin el entendimiento de los mecanismos bioquímicos subyacentes que permiten el progreso de las complicaciones sistémicas, las cuales coinciden con el tipo de daños característicos causados por glicación.

### **4.2. Hipótesis**

La hipótesis de la investigación presentada en esta tesis es que si la glicación no enzimática contribuye a las complicaciones sistémicas asociadas a PE, entonces los niveles plasmáticos de AGEs de pacientes preeclámpticas y sus neonatos, estarán aumentados con respecto a los niveles plasmáticos de AGEs de las gestantes con embarazo normoevolutivo y sus neonatos.

# 5. OBJETIVOS

## 5.1. Objetivo general

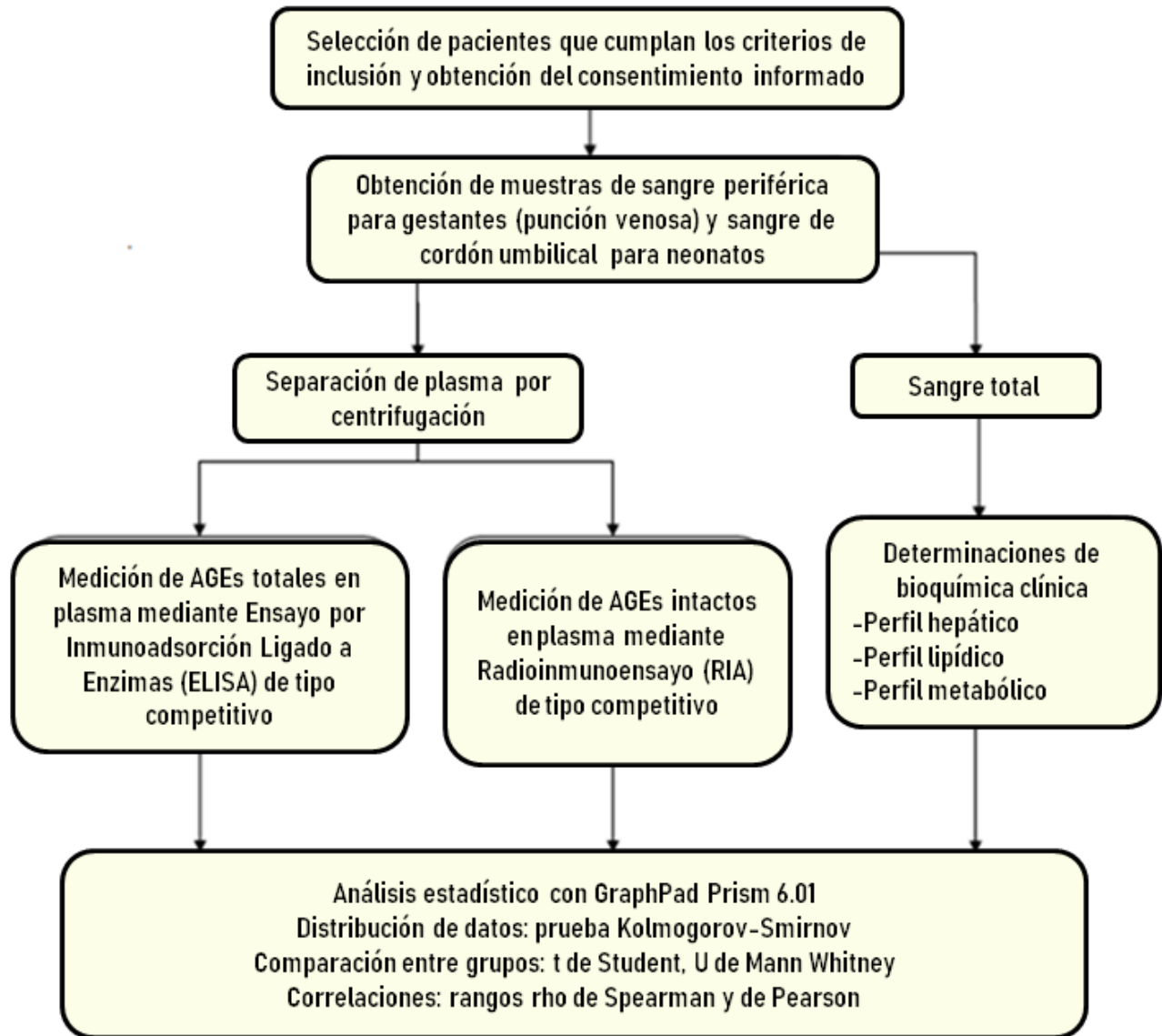
Comparar los niveles de AGEs en plasma de mujeres embarazadas con PE y sus neonatos con los de mujeres con embarazo normoevolutivo y sus neonatos.

## 5.2. Objetivos particulares

- Obtener, concentrar y analizar las variables clínicas correspondientes a diagnóstico, perfil hepático, perfil lipídico y perfil metabólico de cada grupo de estudio.
- Determinar los niveles de AGEs totales (intactos y degradados) en plasma de cada grupo de estudio mediante ELISA.
- Determinar los niveles de AGEs intactos en plasma de cada grupo de estudio mediante RIA.



## 6. MATERIALES Y METODOLOGÍA



**Figura 7. Diagrama de flujo de la metodología.** Se muestran las actividades que se llevaron a cabo en el desarrollo de este trabajo.

## **6.1. Diseño Experimental**

El diseño experimental de este trabajo fue cuantitativo, descriptivo de corte transversal, prospectivo y experimental. Este estudio fue realizado y aprobado como parte del protocolo de investigación con el número de registro 3000-20201-01-15 en el Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes” (INPer), en la Unidad de Investigación en Reproducción Humana (INPer-Facultad de Química, UNAM).

El protocolo del estudio fue previamente aprobado por el Comité de Ética en Investigación del INPer. Todas las muestras se obtuvieron a través de un consentimiento informado.

## **6.2. Muestras**

### **6.2.1. Población y grupos de estudio**

El estudio incluyó 15 pacientes con PE leve, según la definición del Colegio Estadounidense de Obstetras y Ginecólogos [109] y 28 embarazadas normotensas sin trastornos médicos como grupo control, atendidas en el Instituto Nacional de Perinatología en el periodo de 2015 a 2017.

Además de las muestras procedentes de las mujeres embarazadas, también se incluyeron muestras sanguíneas del cordón umbilical de los neonatos cuando fue posible. Se obtuvieron muestras de 8 neonatos que provenían de embarazo con PE y 18 neonatos de embarazo normal. Se establecieron cuatro grupos de estudio: gestantes con embarazo normoevolutivo como control (GestCTR), neonatos provenientes de estos embarazos normoevolutivos como controles (NeonatCTR), embarazadas con PE (GestPE) y neonatos provenientes de embarazo con PE (NeonatPE).

## 6.2.2. Tamaño de la muestra

El tamaño de la muestra se calculó solo de manera demostrativa sobre la base del supuesto de un error tipo 1 (probabilidad de que se rechace la hipótesis nula, cuando la hipótesis alternativa es cierta) del 5% [151], una potencia del 90% y una prevalencia de PE del 3% -10%, y se estimó que era de 121 mujeres por grupo de estudio. La fórmula utilizada fue:

$$n = \frac{\frac{Z_{\alpha}^2 pq}{e^2}}{1 + \frac{Z_{\alpha}^2 pq}{e^2 N}}$$

Donde:

$Z_{\alpha}^2 = 1.6452$  (para un nivel de confianza de 90%)

p= proporción que se desea estimar (en este caso es 0.5 ya que se desconoce)

q= 1-p (1-0.5= 0.5)

N= población de estudio (Anuarios disponibles del INPer reportan que el promedio de cesáreas por PE en el periodo de 2008 a 2010 fue de 217 pacientes)

e= error (5%)

Sin embargo, al estar el presente estudio enmarcado dentro de un protocolo de estudio enfocado en objetivos relacionados con análisis de técnicas de secuenciación masiva, cuya detección de diferencias significativas se valida por normalización bioinformática con grupos de 10 muestras o menos [152], el tamaño muestral se ajustó al tamaño muestral del protocolo mencionado, buscando que fuera de aproximadamente 20 individuos para cada grupo. Finalmente el grupo con PE tuvo una n=15 y el grupo control una n=28.

## 6.2.3. Criterios de Inclusión

Para grupo control: Mujeres con embarazo normo-evolutivo desde 37 hasta 40 semanas de gestación, candidatas a cesárea debido a falta de progresión de trabajo

parto o desproporción céfalo-pélvica, indicada por cesárea previa o iterativa, edad de 25 a 39 años, primigestas y multíparas, que acepten participar en el estudio y firmen hoja de consentimiento informado.

Para mujeres embarazadas con diagnóstico de PE: Mujeres diagnosticadas con PE leve de acuerdo al Lineamiento Técnico de la SSA (Secretaría de Salud, 2007), cuyos neonatos nazcan por cesárea, de 25 a 39 años de edad, que acepten participar en el estudio y firmen la hoja de consentimiento informado.

#### **6.2.4. Criterios de Exclusión**

Se excluyeron del estudio las muestras de mujeres que según los reportes clínicos presentaron en algún grado indicios de alcoholismo, tabaquismo, obesidad en grado III ( $IMC \geq 40$ ), niveles de glucosa menores de 70 mg/dL o mayores de 150 mg/dL en ayunas, edades menores de 18 años o mayores de 40 años y/o que no resolvieron su parto mediante cesárea. También las mujeres con embarazo múltiple, hipertensión crónica, diabetes mellitus o antecedentes de enfermedad cardíaca, hepática o renal se excluyeron del estudio.

Otros criterios de exclusión fueron enfermedad sistémica crónica como lupus eritematoso sistémico, síndrome de anticuerpos antifosfolipidos, glomerulonefritis (cualquier etiología), epilepsia, padecimientos hematológicos como trombocitopenia idiopática o trombótica, antecedente de aborto habitual, placenta previa, asma en tratamiento, síndrome de ovario poliquístico, migraña en tratamiento, trastorno neurológico en tratamiento, cáncer, hepatitis, la muerte fetal intrauterina, una aparente anomalía congénita y/o un historial de ruptura de membranas.

#### **6.2.5. Criterios de eliminación**

Se eliminaron las muestras de aquellas pacientes que durante el proceso de estudio no desearan participar, las muestras que sufrieron pérdida de las condiciones adecuadas

de transporte o almacenamiento, las muestras de pacientes a las que se haya realizado diagnóstico durante el estudio de alguna de las enfermedades de los criterios de no inclusión y las muestras de pacientes cuyas historias clínicas estuvieran incompletas.

### **6.2.6. Técnica de muestreo**

Las muestras fueron obtenidas mediante un muestreo estadístico aleatorio simple, seleccionadas por colaboradores clínicos del Departamento de Medicina Materno-fetal y del Departamento de Terapia Intensiva de Adultos.

Una vez firmada la carta de consentimiento informado, posterior al diagnóstico, previo a la cesárea y en ayuno se les solicitó a las pacientes la donación de aproximadamente 7 ml de sangre periférica por punción venosa en tubos *Vacutainer* con heparina (verde) para determinar AGEs y con activador de coagulación (rojo) para determinaciones de bioquímica clínica. También se obtuvieron muestras de sangre del cordón umbilical dentro de los 10 primeros minutos después del parto en tubos *Vacutainer* con heparina y con activador de coagulación. Dichas muestras fueron obtenidas por los colaboradores del Departamento de Medicina materno-fetal o Terapia Intensiva de Adultos y transportadas tomando en cuenta todas las medidas de seguridad que se establecen en las normas correspondientes [153].

Las muestras conservadas en activador de coagulación se procesaron en el Laboratorio central del INPer, encargado de realizar las determinaciones clínicas (a excepción de las variables glucosa e insulina). Las muestras conservadas en heparina se procesaron en el laboratorio de la Unidad de Investigación en Reproducción Humana. En el momento de la recepción, se realizó la separación del plasma por centrifugación a 1600 g × 10 min a 4 °C para aislar el plasma y las alícuotas se almacenaron a -70 °C.

## 6.3. Técnicas de medición

### 6.3.1. Datos antropométricos y diagnósticos en gestantes

Los datos antropométricos se registraron en admisión del INPer por edad, gravidez, fecha del último período menstrual normal (para estimar la duración del embarazo), historial médico y síntomas como mareos, dolor de cabeza y trastornos visuales. Todas las mujeres fueron sometidas a un examen físico general y obstétrico rutinario para obtener datos de peso, talla y PA.

El peso se obtuvo utilizando una báscula para adulto de plataforma con capacidad mínima de 150 Kg y precisión de 100 a 200 g. La estatura se midió con estadímetro fijo. El índice de masa corporal (IMC) o índice *Quetelet*, se calculó utilizando la fórmula:

$$\text{IMC} = \frac{\text{peso (Kg)}}{\text{talla}^2(\text{m}^2)}$$

La PA se midió en una posición semi-sentada con el brazo de la mujer apoyado y posicionado al nivel del corazón utilizando el primero y quinto sonidos de Korotkoff (sistólico y diastólico respectivamente), la determinación se realiza con esfigmomanómetro digital oscilométrico automático.

Las muestras de orina se analizaron para detectar proteinuria mediante el método de varilla. La proteinuria leve se definió como una lectura de tira reactiva de 1+ o más en al menos dos muestras mediadas con 6 h de diferencia, y la proteinuria severa se definió como una lectura de tira reactiva de 2+ en al menos dos muestras mediadas con 6 h de diferencia. En ambos casos se realizó entonces la medición de proteína en orina de 24 h mediante el método colorimétrico de rojo pirogalol en espectrofotómetro a 598 nm. Las proteínas presentes en la muestra reaccionan en medio ácido con el rojo pirogalol y el molibdato, formando un complejo de color. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de proteínas en la muestra ensayada.

El nivel de recuento de plaquetas se obtuvo con un analizador CELL-Dyn 3700 (Abbott, St Paul, MN, EUA) y un kit suministrado por Spectra Group (Mannheim, Alemania).

### **6.3.2 Datos antropométricos y generales en neonatos**

Los datos generales del neonato fueron tomados inmediatamente después del nacimiento, el peso se determinó en una balanza pediátrica y la talla se determinó mediante un infantómetro.

Las semanas de gestación se calcularon en base a la fecha del último periodo menstrual normal que la madre reportó en su historial clínico, pero como esta determinación en ocasiones no es confiable o exacta, se utilizó también la determinación de *CAPURRO* para determinar la edad gestacional del neonato mediante cinco parámetros que se asocian a una puntuación que va de 0 a 24 puntos de acuerdo a criterios establecidos en tablas. Estos criterios son: forma del pabellón de la oreja, tamaño de la glándula mamaria, formación del pezón, textura de la piel y pliegues plantares.

También se reportaron los resultados de otras pruebas de valoración clínica del neonato como el test de *APGAR* y la prueba *Silverman*; el primero evalúa cinco variables con criterios asociados a puntuaciones que van de 0 a 2, las variables son: color de piel, frecuencia cardíaca, reflejos e irritabilidad, tono muscular y respiración. En la prueba *Silverman* lo que se valora es la capacidad respiratoria, también se utilizan cinco condiciones asociadas a puntuaciones que van de 0 a 2, se evalúa: movimientos toraco-abdominales, tiraje intercostal, retracción xifoidea (hundimiento por debajo del cartílago donde termina el esternón), aleteo nasal y quejido respiratorio.

Se midió la frecuencia cardíaca de forma manual y aislada mediante estetoscopio y de forma continua mediante un monitor con electrocardiograma. La frecuencia respiratoria del neonato se contabilizó de forma manual y aislada contando las contracciones

torácicas producidas en un minuto y de forma continua por medio de un monitor que arroja un dato numérico.

### **6.3.3. Determinación de perfil hepático**

La creatinina sérica (CREAT), aspartato transaminasa (AST), alanina transaminasa (ALT), gammaglutamil transferasa (GGT), lactato deshidrogenasa (LDH) y ácido úrico (AU), se analizaron en un sistema VITROS 5600 Integrated System (Ortho-Clinical Diagnostics, Rochester NY, EUA) usando kits suministrados por VITROS Chemistry Products (Rochester, NY, EUA).

### **6.3.4. Determinación de perfil lipídico**

Las apolipoproteínas A y B (ApoA y ApoB) se midieron utilizando métodos de precipitación con anticuerpos y posterior determinación por métodos turbidimétricos. Tanto el colesterol total (COL) como los triglicéridos (TRIG) se midieron usando métodos enzimáticos automáticos (COBAS® Integra Colesterol y COBAS® Integra tryglicerides) en un analizador Roche/Hitachi. Las concentraciones de liproteínas de alta densidad (HDL) se determinaron después de precipitación selectiva usando manganeso-heparina y posterior a la determinación enzimática de COL. Los valores de lipoproteínas de baja densidad (LDL) se calcularon usando la fórmula de Friedwald

$$LDL = COL - HDL - \frac{TRIG}{5}$$

### **6.3.5. Determinación de perfil metabólico**

Las variables glucosa (GLU) e insulina (INS), fueron determinadas en el Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán. Los niveles de GLU fueron determinados mediante el uso de un kit comercial que mide glucemia por el método de la glucosa oxidasa, esta enzima cataliza la oxidación de glucosa a ácido glucónico. El peróxido de



hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) producido se detecta mediante un aceptor cromogénico de oxígeno llamado fenol-ampirona en presencia de peroxidasa (POD). Es un método colorimétrico, la intensidad del color formado es proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra ensayada que se mide a 550 nm.

Los niveles de insulina (INS) se determinaron mediante RIA [154], cuyo fundamento se detalla en la descripción de la técnica para determinar AGEs intactos (pág. 42).

El cálculo del modelo homeostático para evaluar resistencia a la insulina (HOMA-IR) se calculó mediante la aplicación de la fórmula del cálculo del modelo homeostático de *Matthews*:

$$\frac{\text{GLU} * \text{INS}}{22.5}$$

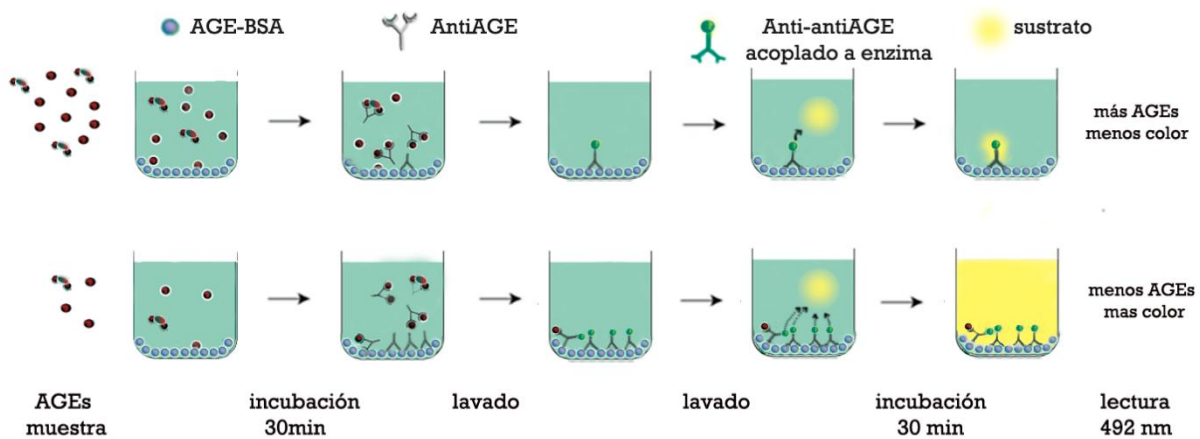
Para este cálculo el nivel de glucosa está expresado en mmol/L y el nivel de insulina esta expresado como µU/mL. Se consideró un índice HOMA-IR ≥ 2.6 como expresión de RI [155].

### **6.3.6. Ensayo de Inmunoadsorción Ligado a Enzimas (ELISA) competitivo para AGEs**

#### **6.3.6.1. Fundamento**

El ELISA es una prueba de inmunoensayo enzimático basado en la detección de complejos antígeno-anticuerpo, en la cual un antígeno inmovilizado en una placa se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima que se denomina conjugado y es capaz de generar un producto detectable por aparición de color. La coloración permite medir indirectamente mediante espectrofotometría el antígeno en la muestra. Cuando el ensayo es de tipo competitivo, el antígeno de la muestra va a competir por un limitado número de sitios de unión con el conjugado, habrá ausencia de color en una

muestra positiva debido a que el sustrato no encontrará a la enzima, porque el conjugado ha sido desplazado por el antígeno presente (Figura 8). La cantidad de antígeno presente en la muestra es detectado por comparación de su absorbancia contra el de una curva estándar de concentración conocida.



**Figura 8. Fundamento del ELISA de tipo competitivo.** El antígeno a medir, competirá con un antígeno estandarizado adsorbido en la superficie del pocillo. Si la muestra contiene el antígeno problema, éste se unirá primero al anticuerpo anti-AGE y este a su vez no podrá fijarse a la superficie del pocillo, así el complejo antígeno problema-anti AGE se eliminará con los lavados y al añadir un segundo anticuerpo acoplado a una enzima, no habrá unión y el sustrato no conferirá color a la mezcla. Del mismo modo si la muestra tiene poca concentración del antígeno problema, el color se desarrollará porque muchos anticuerpos serán libres de unirse al antígeno adsorbido y no se eliminarán con los lavados.

En el caso de la prueba ELISA para detectar concentración de AGEs, se considera la interacción no covalente producida entre el anticuerpo y algún epítipo presente en los aductos formados por glicación, como se sabe, el epítipo puede consistir de una cantidad de aminoácidos reducida, por lo que este tipo de ensayo permite detectar tanto complejos completos de proteína intacta que forma AGEs, hasta productos que ya pasaron por el proceso de degradación y están constituidos por péptidos muy pequeños. En este sentido decimos que este ELISA mide los niveles de AGEs totales, grandes y pequeños, es decir mide AGEs intactos completos y AGEs que han sido parcialmente degradados.

En este estudio se utilizó un kit de ELISA para la cuantificación de AGEs (LAMIDER, MEXICO), que consta de una placa de poliestireno de 96 pocillos, recubierta con 10

$\mu\text{g/mL}$  de AGE-DNasa en PBS y bloqueada con 0.3% de gelatina en PBS. El conjugado que se utiliza en este kit es anti-AGE-POD de rábano y la solución sustrato-cromógeno es ortofenilendiamina en fosfato de sodio con  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Tanto los estándares para la curva de concentración como los controles internos de calidad constan de AGE-BSA purificado por Affigel-Blue.

Los AGEs presentes en el plasma de los grupos estudiados, compiten con los AGEs que recubren la placa. Para realizar la medición se añadieron la muestra y el conjugado a la placa, una mayor concentración de AGEs en el plasma neutraliza en mayor proporción al conjugado añadido, evitando que este se una al AGE adsorbido en la placa. A mayor concentración de AGEs en la muestra, menor color se desarrollará y viceversa.

#### **6.3.6.2. Procedimiento**

Las mediciones se realizaron por duplicado, se utilizó como blanco una solución AGE-BSA con alta concentración (10 veces mayor al último punto de la curva [ $170 \text{ U/mL}$ ]). La curva estándar se midió por duplicado con 5 puntos que tuvieron las siguientes concentraciones: 0, 950, 2500, 6200 y 17000  $\text{mU/mL}$  y también se midieron dos controles de calidad internos de concentración 313 y 1092  $\text{mU/mL}$  para evaluar la precisión del ensayo.

Se mezclaron 100  $\mu\text{L}$  de las muestras de plasma en una dilución 1:20 con 50  $\mu\text{L}$  de conjugado Anti-AGE-POD de rábano en la placa de 96 pocillos recubiertos con AGE-DNasa y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente, después de tres lavados con 300  $\mu\text{L}$  de buffer de lavado (PBS 0.5X, 0.05% Tween 20, pH 7.4) y una incubación de 30 min con solución sustrato-cromógeno de ortofenilendiamina en fosfato de sodio con  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Se observó el desarrollo de color, momento en el que se agregaron 20  $\mu\text{L}$  de la solución para detención y las placas se leyeron realizando dos lecturas, una a 492 nm y otra a 630 nm usando un lector de microplacas VERSAmax™ con Softmax

Software Pro 3.1.1 (Molecular Devices, EUA). Con los datos obtenidos se calcularon las concentraciones:

\*Se restó la absorbancia medida en los tubos de uniones inespecíficas (blanco) al promedio de cada medición (excepto los totales) y esa diferencia fue el dato de absorbancia real de cada tubo.

\*Se calcularon los promedios de absorbancia de todas las muestras duplicadas.

\*Se calculó la unión del conjugado en cada pocillo con respecto a la unión específica máxima dosis cero

$$\text{Absorbancia específica} = \frac{\text{Absorbancia promedio de cada muestra}}{\text{Absorbancia de pocillo estándar dosis cero}}$$

\*Después se calculó la relación antígeno unido/antígeno libre para todas las muestras

$$\text{Antígeno} = \frac{\text{Absorbancia específica}}{1 - \text{Absorbancia específica}}$$

\*Se calculó el logaritmo de la relación antígeno unido/antígeno libre

\*Se graficó este logaritmo de la relación antígeno unido/antígeno libre contra el logaritmo de las concentraciones de los estándares

\*Se determinó la concentración de cada muestra interpolando sobre la gráfica de la curva estándar.

\*Finalmente se calculó el antilogaritmo para obtener las concentraciones de cada muestra.

La menor concentración de AGEs que puede ser detectada informada por el fabricante para el ensayo es de 24 mU/mL de AGE-BSA, los coeficientes de variación inter e intraensayo reportados son de 8% y 12% respectivamente y el límite de linealidad del ensayo es 5.115 U/mL, si las muestras presentan mayor concentración se deben realizar diluciones y ajustar al final la concentración en los cálculos, como en el caso de las muestras en este trabajo, que requirieron una dilución de 1:20. Las unidades se reportan como U/mL.

### **6.3.7. Radioinmunoanálisis (RIA) competitivo para AGEs**

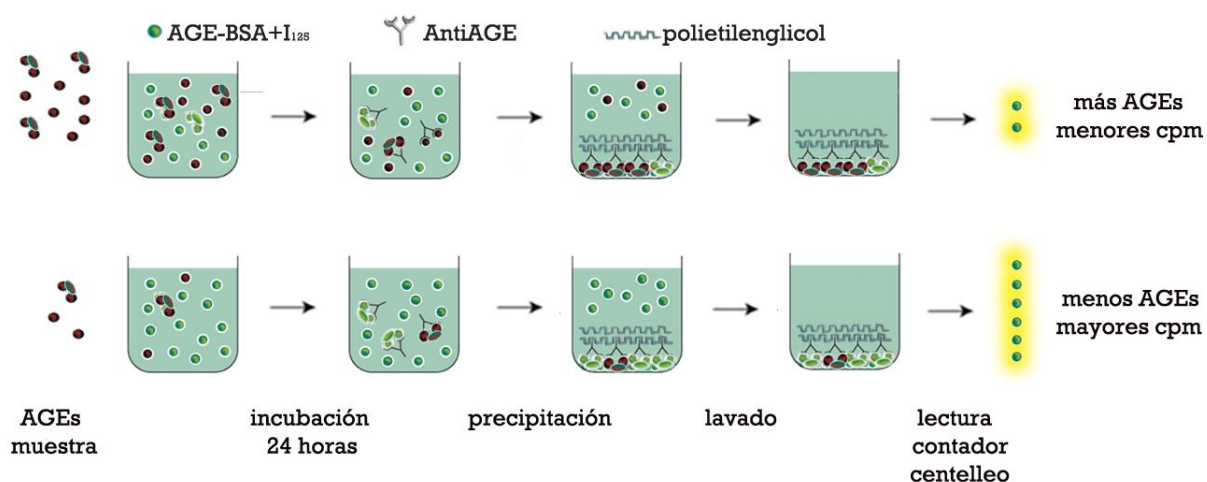
#### **6.3.7.1. Fundamento**

Este ensayo se lleva a cabo en fase líquida y se basa en la precipitación de un complejo antígeno-anticuerpo en presencia de polietilenglicol. Es de tipo competitivo porque los AGEs presentes en la muestra compiten contra un complejo AGE-BSA que se encuentra marcado con  $I^{125}$ , ambos compiten por unirse a un anticuerpo específico que se encuentra en concentración limitante. A mayor cantidad de AGEs en la muestra, menor será la cantidad de sustancia radiactiva que se une al anticuerpo y viceversa.

Después de realizar la mezcla inicial, se adiciona un reactivo de precipitación que contiene un anticuerpo secundario específico para unirse con el anticuerpo primario generando precipitación después de una centrifugación. Al centrifugar, el antígeno libre queda en solución y el antígeno unido al anticuerpo forma agregados fácilmente precipitables (Figura 9). Se lavan estos precipitados y son leídos en un contador de rayos gamma. Los resultados de centelleos por minuto (cpm), se obtienen al medir la radiactividad del antígeno marcado unido al anticuerpo y la del antígeno marcado libre mediante un contador de centelleo. Finalmente se calculan las concentraciones basándose en una curva estándar

#### **6.3.7.2. Procedimiento**

Las mediciones se realizaron por duplicado, se utilizó como blanco una solución AGE-BSA con alta concentración para determinar las uniones específicas máximas (10 veces mayor al último punto de la curva [190 mU/mL]). La curva estándar se midió por duplicado con 6 puntos que tienen las siguientes concentraciones: 23, 320, 600, 1200, 2500, 500, 9700, 19000  $\mu$ U/mL y también se midieron por duplicado las uniones no específicas, las uniones totales y dos controles interno de calidad.



**Figura 9. Fundamento del RIA de tipo competitivo.** Se tiene un Ag marcado y un Ag problema. El Ag problema compite por los anticuerpos con el antígeno marcado. La adición de anti-inmunoglobulina precipita los complejos formados y finalmente se mide la radiactividad en un contador de centelleo, la diferencia entre un control (radiactividad máxima) y la obtenida en la muestra es proporcional a la concentración del antígeno sin marcar.

Se mezclaron 100  $\mu$ L de las muestras de plasma en una dilución 1:20 con 100  $\mu$ L de anticuerpo Anti-AGE en tubos de ensaye y 100  $\mu$ L del marcador radiactivo, se incubó durante 24 h a 4°C. Después se añadieron 200  $\mu$ L de polietilenglicol, que funciona como reactivo de precipitación y después de agitación e incubación de 1 h a temperatura ambiente, se realizó la centrifugación (con excepción de los tubos totales) durante 30 min a 3000 rpm a 4°C.

Finalmente se decantaron y secaron los tubos en papel absorbente y se contaron en un contador de centelleo de radiaciones gamma VERSAmax<sup>TM</sup> con Softmax Software Pro 3.1.1 (Molecular Devices, EUA) durante 5 min. Los resultados se presentaron como centelleo por minuto (cpm) y con los datos obtenidos se calcularon las concentraciones:

\*Se restó el promedio obtenido en los tubos de uniones inespecíficas al promedio de cada medición (excepto los totales) y esa diferencia fue el dato de centelleo real de cada tubo. Se calculó primero el porcentaje de unión específica máxima del I<sup>125</sup> usando la siguiente fórmula:

$$\text{Unión específica} = \frac{\text{CPM unión específica máxima real}}{\text{CPM promedio totales}} \times 100$$

Se comprobó que el resultado estuviera entre 20 y 40 %. Se calculó el porcentaje de unión específica para cada tubo utilizando la fórmula:

$$\% \text{ de unión específica} = \frac{\text{CPM promedio real de cada dilución}}{\text{CPM promedio totales}} \times 100$$

Se graficó el porcentaje de unión específico obtenido para cada punto de la curva estándar contra la concentración de cada estándar. Finalmente se determinó la concentración de cada muestra interpolando sobre la gráfica de la curva estándar.

Ambas técnicas inmunológicas, tanto ELISA como RIA, fueron usadas debido a la discriminación por tamaño que muestran al determinar los niveles de AGEs. La reacción de precipitación en RIA depende de la valencia del anticuerpo y del antígeno, un anticuerpo bivalente posee dos sitios capaces de reconocer al antígeno. La valencia de un antígeno nos habla del máximo número de epítopes que posee y por lo tanto también de su tamaño. Para que se pueda producir la interacción secundaria antígeno-antígeno con la consecuente formación del precipitado, los antígenos deben ser suficientemente grandes como para contener más de dos epítopes, por lo que el RIA mide solo AGEs grandes o intactos (proteínas glicadas completas), que no han pasado aún por un proceso de degradación, mientras el ELISA detecta AGEs totales, tanto grandes complejos como pequeños péptidos glicados.

## 6.4. Análisis estadístico

Todos los cálculos estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico GraphPad Prism en su versión 6.01 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). Para Microsoft Windows. Una vez obtenidos los resultados tanto de las variables clínicas como de los niveles de AGEs, se analizaron las distribuciones mediante una prueba de

normalidad de *Kolmogorov-Smirnov* con  $\alpha=0.05$  y se observó que algunas de las variables no presentaban una distribución de tipo normal. Para estas variables se calcularon los valores estadísticos de P mediante una prueba U de *Mann-Whitney*, mientras para las variables que si presentaron en su distribución de frecuencias un comportamiento normal, la comparación se realizó mediante una prueba t de *Student* con una corrección de *Welch* cuando las desviaciones estándar presentaban diferencias estadísticamente significativas entre sí.

Para evaluar la correlación entre los niveles plasmáticos de AGEs y las variables clínicas, se utilizaron la correlación de rangos de *Spearman* para grupos de datos con distribución no normal y la correlación de *Pearson* para grupos de datos con distribución normal.

Para todos los casos el nivel de significancia fue  $\alpha=0.05$ . Los resultados son expresados como media  $\pm$  desviación estándar o media  $\pm$  error estándar de la media, según el tipo de distribución de datos.



# 7. RESULTADOS

## 7.1. Variables clínicas

Todas las participantes tuvieron un embarazo único de 36-40 semanas de gestación y un feto viable. Del total de variables clínicas estudiadas, algunas fueron medidas y registradas por los colaboradores clínicos del Departamento de Medicina Materno-fetal y del Departamento de Terapia Intensiva de Adultos a cargo, por lo cual el tamaño de la muestra para cada grupo varía en función de la disponibilidad y confiabilidad de los datos reportados en los registros clínicos.

En los resultados de las variables clínicas medidas en las gestantes (Tabla 2), se observa que no existió diferencia significativa en ninguna de las variables antropométricas, aunque es interesante mencionar que a pesar de que los dos grupos de estudio no difirieron significativamente en términos de edad materna, edad gestacional, peso, talla e índice de masa corporal (IMC), la mayoría de las pacientes presentó una tendencia al sobrepeso (IMC= 25-29.9) u obesidad tipo I (IMC= 30-34.9). Solo 19.23% del total de controles y 20% del total de pacientes presentaba peso normal (IMC 19-24.9). No se tomó en cuenta el índice de masa corporal pre-embarazo ya que no se pudo obtener el dato en la mayoría de las pacientes.

En las gestantes, se observaron aumentos significativos en tres variables del perfil hepático, que fueron mayores en GestPE que en GESTCTR: GGT ( $21.01 \pm 5.39$  U/L vs  $9.58 \pm 2.07$  U/L), AU ( $5.88 \pm 0.38$  mg/dL vs  $4.04 \pm 0.26$  mg/dL) y LDH ( $430.8 \pm 53.22$  U/L vs  $283.3 \pm 6.06$  U/L), mientras en variables del perfil lipídico solo se encontró diferencia significativa en los niveles de HDL que fueron menores en GestPE que en GestCTR ( $40.88 \pm 5.08$  mg/dL vs  $58.64 \pm 4.55$  mg/dL). En las variables de perfil metabólico se observaron aumentos significativos que fueron mayores en GestPE que en GestCTR, estos se observaron en GLU ( $95.01 \pm 8.78$  mg/dL vs  $68.39 \pm 3.05$  mg/dL), INS ( $0.53 \pm 0.08$  ng/mL vs  $0.22 \pm 0.03$  ng/mL) y HOMA ( $2.62 \pm 0.61$  vs  $0.78 \pm 0.10$ ).

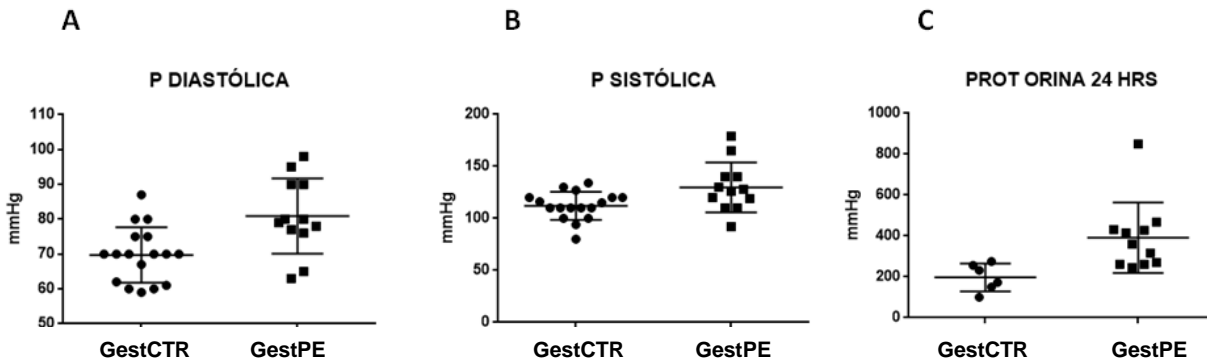
**Tabla 2.-** Valores clínicos obtenidos para grupos de gestantes.

VARIABLES CLÍNICAS	GRUPO GestCTRL	GRUPO GestPE	P
<b>ANTROPOMÉTRICAS</b>			
Edad materna (años)	31.35±1.08 (n=26)	33.53±1.13 (n=15)	0.1965
Edad Gestacional (sem)	38.22±0.27 (n=20)	35.39±1.23 (n=11)	0.0062*
Peso (Kg)	69.92±2.36 (n=26)	77.22±3.72 (n=15)	0.0895
Talla (m)	1.57±0.01 (n=26)	1.58±0.02 (n=15)	0.5472
IMC	28.23±0.83 (n=26)	30.43±1.64 (n=15)	0.1895
<b>DIAGNÓSTICAS</b>			
P diastólica (mmHg)	69.76±1.93 (n=17)	80.92±3.11 (n=12)	0.0034*
P sistólica (mmHg)	112.1±3.27 (n=17)	129.9±6.91 (n=12)	0.0335*
Proteína en orina (mg/24 h)	197.7±27.68 (n=6)	391.6±51.89 (n=11)	0.0052*
Plaquetas (X1000/ $\mu$ L)	226.9±16.16 (n=12)	162.2±16.12 (n=10)	0.0109*
<b>PERFIL HEPÁTICO</b>			
CREAT (mg/dL)	0.56±0.03 (n=23)	0.67±0.04 (n=12)	0.0559
GGT (U/L)	9.58±2.07 (n=21)	21.01±5.39 (n=9)	0.0217*
AST (U/L)	17.86±0.81 (n=21)	20.68±2.83 (n=9)	0.3614
ALT (U/L)	11.59±0.79 (n=20)	14.39±1.92 (n=9)	0.1173
AU (mg/dL)	4.04±0.26 (n=22)	5.88±0.38 (n=10)	0.0004*
LDH (U/L)	283.3±6.06 (n=3)	430.8±53.22 (n=8)	0.0277*
<b>PERFIL LIPÍDICO</b>			
Apo A (mg/dL)	173.9±11.61 (n=23)	171.4±16.39 (n=10)	0.9042
Apo B (mg/dL)	106.1±8.52 (n=23)	121.1±19.76 (n=10)	0.4153
COL (mg/dL)	198.7±12.40 (n=23)	210.4±26.03 (n=10)	0.6486
TG (mg/dL)	231.5±18.58 (n=23)	257.8±37.51 (n=10)	0.4868
LDL (mg/dL)	155.8±10.27 (n=23)	120.8±20.70 (n=10)	0.0955
HDL (mg/dL)	58.64±4.55 (n=21)	40.88±5.08 (n=8)	0.0361*
<b>METABÓLICAS</b>			
GLU (mg/dL)	68.39±3.05 (n=22)	95.01±8.78 (n=13)	0.0118*
INS (ng/mL)	0.22±0.03 (n=23)	0.53±0.08 (n=9)	0.0001*
HOMA	0.78±0.10 (n=22)	2.62±0.61 (n=8)	0.0187*

NOTA: La mayoría de los grupos de datos no se ajustan a una distribución estándar, sin embargo se optó por expresar todos los datos como media  $\pm$  la desviación estándar (DE) de la media para dar una idea clara de la dispersión de los datos.

\*  $P < 0.05$  Diferencia estadísticamente significativa

En cuanto a las variables diagnósticas, como se esperaba, hubo aumentos significativos en GestPE con respecto a GestCTR, como se observa en la figura 10, sobre todo en los valores de presión diastólica.



**Figura 10. Variables diagnósticas para PE.** **A:** Presión diastólica aumentada en GestPE ( $80.92 \pm 3.11$  mmHg,  $n=12$ ) con respecto a GestCTR ( $69.76 \pm 1.93$  mmHg,  $n=17$ ), el aumento es estadísticamente significativo ( $P=0.0034$ ) **B:** Presión sistólica aumentada en GestPE ( $129.9 \pm 6.91$  mmHg,  $n=12$ ) con respecto a GestCTR ( $112.1 \pm 3.27$  mmHg,  $n=17$ ), el aumento es estadísticamente significativa ( $P=0.0335$ ). **C:** Proteína en orina a las 24 h aumentada en GestPE ( $391.6 \pm 51.89$ , mg/24h,  $n=11$ ) con respecto a GestCTR ( $197.7 \pm 27.68$  mg/24h,  $n=6$ ), el aumento es estadísticamente significativo ( $P=0.0052$ ). El análisis estadístico se realizó usando una prueba t de *Student*, se precisó una corrección de *Welch* para los valores de P. sistólica.

Por otro lado, se reportaron las variables clínicas de algunos neonatos en la Tabla 3, cuyas muestras de cordón umbilical correspondían a algunas de las mujeres de nuestros grupos de estudio. La única variable antropométrica que se presentó disminuida de manera significativa fue el peso al nacer, que fue menor en NeonatPE que en NeonatCTR ( $2.73 \pm 0.16$  Kg vs  $3.14 \pm 0.10$  Kg respectivamente). En cuanto a las demás variables, solo se detectó diferencia en perfil hepático en los niveles de AU, que fueron mayores en NeonatPE con respecto a NeonatCTR ( $5.99 \pm 0.61$  mg/dL vs  $4.42 \pm 0.21$  mg/dL), y en el perfil metabólico, los niveles de GLU ( $78.11 \pm 6.52$  mg/dL vs  $63.18 \pm 2.46$  mg/dL) y el índice HOMA ( $2.54 \pm 0.90$  vs  $0.93 \pm 0.17$ ), fueron mayores en NeonatPE con respecto a NeonatCTR.

**Tabla 3.-** Valores clínicos obtenidos para grupos de neonatos.

<b>VARIABLES</b>	<b>GRUPO NeonatCTR</b>		<b>GRUPO NeonatPE</b>		<b>P</b>
<b>ANTROPOMÉTRICAS</b>					
Edad Gestacional (sem)	38.22±0.23	(n=20)	35.39±1.23	(n=11)	0.0062*
Peso (Kg)	3.14±0.10	(n=18)	2.73±0.16	(n=8)	0.0378*
Talla (cm)	49.85±0.37	(n=18)	46.63±1.98	(n=8)	0.1506
<b>GENERALES</b>					
APGAR 1 min (puntos)	8.00±0.11	(n=18)	7.75±0.16	(n=8)	0.2310
APGAR 5 min (puntos)	8.94±0.05	(n=18)	8.50±0.19	(n=8)	0.0531
CAPURRO (sem)	39.42±0.28	(n=18)	38.15±1.16	(n=8)	0.3179
SILVERMAN (puntos)	1.44±0.12	(n=18)	1.62±0.42	(n=8)	0.6900
Frec. Cardiaca (lat/min)	145.4±2.52	(n=18)	139.9±2.85	(n=8)	0.2257
Frec. Respiratoria (resp/min)	48.50±1.55	(n=18)	50.14±2.10	(n=8)	0.5662
<b>PERFIL HEPÁTICO</b>					
CREAT (mg/dL)	0.69±0.03	(n=18)	0.72±0.02	(n=8)	0.4487
GGT (U/L)	100.6±17.19	(n=18)	109.4±13.90	(n=8)	0.6929
AST (U/L)	29.73±2.36	(n=18)	30.43±6.79	(n=8)	0.9249
ALT (U/L)	9.27±0.52	(n=18)	9.11±2.06	(n=8)	0.9218
AU (mg/dL)	4.42±0.21	(n=18)	5.99±0.61	(n=8)	0.0388*
<b>PERFIL LIPÍDICO</b>					
Apo A (mg/dL)	87.98±3.57	(n=18)	87.64±4.98	(n=8)	0.9574
Apo B (mg/dL)	25.72±1.69	(n=18)	23.96±1.66	(n=8)	0.5340
COL (mg/dL)	63.88±3.75	(n=18)	63.30±5.70	(n=8)	0.9329
TG (mg/dL)	35.71±3.41	(n=18)	45.26±7.53	(n=8)	0.1922
LDL (mg/dL)	30.98±3.19	(n=18)	29.65±3.07	(n=8)	0.8020
HDL (mg/dL)	30.49±1.84	(n=18)	26.41±3.46	(n=8)	0.2669
<b>METABÓLICAS</b>					
GLU (mg/dL)	63.18±2.46	(n=15)	78.11±6.52	(n=7)	0.0158*
INS (ng/mL)	0.31±0.05	(n=15)	0.54±0.18	(n=7)	0.2549
HOMA	0.93±0.17	(n=15)	2.54±0.90	(n=7)	0.0222*

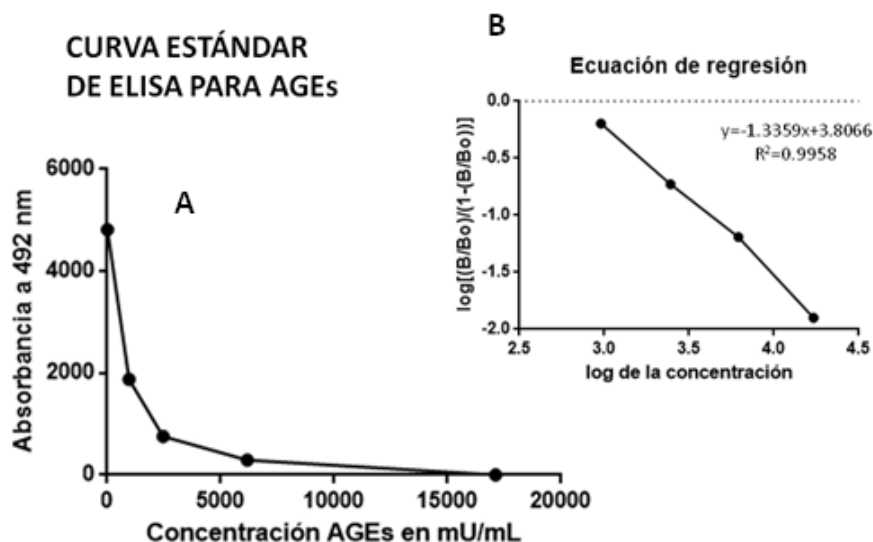
NOTA: La mayoría de los grupos de datos no se ajustan a una distribución estándar, sin embargo se optó por expresar todos los datos como media ± la desviación estándar (DE) de la media para dar una idea clara de la dispersión de los datos.

\* P<0.05 Diferencia estadísticamente significativa

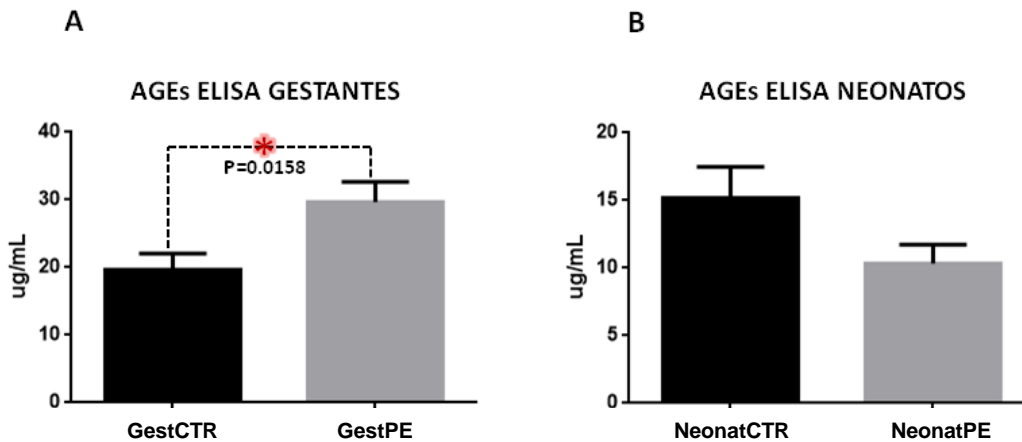
## 7.2. Niveles de AGEs totales medidos por ELISA competitivo

Para determinar AGEs totales, se realizó la curva de cuantificación que se muestra en la Figura 11. La absorbancia promedio de los pocillos correspondientes a la dosis cero es la unión específica máxima del conjugado y la unión no específica se da cuando la dosis es el punto máximo de la curva.

**Figura 11. Curva estándar de ELISA para medir AGEs totales. A:** Resultado obtenido al graficar directamente la concentración de cada estándar contra su Absorbancia. **B:** Resultado obtenido al linealizar la curva estándar con su ecuación de regresión lineal.



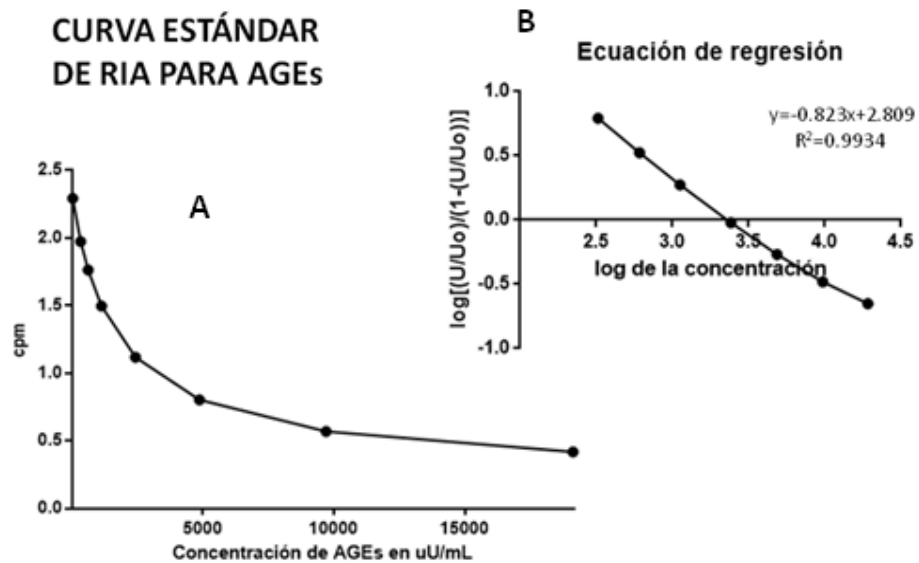
Después se realizó la determinación de la concentración de los AGEs plasmáticos con ELISA, los datos arrojados por el ensayo se muestran en la Figura 12, donde se observa que existe aumento significativo en los niveles de AGEs totales en GestPE con respecto a GestCTR ( $8.90 \pm 0.897$  U/mL vs  $5.90 \pm 0.72$  U/mL). Entre los grupos de cordones umbilicales de los neonatos no existen diferencias significativas.



**Figura 12. Niveles de AGEs plasmáticos totales circulantes para gestantes y neonatos. A:** AGEs totales aumentados en GestPE ( $8.90 \pm 0.897$  U/mL,  $n=15$ ) con respecto a GestCTR ( $5.90 \pm 0.72$  U/mL,  $n=26$ ), la diferencia es estadísticamente significativa ( $P=0.0158$ ). **B:** AGEs totales sin diferencia entre NeonatPE ( $3.10 \pm 0.28$  U/mL,  $n=8$ ) y NeonatCTR ( $4.32 \pm 0.48$  U/mL,  $n=18$ ), no existe diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos. Las mediciones se realizaron mediante ELISA competitivo y el análisis estadístico se realizó usando una prueba t de *Student*; se precisó una corrección de *Welch* para los valores de AGEs de neonatos.

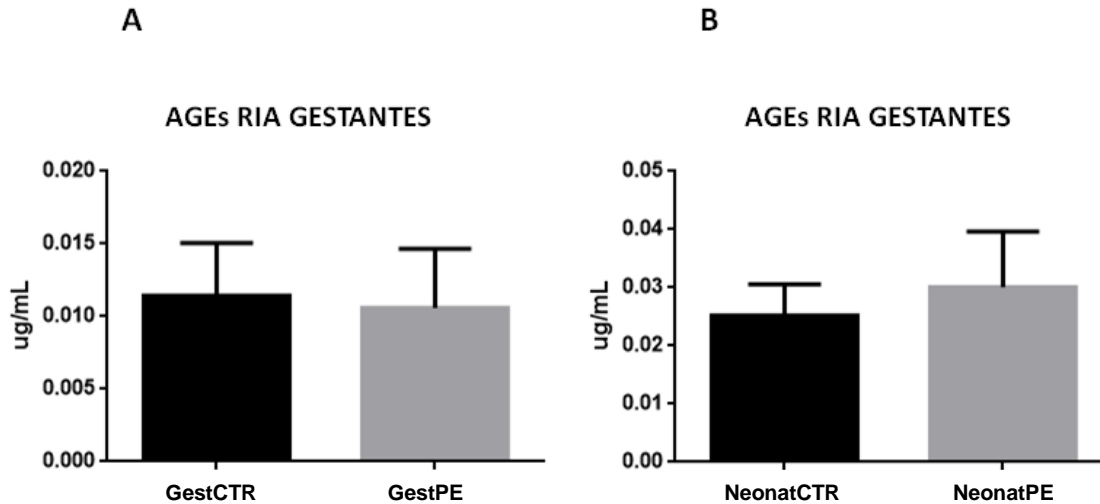
### 7.3. Niveles de AGEs intactos medidos por RIA competitivo

Para determinar AGEs intactos se realizó la curva de cuantificación que se muestra en la Figura 13. La absorbancia promedio de los pocillos correspondientes a la dosis cero es la unión específica máxima del conjugado y la unión no específica se da cuando la dosis es el punto máximo de la curva.



**Figura 13. Curva estándar de RIA para medir AGEs intactos. A:** Resultado obtenido al graficar directamente la concentración de cada estándar contra su Absorbancia. **B:** Resultado obtenido al linealizar la curva estándar con su ecuación de regresión lineal.

Se realizó la determinación de la concentración de los AGEs plasmáticos con RIA, los datos arrojados por el ensayo se muestran en la Figura 14, donde se observa que no existen diferencias significativas en los niveles de AGEs intactos circulantes entre ninguno de los grupos.



**Figura 14. Niveles de AGEs plasmáticos intactos para gestantes y neonatos.** **A:** AGEs intactos sin diferencia entre GestPE ( $3.18 \pm 1.23$  mU/mL,  $n=15$ ) y GestCTR ( $3.43 \pm 1.08$  mU/mL,  $n=26$ ), no existe diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ( $P=0.8784$ ) **B:** AGEs intactos sin diferencia entre NeonatCTR ( $7.60 \pm 1.59$  mU/L,  $n=18$ ) y NeonatPE ( $9.03 \pm 2.85$  mU/mL,  $n=8$ ), no existe diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ( $P=0.6491$ ). Las mediciones se realizaron mediante RIA competitivo y el análisis estadístico se realizó usando una prueba t de *Student*.

## 7.4. Distribución de los datos

Después de analizar los datos que se presentan clínicamente alterados en las pacientes con PE mediante el *test* de *Kolmogorov-Smirnov* para determinar la distribución de frecuencias (Tabla 4), se observa que solo LDH y HDL cumplieron con la distribución de normalidad.

**Tabla 4.-** Resultados obtenidos para la distribución de frecuencias en la prueba de normalidad de *Kolmogorov-Smirnov*.

	GGT	AU	LDH	HDL	GLUCOSA	INSULINA	HOMA
E	0.6607	0.8598	0.2143	-0.2606	0.6209	0.6138	0.7418
P	0.0089 *	0.0023 *	0.6191	0.4697	0.0268 *	0.0372 *	0.0051 *

\* Valores de P menores a 0.05 indican un comportamiento no normal



Debido al tipo de distribución que presentan la mayoría de los grupos de datos, se calcularon los resultados para el coeficiente de correlación de *Spearman* para las variables que corresponden a distribuciones no normales y el coeficiente de correlación de *Pearson* para las variables que tuvieron valores con una distribución de tipo normal.

## 7.5. Comparación de niveles plasmáticos de AGEs

A continuación, se resumen los resultados encontrados tanto para niveles de AGEs circulantes totales como niveles de AGEs circulantes intactos para gestantes y neonatos de ambos grupos de estudio (Tabla 5), con el respectivo valor del coeficiente de significancia obtenido para la comparación en el análisis estadístico.

**Tabla 5.-** Resultados obtenidos para concentraciones plasmáticas de AGEs totales (intactos y parcialmente degradados) y solo intactos para grupos de gestantes y neonatos.

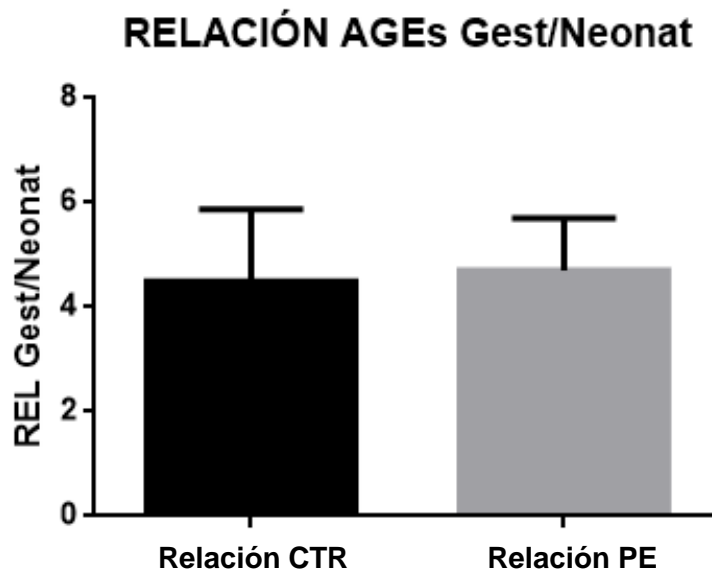
VARIABLES		GRUPO CONTROL n=26	GRUPO PE n=15	P
GESTANTES	AGEs totales <sup>1</sup>	5.90±0.72 U/mL	8.90±0.897 U/mL	0.0158 *
	AGEs intactos	3.43±1.08 mU/mL	3.18±1.23 mU/mL	0.8784

VARIABLES		GRUPO CONTROL n=18	GRUPO PE n=8	P
NEONATOS	AGEs totales <sup>1</sup>	4.32±0.48 U/mL	3.10±0.28 U/mL	0.0799
	AGEs intactos	7.60±1.59 mU/L	9.03±2.85 mU/mL	0.6491

1. AGEs totales= residuos AGEs degradados (pequeños) + complejos AGEs intactos (grandes)

Existen solo diferencias significativas entre grupos de GestCTR y GestPE para los niveles de AGEs totales (que representan los AGEs intactos más los AGEs parcialmente degradados).

Debido a la estrecha relación e influencia entre el metabolismo materno y el fetal, nos pareció importante estudiar que tanto diferían entre sí las relaciones gestante/neonato en el caso del embarazo normal y en la condición de PE, y en el posterior análisis evaluar si los niveles de AGEs alterados podrían afectar esta relación. Los resultados de esta comparación se muestran en la figura 15. La relación se comparó solo para AGEs totales, pues los AGEs intactos no mostraron diferencias significativas.



**Figura 15. Relación de AGEs totales de gestante/neonato.** Relación de AGEs Gest/Neonat sin diferencia entre relación GestPE/NeonatPE ( $4.70 \pm 1.00$ ,  $n=8$ ) y relación GestCTR/NeonatCTR ( $4.49 \pm 1.38$ ,  $n=18$ ), no existe diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ( $P=0.9029$ ), el análisis estadístico se realizó usando una prueba t de *Student* con corrección de *Welch*.

## 7.6. Correlaciones entre variables clínicas y AGEs

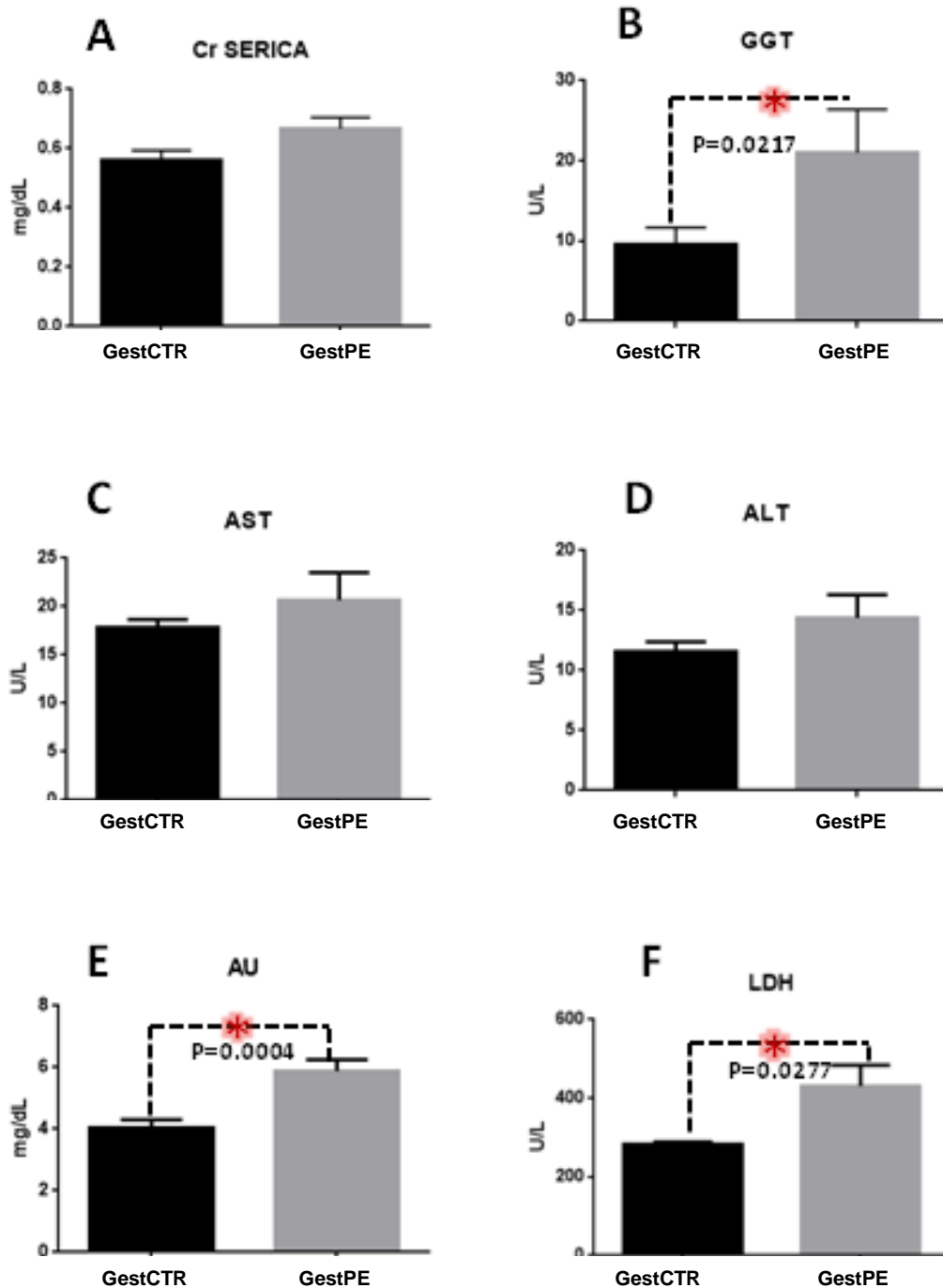
### 7.6.1. Perfil hepático y AGES

En cuanto a las variables correspondientes a perfil hepático, únicamente se encontraron aumentadas en GestPE con respecto a GestCTR: GGT ( $21.01 \pm 5.39$  U/L vs  $9.58 \pm 2.07$  U/L), AU ( $5.88 \pm 0.38$  mg/dL vs  $4.04 \pm 0.26$  mg/dL) y LDH ( $430.8 \pm 53.22$  U/L vs  $283.3 \pm 6.06$ ). Aunque los valores de CREAT, AST y ALT fueron ligeramente más altos en GestPE, esa diferencia no fue significativa. En la Figura 16 se muestran las gráficas de comparación del grupo de GestPE y GestCTR para todas las variables del perfil hepático.

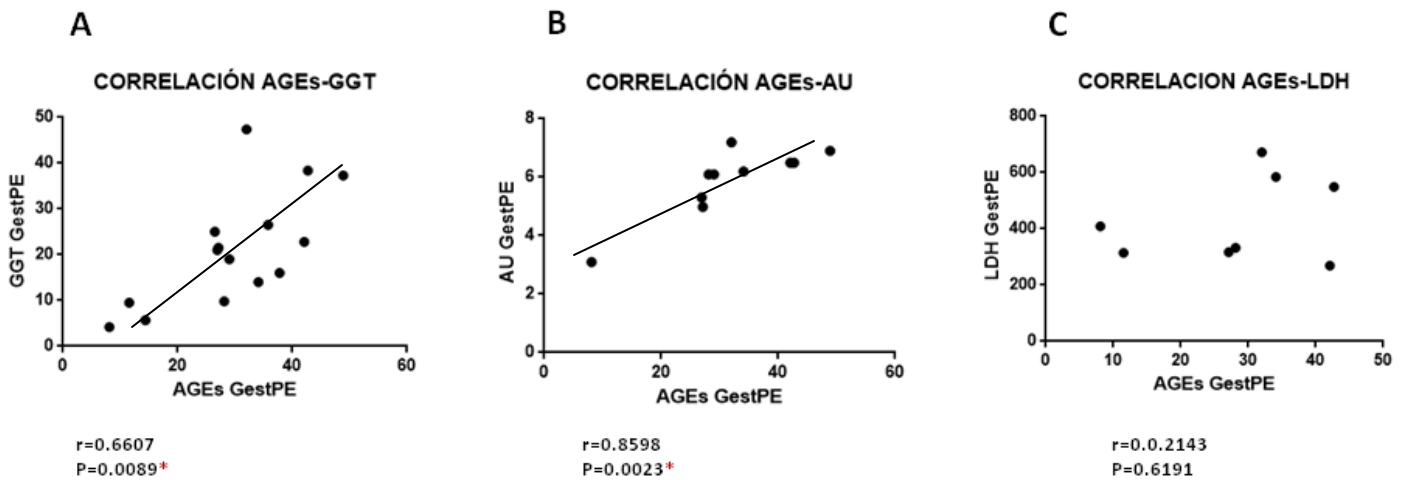
Por otro lado en la Figura 17 se presentan también los diagramas de correlación derivados del análisis estadístico al correlacionar las variables hepáticas y los niveles de AGEs totales encontrados en el plasma de las gestantes. Se utilizaron los datos de los AGEs totales porque fueron los únicos que mostraron diferencias significativas entre grupos GestCTR y GestPE.

Los niveles de AGEs correlacionaron positivamente con GGT y con AU. No existió correlación entre AGEs y LDH. Los valores del coeficiente de correlación para GGT, AU y LDH con respecto a los niveles de AGEs plasmáticos fueron de 0.0089, 0.0023 y 0.6191 respectivamente.

En cuanto a los neonatos, como se mencionó anteriormente, solo se detectó diferencia en perfil hepático en los niveles de AU, que fueron mayores en NeonatPE con respecto a NeonatCTR ( $5.99 \pm 0.61$  mg/dL vs  $4.42 \pm 0.21$  mg/dL), no se incluyen gráficas de este resultado pues sus niveles de AGEs no presentaron diferencia entre el grupo con PE y el grupo control.



**Figura 16. Variables de perfil hepático.** **A:** Cr sin diferencia entre GestPE ( $0.67 \pm 0.04$  mg/dL, n=12) y GestCTR ( $0.56 \pm 0.03$  mg/dL, n=23), no existe diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ( $P=0.0559$ ) **B:** GGT aumentada en GestPE ( $21.01 \pm 5.39$  U/L, n=9) con respecto a GestCTR ( $9.58 \pm 2.07$  U/L, n=21), el aumento es estadísticamente significativo ( $P=0.0217$ ). **C:** AST sin diferencia entre GestPE ( $20.68 \pm 2.83$  U/L, n=9) y GestCTR ( $17.86 \pm 0.81$  U/L, n=21), no existe diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ( $P=0.3614$ ) **D:** ALT sin diferencia entre GestPE ( $14.39 \pm 1.92$  U/L, n=9) y GestCTR ( $11.59 \pm 0.79$  U/L, n=20), no existe diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ( $P=0.1173$ ) **E:** AU aumentado en GestPE ( $5.88 \pm 0.38$  mg/dL, n=10) con respecto a GestCTR ( $4.04 \pm 0.26$  mg/dL, n=22), el aumento es estadísticamente significativa ( $P=0.0004$ ) **F:** LDH aumentada en GestPE ( $430.8 \pm 53.22$  U/L, n=8) con respecto a GestCTR ( $283.3 \pm 6.06$  U/L, n=3), el aumento es estadísticamente significativa ( $P=0.0277$ ). El análisis estadístico se realizó usando una prueba t de *Student*, se precisó una corrección de *Welch* para los valores de AST y LDH.

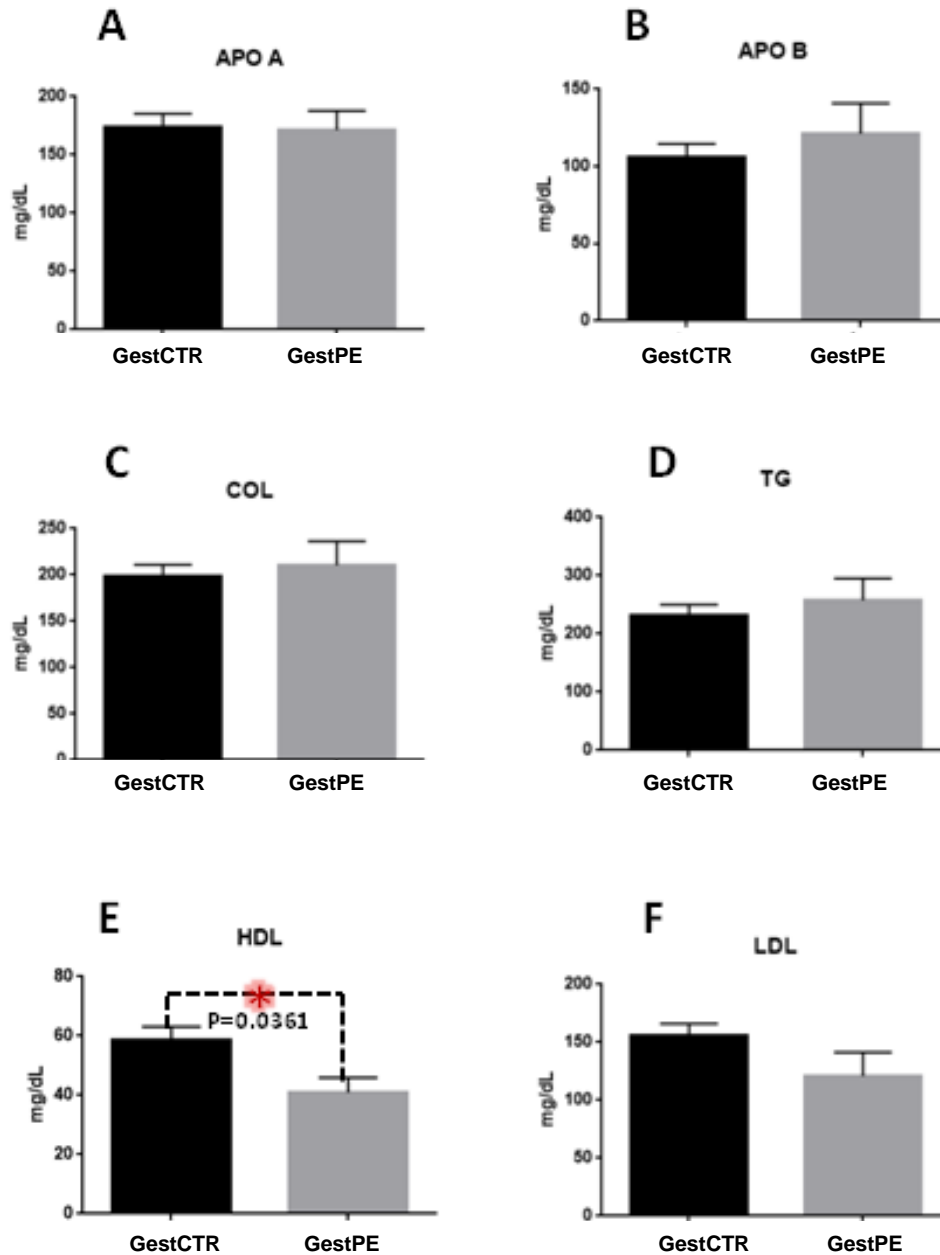


**Figura 17. Correlación entre AGEs totales y variables hepáticas en gestantes.** **A:** Correlación positiva entre AGEs y GGT para GestPE, la correlación es significativa ( $r=0.7500$  y  $P=0.0255$ ). **B:** Correlación positiva entre AGEs y AU para GestPE, la correlación es significativa ( $r=0.8110$  y  $P=0.0063$ ). **C:** Correlación nula entre AGEs y LDH para GestPE, ambas variables no están relacionadas entre sí ( $r=0.3333$  y  $P=0.4279$ ). El análisis estadístico se realizó usando una prueba de correlación de *Spearman* para GGT y AU, mientras para LDH se realizó una prueba de correlación de *Pearson*.

## 7.6.2. Perfil lipídico y AGES

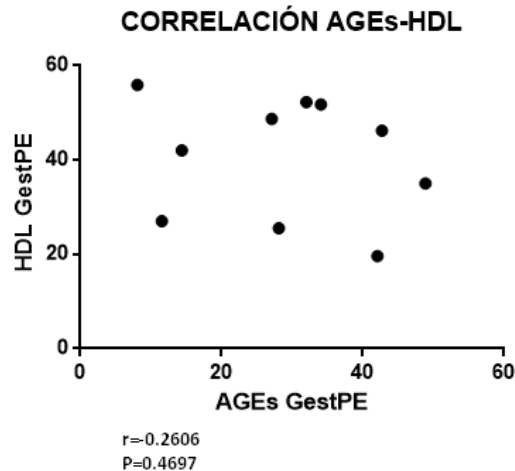
En relación a las concentraciones de lípidos y lipoproteínas únicamente se encontró diferencia significativa en HDL, con valores más bajos en GestPE en comparación con GestCTR ( $49.49 \pm 13.56$  mg/dL y  $56.84 \pm 11.95$  mg/dL, respectivamente). Por otra parte, aunque los valores de LDL fueron marcadamente más bajos en mujeres con PE, esa diferencia no fue estadísticamente significativa. Los valores de ApoA, ApoB, COL y TG no mostraron diferencia entre GestCTR y GestPE. En los grupos de gestantes, ninguna variable mostró estar alterada en PE con respecto al control.

En la Figura 18 se muestra la comparación de grupos de GestPE y GestCTR para las variables ApoA, ApoB, COL, TRIG, LDL y HDL. Se presenta también en la Figura 19, el diagrama de correlación derivado del análisis estadístico al correlacionar las variables lipídicas con diferencias estadísticamente significativas y los niveles de AGEs totales encontrados en el plasma de las gestantes.



**Figura 18. Variables de perfil lipídico.** **A:** ApoA sin diferencia entre GestPE (171.4±16.39 mg/dL, n=10) y GestCTR (173.9±11.61 mg/dL, n=23), no existe diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos (P=0.9042) **B:** ApoB sin diferencia entre GestPE (121.1±19.76 mg/dL, n=10) y GestCTR (106.1±8.52 mg/dL, n=23), no existe diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos (P=0.4153) **C:** COL sin diferencia entre GestPE (210.4±26.03 mg/dL, n=10) y GestCTR (198.7±12.40 mg/dL, n=23), no existe diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos (P=0.6486) **D:** TG sin diferencia entre GestPE (257.8±37.51 mg/dL, n=10) y GestCTR (231.5±18.58 mg/dL, n=23), no existe diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos (P=0.4868) **E:** HDL disminuidas en GestPE (40.88±5.08 mg/dL, n=8) con respecto a GestCTR (58.64±4.55 mg/dL, n=21), la disminución es estadísticamente significativo (P=0.0361) **F:** LDL sin diferencia entre GestPE (120.8±20.70 mg/dL, n=10) y GestCTR (155.8±10.27 mg/dL, n=0.0955), no existe diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos (P=0.0955). El análisis estadístico se realizó usando una prueba t de *Student*.

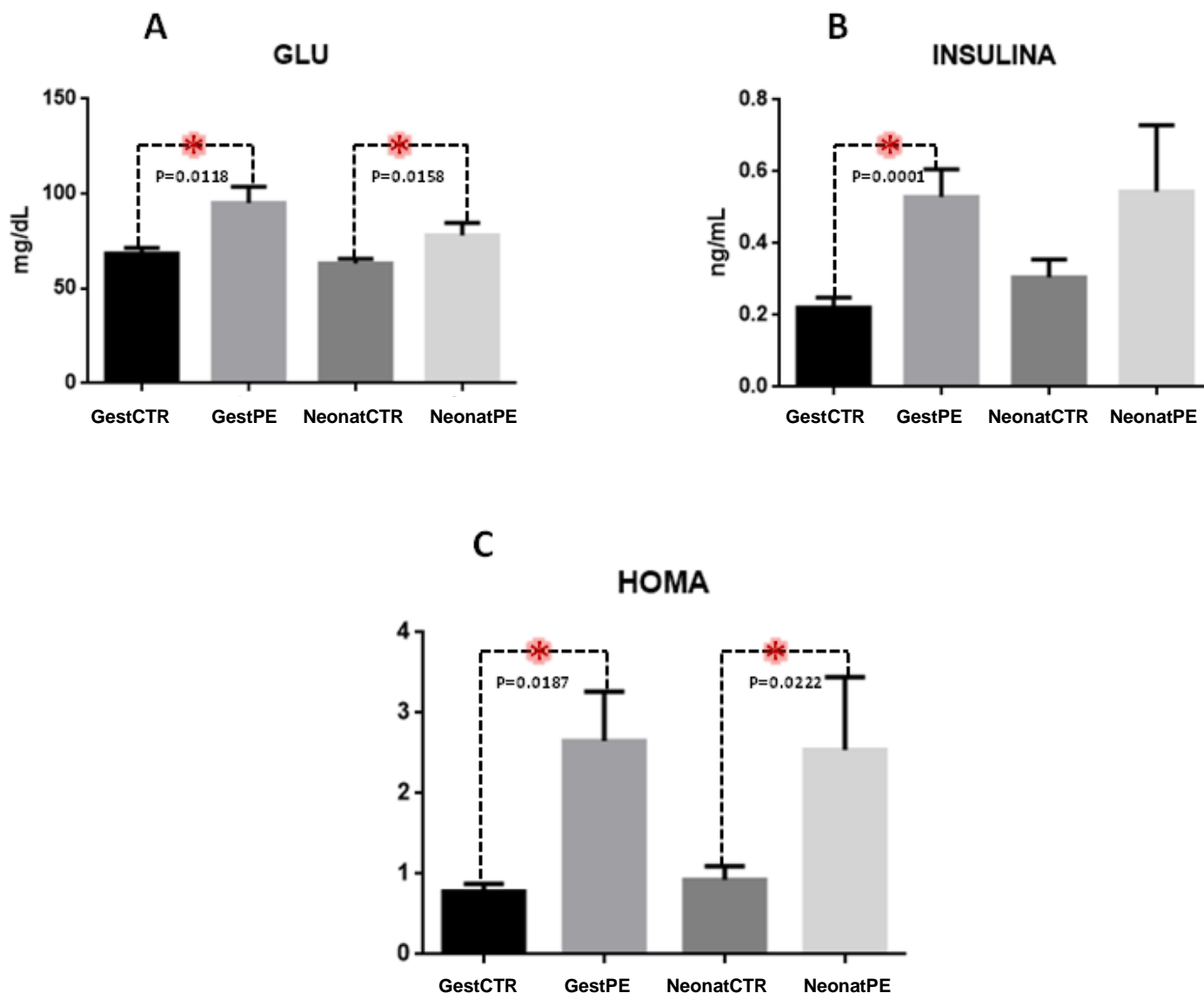
Se utilizaron los datos de los AGEs totales porque fueron los únicos que mostraron diferencias significativas entre grupos GestPE y GestCTR. El valor del coeficiente de correlación para HDL con respecto a los niveles de AGEs plasmáticos fue de 0.4697, por lo que no existió correlación entre AGEs y HDL.



**Figura 19. Correlación entre AGEs totales y lipoproteínas de alta densidad (HDL) en gestantes.** Correlación nula entre AGEs y HDL para GestPE, ambas variables no están relacionadas entre sí ( $r = -0.3571$  y  $P = 0.3894$ ). El análisis estadístico se realizó usando una prueba de correlación de *Pearson*.

### 7.6.3. Perfil metabólico

En la Figura 20 se muestra la comparación de grupos de GestCTR, GestPE, NeonatCTR y NeonatPE para las variables GLU, INS y HOMA. GLU ( $95.01 \pm 8.78$  mg/dL vs  $68.39 \pm 3.05$  mg/dL), INS ( $0.53 \pm 0.08$  ng/mL vs  $0.22 \pm 0.03$  ng/mL) y HOMA ( $2.62 \pm 0.61$  vs  $0.78 \pm 0.10$ ), se observan aumentadas de manera significativa en GestPE con respecto a GestCTR y en los neonatos se observan aumentadas en Neonat PE con respecto a NeonatCTR GLU ( $78.11 \pm 6.52$  mg/dL vs  $63.18 \pm 2.46$  mg/dL) y HOMA ( $2.54 \pm 0.90$  vs  $0.93 \pm 0.17$ ), mientras los niveles de INS no presentan diferencias significativas.

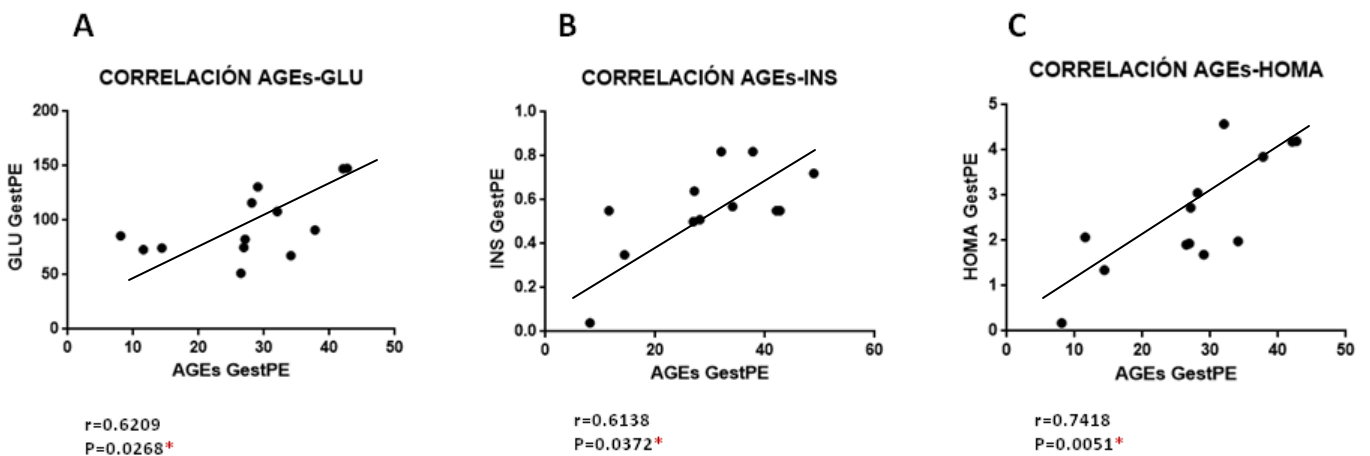


**Figura 20. Variables de perfil metabólico.** **A:** GLU aumentada en GestPE (95.01±8.78 mg/dL, n=13) y en NeonatPE (78.11±6.52 mg/dL, n=8) con respecto a GestCTR (68.39±3.05 mg/dL, n=22) y a NeonatCTR (63.18±2.46 mg/dL, n=18) respectivamente, ambos aumentos son estadísticamente significativos (P= 0.0118 y P=0.0158) **B:** INS aumentada en GestPE (0.53±0.08 ng/mL, n=9) con respecto a GestCTR (0.22±0.03 ng/mL, n=23), el aumento es estadísticamente significativa (P=0.0001), mientras la INS no muestra diferencia entre NeonatPE (0.54±0.18 ng/mL, n=8) y NeonatCTR (0.31±0.05 ng/mL, n=18), no existe diferencia significativa (P=0.2549) **C:** HOMA aumentado en GestPE (2.62±0.61, n=8) y en NeonatPE (2.54±0.90, n=8) con respecto a GestCTR (0.78±0.10, n=22) y a NeonatCTR (0.93±0.17, n=18) respectivamente, ambos aumentos son estadísticamente significativos (P=0.0187 y P=0.0222). El análisis estadístico se realizó usando una prueba t de *Student*; se precisó una corrección de *Welch* para los valores de GLU y HOMA.



En este caso se presentan los resultados para los 4 grupos de estudio ya que tanto en los grupos de neonatos como en los de gestantes hubo aumentos significativos importantes. Se presentan en la Figura 21 los diagramas obtenidos al correlacionar GLU, INS y HOMA con los niveles de AGEs totales encontrados en el plasma de las gestantes. Se utilizaron los datos de los AGEs totales de gestantes porque fueron los únicos que mostraron diferencias significativas entre grupos CTR y PE.

Los valores del coeficiente de correlación para GLU, INS y HOMA con respecto a los niveles de AGEs plasmáticos para las gestantes fue de 0.0268, 0.0272 y 0.0051 respectivamente, por lo que sí existió correlación positiva entre AGEs y estas variables metabólicas en gestantes. En el caso de los neonatos, no se calculó el coeficiente de correlación con AGEs porque los niveles de AGEs plasmáticos en cordón umbilical no se presentaron alterados.



**Figura 21. Correlación entre AGEs totales y variables metabólicas en gestantes.** **A:** Correlación positiva entre AGEs y GLU para GestPE, la correlación es significativa ( $r=0.6209$  y  $P=0.0268$ ) **B:** Correlación positiva entre AGEs e INS para GestPE, la correlación es significativa ( $r=0.7699$  y  $P=0.0195$ ) **C:** Correlación positiva entre AGEs y HOMA para GestPE, la correlación es significativa ( $r=0.8095$  y  $P=0.0218$ ). El análisis estadístico se realizó usando una prueba de correlación de *Spearman*.

#### 7.6.4. Resumen de las correlaciones

Para las correlaciones entre los niveles de AGEs totales y las variables GGT, AU, GLU,INS y HOMA, se calcularon los coeficientes *rho* de *Spearman*, mientras para las correlaciones de los niveles de AGEs y las variables LDH y HDL se calcularon los coeficientes *rho* de *Pearson*, de acuerdo a la distribución de los datos (ver Tabla 5). Todos los contrastes fueron bilaterales y se consideraron significativos los valores de  $P < 0.05$ .

En la Tabla 6 se muestra el resumen de las correlaciones entre los niveles plasmáticos de AGEs totales y los indicadores bioquímicos estudiados. Únicamente la enzima LDH y las lipoproteínas HDL no mostraron correlación que fuera estadísticamente significativa; GGT, AU, GLU, INS y HOMA se correlacionan positiva y de manera significativa con los niveles de AGEs totales.

**Tabla 6.-** Resultados obtenidos para la correlación de variables clínicas con respecto a AGEs totales.

AGEs totales	Parámetros de correlación	GGT	AU	LDH	HDL	GLUCOSA	INSULINA	HOMA
	r	0.7500	0.8110	0.3333	-0.3571	0.6209	0.7699	0.8095
	P	0.0255 *	0.0063 *	0.4279	0.3894	0.0268 *	0.0195 *	0.0218 *

\*  $P < 0.05$  Correlación estadísticamente significativa

## **8. DISCUSIÓN**

### **8.1. Cuantificación de AGEs en plasma**

La determinación de AGEs es compleja y varía dependiendo de la matriz biológica en donde son medidos, una razón para utilizar plasma en este estudio es que otorga una baja posibilidad de interferencia con los factores procoagulantes presentes que se encuentran aumentados en la condición preecláptica y pueden causar “atrapamiento” de las proteínas glicadas [156]. Además el plasma es considerado un vehículo ideal para analizar moléculas circulantes durante la gestación, debido a que el embarazo produce cambios dramáticos en el volumen y la composición de los fluidos corporales consistentes con un aumento en el volumen de plasma [157].

### **8.2. Variables clínicas.**

En este trabajo, la trombocitopenia clásicamente descrita como un recuento de plaquetas menor a  $100 \times 10^3$  plaq/mm<sup>3</sup> resultó ser la tercera variable diagnóstica alterada en las pacientes, lo que concuerda con varios grupos de trabajo que han establecido que junto con las pruebas de función hepática, son el tercer marcador más importante de complicaciones maternas y fetales en la PE después de la PA y la proteinuria [158]. Sin embargo, el número de mediciones en este caso es limitado debido a que en el expediente de GestCTR, al obtenerse valores normales de plaquetas, estos no se registran.

Por otro lado, en cuanto a la PA que se considera el marcador diagnóstico número uno por excelencia, en este trabajo se obtuvieron niveles muy por debajo de los esperados tanto para pacientes como para el grupo control. La proteinuria de 24 h y total, resultaron ser un buen marcador de la presencia de PE en las pacientes estudiadas, sin

embargo, en algunas gestantes control no se disponía de ese dato, ya que al detectar normalidad en la tira reactiva, se omite este registro.

Como se esperaba, las gestantes con PE presentaron diferencia significativa en los criterios diagnósticos utilizados para diagnosticar PE leve: aumento de la PA y proteinuria medida a las 24 h, de acuerdo con las directrices de la SSA, que como ya se mencionó, se basan a su vez en los criterios del Colegio Americano de Ginecología y Obstetricia.

En la medición de variables clínicas, es necesario tener en cuenta que en el embarazo aumenta la insuficiencia renal, el flujo sanguíneo y la tasa de filtración glomerular hasta en un 50% [159]. El aumento en la excreción urinaria de proteínas en PE que ocurre secundaria a alteraciones glomerulares, puede afectar de manera no específica los niveles sanguíneos de analitos con excreción renal, provocando variaciones de una paciente a otra.

En los resultados de las variables de neonatos, se observó una diferencia de peso entre los NeonatPE con respecto a los NeonatPE, lo que demuestra que los cambios de PA en la gestante afectan directamente el desarrollo del feto. Se ha reportado la relación de bajo peso al nacer del neonato con alteraciones en su vida posterior [160], lo que demuestra la importancia que reviste el control de la PE para evitar estas complicaciones, sin embargo, los valores de bajo peso al nacer son considerados cuando son menores a 2. 500 Kg con respecto al peso considerado normal [161], por lo que aún con las diferencias presentadas entre ambos grupos, no se considerarían clínicamente con un bajo peso.

### **8.3. Niveles de AGEs**

El nivel aumentado de AGEs totales en plasma de pacientes con PE medidos por ELISA, coincide con reportes previos en los cuales se observaron niveles incrementados de AGEs en suero de estas pacientes [138-144]. En estos estudios se

midieron AGEs totales que representan los AGEs que están formando un complejo con proteínas completas (AGEs grandes), sumados a los AGEs parcialmente degradados o formados por oligopeptidos (AGEs pequeños), sin embargo, existen pocos reportes de estudios que hayan medido AGEs de mayor peso molecular diferenciándolos de los que se forman por aductos libres o por oligopeptidos [162].

En este estudio se observó un incremento en la PE de los niveles de AGEs totales, que incluyen complejos proteína-AGEs intactos y AGEs parcialmente degradados, pero no hubo diferencia significativa en los niveles de complejos intactos de AGEs medidos por RIA. Basados en estos resultados podemos suponer:

i) Que los AGEs que se ven alterados durante la PE, son AGEs formados por péptidos pequeños que son liberados a la circulación y que se glican en el torrente.

ii) Que estos AGEs que están aumentados en PE, formaron parte de un complejo mayor y ya han pasado por un proceso parcial de degradación en macrófagos, para ser excretados en orina.

iii) Que tomando en cuenta la tendencia de las gestantes al sobrepeso, el aumento de AGEs posiblemente provenga de fuentes exógenas como la dieta; los AGEs formados en los alimentos se ha demostrado que son de bajo peso molecular pero igual generan AGEs nuevos intactos que desencadenan respuestas inflamatorias [163].

Independientemente de su origen, existen reportes de que estos AGEs pequeños son la mayor proporción de AGEs excretados en orina por sujetos normales [170], principalmente porque los entrecruzamientos atrapan los AGEs más grandes en tejidos, mientras los AGEs pequeños predominan en la circulación.

Estos AGEs pequeños se ven marcadamente aumentados en uremia cuando la función renal decae [7], esto podría significar que la activación de la vía de detoxificación de AGEs mediada por AGER-1,2 y 3, permanece o permaneció en los trimestres anteriores

del embarazo más activa en gestantes con PE que en gestantes control. De la misma forma, estos AGEs parcialmente degradados pueden ser los causantes de la activación de la vía RAGE-AGE.

Por otra parte, como los parámetros de eliminación cambian durante el embarazo, los niveles plasmáticos de AGEs tendrían que ser interpretados junto con la capacidad del riñón para eliminar estos compuestos, realizando el cálculo de la excreción fraccional o los niveles de analito después de la corrección de la proteinuria, lo cual ayudaría a dilucidar mejor si el aumento de los valores séricos se debe a un incremento de la producción de AGEs o a una disminución en la excreción de los mismos.

En general observamos que los AGEs totales son mayores en embarazadas que en sujetos normales, la necesidad de hacer una dilución de muestras de 1:20, indica que de acuerdo al uso que comúnmente se le da al kit que fue utilizado, que es detección de AGEs en diabetes, los niveles de AGEs son mayores que los niveles de corte que se utilizan en la clínica para pacientes diabéticos.

## **8.4. Relación entre AGEs y perfil hepático**

El promedio del ácido úrico en nuestro grupo control fue de  $4.04 \pm 0.26$  mg/dL, mientras el grupo de PE eleva sus promedios sobre 5 mg/dL, lo que representa la diferencia significativa más alta dentro del perfil hepático para las gestantes. Es importante mencionar que en el grupo GestPE, el 75% de las pacientes con PE tiene valores de uricemia sobre 4 mg/dl, mientras que en el grupo GestCTR, hasta un 25% se encuentra sobre este valor. En general se sabe que el nivel de ácido úrico en la gestante normal desciende a un promedio de  $3.1 \pm 0.8$  mg/dl [164]; por lo que este porcentaje es alto para embarazos que se consideran normales.

El ácido úrico aumenta en general antes que haya una elevación de creatinina; es decir, la hiperuricemia indica una disminución de la depuración renal, lo que sugiere que el grupo de GestPE, empieza a presentar una reducción de esta suficiencia renal aún

cuando la diferencia de creatinina, no es estadísticamente significativa con respecto a las GestCTR.

Los altos niveles de ácido úrico materno, tienen un reflejo en los valores circulantes del grupo de NeonatPE, que presenta valores significativamente más altos con respecto al grupo de NeonatCTR; destaca entonces una relación directa entre los niveles de ácido úrico y PE, lo cual ha sido reportado previamente [165]. Se ha propuesto que el aumento de los niveles de ácido úrico en la PE, se deben a una disminución de la depuración renal por un aumento de la actividad de la xantina oxidasa, secundario a fenómenos de hipoxia que generan una activación endotelial, lo que contribuye a la producción de especies ROS, capaces de perturbar la función endotelial y de contribuir en la patogénesis de esta enfermedad [166].

La correlación entre los niveles de AGEs pequeños y los niveles de ácido úrico, arrojaron un coeficiente  $r=0.8110$  y una  $P=0.0023$ , lo que denota una correlación positiva fuerte y la más significativa de todo nuestro estudio. Hasta ahora no son claros los mecanismos que desencadenan la hiperuricemia durante la PE, pero se ha observado que la capacidad del ácido úrico para promover la inflamación, el estrés oxidativo y la disfunción endotelial es alta [167,168].

La correlación positiva que fue encontrada entre AGEs y la enzima gamma glutamil transferasa ( $r=0.7500$  y  $P=0.0217$ ) se debe probablemente al vínculo entre ambas, que es el sistema de las glioxalinas, el cual en condiciones normales elimina del organismo precursores importantes de AGEs como GO, MGO y 3DGO. Este sistema consta de glioxalinas más una unidad catalítica de glutatión reducido (GSH), una disminución en el GSH celular, como resultado de un aumento de ROS, conduce a la disminución de la actividad de la glioxalasa y la acumulación de los precursores de AGEs, con la toxicidad que esto conlleva. Sin embargo, los aumentos de esta enzima son inespecíficos y pueden presentarse también en afecciones pancreáticas, cardíacas, renales y pulmonares. Se podrían realizar correlaciones más confiables, detectando niveles de AGEs específicamente formados con GO, MGO ó 3DGO.

En cuanto a los valores de lactato deshidrogenasa, se observó un aumento significativo en GestPE con respecto a GestCTR, pero al correlacionar los niveles de lactato deshidrogenasa con los niveles de AGEs totales, no mostraron estar relacionadas. Esta enzima es un tetrámero que tiene un peso molecular de cerca de 140 kDa, para que una molécula de tal tamaño sea liberada al espacio extracelular a través de la membrana citoplasmática, debe existir una anomalía en el intercambio celular normal como la destrucción celular, entonces al tener la gestante preecláptica ya desarrollado un daño vascular, es posible que la activación apoptótica que libera la enzima no esté relacionada de forma directa con los AGEs ni con sus vías de señalización, sino con la apoptosis subyacente.

## **8.5. Relación entre AGEs y perfil lipídico**

Las cifras obtenidas para lípidos en este estudio son moderadamente elevadas en todos los grupos de gestantes, sin embargo, las diferencias no mostraron ser estadísticamente significativas en los marcadores del metabolismo lipídico entre las embarazadas GestCTR y el grupo GestPE. Esto con excepción de las HDL, que fueron más bajas en las mujeres con PE que en las embarazadas sanas, en forma similar a lo reportado por *Belo* [169], *Ware-Jauregui* [170] y *Reyna-Villasmil* [171] en mujeres portuguesas, peruanas y venezolanas respectivamente.

Los resultados muestran que, los niveles LDL tienen tendencia a disminuir en la PE, pero no fueron significativas, lo que coincide con reportes anteriores [172]. La relación entre aumento de AGEs y tendencia a disminuir de LDL se explica porque se produce una acumulación de AGEs sobre las fibras de colágena y otras proteínas de la matriz extracelular con baja velocidad de recambio y se generan así grupos reactivos capaces de formar entrecruzamientos covalentes con proteínas solubles que circulan a través de ellas; esto ya se ha demostrado en diabetes [173]. Así, las LDL que tienen una vida media corta en circulación, pueden quedar covalentemente inmovilizadas por los AGEs reactivos de las proteínas estructurales arteriales de vida media larga a diferencia de las condiciones normales, donde las LDL plasmáticas penetran en la íntima arterial a



través del endotelio intacto, pudiendo volver libremente al plasma y donde la concentración de LDL arterial se correlaciona directamente con su concentración plasmática.

A este respecto, se ha demostrado que para una concentración constante de LDL, la proporción de atrapamiento covalente se incrementa en forma lineal con el grado de glicación del colágeno [174], así la fracción de LDL modificadas en las pacientes preeclámpticas podría estar representada por LDL glicadas atrapadas, densas y más electronegativas, por lo que los niveles disminuyen en circulación. Cabe mencionar que este tipo de modificaciones sucesivas de las LDL en la pared arterial, sobre todo de tipo oxidativo, determinan su potencial aterogénico [175] y las arterias espirales de mujeres con PE, frecuentemente presentan depósitos de colesterol y fosfolípidos, un fenómeno denominado 'aterosis aguda' que se ha demostrado que se presenta en las partes distales de las arterias espirales [176].

Por otro lado, se sabe que tanto en las HDL como en las LDL, la glicación ocurre simultáneamente en la fracción lipídica y en la fracción apoproteica, con predominio en esta última por su composición y su tamaño [39], cuando están glicadas en un entorno oxidante causan daño a tejido epitelial, estresando al retículo endoplásmico que activa el mecanismo de respuesta a proteínas desplegadas, generando autofagia, apoptosis y decremento de la glutatión peroxidasa, enzima considerada la más importante enzima antioxidante en las células HDL que pierde así su rol protector [31].

La glicación podría explicar porque aunque los niveles de HDL se encuentren disminuidos, los niveles de colesterol y triglicéridos no aumenten significativamente; cuando las HDL se encuentran glicadas, la remoción de colesterol de los depósitos intracelulares mediada por receptores está disminuida, pero la captación inespecífica de colesterol de la membrana no está reducida [177]. Además, se ha demostrado que la velocidad de transferencia de colesterol, está afectada por la glicación del componente proteico pero no del componente lipídico de las HDL dadoras y si, como observamos en nuestros resultados los AGEs que forman complejos intactos no son los que están

aumentados en PE, podríamos esperar que los AGEs pequeños que si están aumentados, ocasionen glicación solo en ciertas fracciones de las HDL, lo que no anula totalmente su captación de colesterol, pero si aumenta su potencial aterogénico.

## 8.6. Relación entre AGEs y perfil metabólico

Las altas correlaciones encontradas en este trabajo entre los niveles de insulina, glucosa y HOMA con respecto a los AGEs, confirman la importancia de los AGEs como mediadores de modificaciones, que a nivel energético afectan el metabolismo en la PE [178].

Una de las posibles causas de la asociación entre AGEs y altos niveles de insulina en la PE, son los efectos de la modificación por el proceso de glicación de la molécula de insulina en sí; aunque tiene una vida media muy corta (5-10 min), se ha observado que la glicación de insulina y proinsulina, puede ocurrir en el páncreas durante los períodos de síntesis y almacenamiento. En un estudio de *Boyd* y col., encontraron que la infusión de insulina glicada a ratones mostró una reducción del 20% en la potencia de disminución de la glucosa circulante en comparación con la forma de insulina no glicada [179]. En otro estudio de este mismo grupo, *Hunter* y col. demostraron que la insulina glicada, comprendía aproximadamente el 9% de insulina total en el plasma de pacientes con diabetes tipo 2 y que se requería 70% más insulina glicada para inducir una cantidad similar de captación de glucosa [180]. Por lo tanto, la evidencia sugiere que la glicación de la insulina sucede y puede afectar su función.

*Kooptiwut* y col. abordaron estos conceptos directamente en los islotes pancreáticos, sugiriendo que los aumentos crónicos de AGEs ocasionados por aumentos en glucosa, podrían participar en la disfunción de los islotes aún cuando la glucemia fuera revertida [181]. Además la glicación de insulina, interfiere en las vías moleculares complejas de señalización de la insulina afectando su sensibilidad [182]. *Fiory* y col. demostraron que la modificación por MG en la insulina, bloqueó la fosforilación de tirosina del sustrato de

receptor de insulina (IRS) y la activación de la proteína fosfoinositol 3 cinasa (PI3K) en una línea de células beta pancreáticas [183].

En cuanto a la glicación en otras proteínas, se ha demostrado que la glicación de albúmina aumenta la producción de TNF $\alpha$ , lo que se ha relacionado con la resistencia a la insulina a través de la inducción de mecanismos pro-inflamatorios que suprimen la transducción de la señal [184,185]. Por otro lado, *Gugliucci* y col propusieron que la detección de los niveles de AMP por AMPK es dependiente de un dominio con tres residuos de arginina, que podrían ser susceptibles de modificación por el potente agente de glicación MG, y entonces la modificación funcional pueda resultar también posible [186].

En general, en cuanto a los niveles circulantes de AGEs, *Unoki-Kubota* y col examinaron un modelo de ratón de obesidad y diabetes tipo 2, y encontraron que los niveles de AGE se correlacionaban positivamente con los niveles de insulina en estos animales [187].

Los valores alterados de glucosa y HOMA encontrados en el presente estudio en los neonatos, puede ser un reflejo de los valores alterados en la gestante, así como las variaciones en el peso al nacer, pero es interesante resaltar que no existieron diferencias significativas en los valores de insulina de NeonatPE, lo cual nos muestra, junto con los resultados de las relaciones de AGEs gestante/neonato, que posiblemente se activan mecanismos de compensación para evitar el daño fetal; sería necesario realizar más estudios para determinar el tipo de transporte de AGEs a través de la barrera placentaria en función de sus concentraciones y su tamaño, así como su cinética de formación en el entorno fetal.

## 9. CONCLUSIONES

Dos fueron los hallazgos más importantes de este estudio: una mayor concentración de AGEs pequeños circulantes en plasma de pacientes con PE comparados con mujeres con embarazo normal y correlaciones significativamente altas de gamma glutamil transferasa, ácido úrico, glucosa, insulina y HOMA con este tipo de AGEs.

Los resultados sugieren también, que una parte asociada al trastorno metabólico en la PE, podría estar relacionada con los niveles de estos AGEs circulantes pequeños.

Las correlaciones encontradas pueden explicar alteraciones que son causa y/o consecuencia del espectro característico de este trastorno. Si esta hipótesis es cierta, el desarrollo de biomarcadores relacionados con glicación y los agentes que se dirigen contra la activación de las vías asociadas a AGEs, ya sea disminuyendo los estímulos específicos o bloqueando los elementos de señalización, pueden tener un valor diagnóstico y terapéutico potencial para prevenir la aparición o los daños causados por la PE.

# 10. REFERENCIAS

---

1. Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. Advanced glycation end-products: a review. *Diab.* 2001;44:129–146.
2. Vlassara H, Brownlee M, Cerami A. High-affinity-receptor-mediated uptake and degradation of glucose-modified proteins: a potential mechanism for the removal of senescent macromolecules. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1985;82:5588-5592.
3. Daffu G, Hurtado del Pozo C, O'Shea KM, Ananthakrishnan R, Ramasamy R, Schmidt AM. Radical roles for RAGE in the pathogenesis of oxidative stress in cardiovascular diseases and beyond. *Int J Mol Sci.* 2013;14:19891-19910
4. Stitt AW, He C, Vlassara H. Characterization of advanced glycation end products receptor complex in human vascular endothelial cells. *Biochem Bioph Res Co.* 1999;256:549-556
5. Lan L, Han F, Lang X, Chen J. Monocyte chemotactic protein-1, fractalkine, and receptor for advanced glycation end products in different pathological types of lupus nephritis and their value in different treatment prognoses. *PLoS One.* 2016;26;11(7):e0159964.
6. Vitek MP, Bhattyacharya K, Glendening JM, Stopa E. Vlassara H, Bucalla R et al. Advanced glycation end products contribute to amyloidosis in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91:4766-4770.
7. Belmokhtar K, Robert T, Ortilon J, Braconnier A, Vuiblet V, Boulagnon-Rombi C. Signaling of serum amyloid A through receptor for advanced glycation end products as a possible mechanism for uremia-related atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2016;36(5):800-809.
8. Oczypok EA. Pulmonary receptor for advanced glycation end-products promotes asthma pathogenesis through IL-33 and accumulation of group 2 innate lymphoid cells.. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;136(3):747-756.
9. Drinda S, Franke S, Canet C, Petrow P, Bräuer R, Hüttich C, et al. Identification of the advanced glycation end products N $\epsilon$ -carboxymethyllysine in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Reum Dis.* 2002;(61)6:488-492.
10. Sebekova K, Podracka L, Blazicek P, Syrova D, Heidland A, Schinzel R et al. Plasma levels of advanced glycation end products in children with renal disease. *Pediatr Nephrol.* 2001;16:1105-1112.
11. Brownlee M. Glycation products and the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Care.* 1992;15:1835-1843.

- 
12. de Ranitz-Greven WL, Kaasenbrood L, Poucki WK, Hamerling J, Bos DC, Visser GH, et al. Advanced glycation end products, measured as skin autofluorescence, during normal pregnancy and pregnancy complicated by diabetes mellitus. *Diabetes Technol Ther.* 2012;14:1134-1139.
  13. Maillard L. Action des acides aminés sur les sucres : formation des mélanoidines par voie méthodique. *CR Acad Sci.* 1912;154:66-68.
  14. Vistoli G, De Maddis D, Cipak A, Zarkovic N, Carini M, Aldini G. Advanced glycoxidation and lipoxidation end products: an overview of their mechanisms of formation. *Free Radical Res.* 2013;47:3-27.
  15. Bender DA, Mayes PA. *Harper's Illustrated Biochemistry*, 30<sup>a</sup> ed. New York, NY: McGraw-Hill; 2015. Chapter 15, Carbohydrates of Physiological Significance. pp 880.
  16. Katchalsky A, Sharon N. Kinetics of aldose-amino acid interaction. *Biochim Biophys Acta.* 1953;10:290-301.
  17. Laroque D, Inisan C, Berger C, Vouland E, Dufosse L, Guerard F. Kinetic study on the Maillard reaction, consideration of sugar reactivity. *Food Chem.* 2008;111:1032-1042.
  18. Schalkwijk CG, Stehouwer CD, Van Hinsbergh V. Fructose-mediated non-enzymatic glycation: sweet coupling or bad modification. *Diabetes Metab Res Rev.* 2004;20:369-382.
  19. Huhta E, Parjanen A, Mikkola S. A kinetic study on the chemical cleavage of nucleoside diphosphate sugars. *Carbohydr Res.* 2010;345(5):696-703.
  20. Watkins NG, Thorpe RS, and Baynes JW. Glycation of amino groups in protein. *J Biol Chem.* 1985;260(19):10629-10636.
  21. Münch G, Schick Tanz D, Behme A, Gerlach M, Riederer P, Palm D, et al. Amino acid specificity of glycation and protein-AGE crosslinking reactivities determined with a dipeptide SPOT library. *Nat Biotechnol.* 1999;17:1006-1010.
  22. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycemic damage. *Nature.* 2000;404:787-790.
  23. Gabbay KH. Glycosylated hemoglobin and diabetes mellitus. *Med Clin N Am.* 1982;66(6):1309-1315.
  24. Jia X, Olson JH, Ross RS, et al. Structural and functional changes in human insulin induced by methylglyoxal. *Faseb J.* 2016;20(9):1555-1557.
  25. Jones IR, Owens DR, William S, Ryder RJ, Birtwell AJ, Jones MK, et al. Glycosylated serum albumin: an intermediate index of diabetic control. *Diabetes Care.* 1983;6(5):501-503.
  26. Kohn RR, Schnider SL. Glucosylation of human collagen. *Diabetes.* 1982;31(3):47-51.

- 
27. Li DY, Brooke B, Davis EC, Mecham RP, Sorensen LK, Boak BB et al. Elastin is an essential determinant of arterial morphogenesis. *Nature*. 1998;393:276-280.
  28. Wetzels S, Wouters K, Schalkwijk CG, Vanmierlo T, Hendriks J. Methylglyoxal-derived advanced glycation end products in multiple sclerosis. *Int J Mol Sci*. 2017;18:418-421.
  29. Dhar S, Sun Z, Meininger GA, Hill MA. Nonenzymatic glycation interferes with fibronectin-integrin interactions in vascular smooth muscle cells. *Microcirculation*. 2017;24(3):e12347.
  30. Makino H, Shikata K, Hironaka K, Kushiro M, Yamasaki Y, Sugimoto H. Ultrastructure of nonenzymatic glycated mesangial matrix in diabetic nephropathy. *Kidney Int*. 1995;48:517-526.
  31. McVerry VA, Thorpe S, Gaffny JP. Non enzymatic glycosylation of fibrinogen. *Haemostasis*. 1981;10:261-270.
  32. Soberin IA, Tertov VV, Orekhov AN. Atherogenic modified LDL in Diabetes. *Diabetes*. 1996;45(3):55-59.
  33. Duel PB, Oram JF, Bierman EL. Nonenzymatic glycosylation of DHL-receptor-mediated cholesterol efflux. *Diabetes*. 1991;31(3):47-51.
  34. Kaneshige H. Nonenzymatic glycosylation of serum IgG and its effect on antibody activity in patients with diabetes mellitus. *Diabetes*. 1987;36:822-828.
  35. Manini T, Gugliucci A, Sodahlon YK, Stahl AJ, Blickle JF, Brogard JM. Glycated immunoglobulin M in diabetic patients. *Ann Biol Clin*. 1993;51(10):887-891.
  36. Nursten HE. The Maillard reaction: chemistry, biochemistry and implications. *J Am Chem Soc*. 2005;127(41):14520-14528.
  37. Amadori M. The product of the condensation of glucose and p-phenetidine. *Atti Reale Accad Nazl Lincei*. 1929;9:68-73.
  38. Thornalley PJ, Langborg A, Minhas HS. Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem J*. 1999; 344:109-116.
  39. Bucala R, Makita Z, Koschinski T, Cerami A, Vlassara H. Lipid advanced glycosylation. Pathway for lipid oxidation in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90:6434-6438.
  40. Anderson MM, Requena JR, Crowley JR, Thorpe SR, Heinecke JW. The myeloperoxidase system of human phagocytes generates N-(carboxymethyl)lysine on proteins: a mechanism for producing advanced glycation end products in sites of inflammation. *J Clin Inv*. 1999;104(1):103-113.
  41. Monnier VM, Cerami A. Nonenzymatic browning in vivo: possible process of aging of long lived proteins. *Science*. 1981;211:491-493.

- 
42. Bucala R, Model P, Cerami A. Modifications of DNA by reducing sugars: a possible mechanism for nucleic acid aging and age-related dysfunction in gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:105-109.
  43. Hodge J. Chemistry of browning reactions in model systems. *J Agric Food Chem.* 1953;1:928-943 .
  44. Das BK, Sun TX, Akhtar NJ, Chylack LT, Liang N. Fluorescence and immunochemical studies of advanced glycation-related lens pigments. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998;39:2058-2066.
  45. Thornalley PJ, Rabbani N. Detection of oxidized and glycated proteins in clinical samples using mass spectrometry: a user's perspective. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1840:818–829.
  46. Ling X, Nagai R, Sakashita N, Takeya M, Horiuchi S. Immunohistochemical distribution and quantitative biochemical detection of advanced glycation end products in fetal to adult rats and in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Lab Invest.* 2001;37:845–861.
  47. Thornalley PJ. Advances in glyoxalase research. Expression in malignancy, anti-proliferative effects of methylglyoxal, glyoxalase I inhibitor diesters and S-Dlactoylglutathione, and methylglyoxal-modified protein binding and endocytosis by the advanced glycation end product receptor. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1995; 20:99-128 .
  48. Schwarzenbolz U, Henle T, Haebner R, Klostermeyer A. On the reaction of glyoxal with proteins. *Z Lebensm Unters Forsch.* 1997;205:121-124 .
  49. Lederer MO, Klaiber RG. Cross-linking of proteins by Maillard processes: characterization and detection of lysine arginine cross-links derived from glyoxal and methylglyoxal. *Bioorganic Med Chem.* 1999;7:2499-2507.
  50. Walker D, Lue LF, Paul G, Patel A, Sabbagh MN. Receptor for advanced glycation endproduct modulators: a new therapeutic target in Alzheimer's disease. *Expert Opin Inv Drug.* 2015;24(3):393-399.
  51. Kalapos MP. Methylglyoxal in living organisms. Chemistry, biochemistry, toxicology and biological implications. *Toxicol Lett.* 1999;110:145-175 .
  52. Dyer DG, Blackledge JA, Thorpe SR, Baynes JW. Formation of pentosidine during nonenzymatic browning of protein by glucose: identification of glucose and other carbohydrates as possible precursors of pentosidine in vivo. *J. Biol. Chem.* 1991;266(18):11654-11660.
  53. Moriyama T, Kemi M, Okumura C, Yoshihara K, Horie T. Involvement of advanced glycation end-products, pentosidine and N-(carboxymethyl)lysine, in doxorubicin induced cardiomyopathy in rats. *Toxicology.* 2010;268:89-97.



- 
- 54.** Xie J, Reverdatto S, Frolov A, Hoffman R, Burz DS, Shekman A. Structural basis for pattern recognition by the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *J Biol Chem.* 2008;283:27255-27269.
- 55.** Kislinger T, Fu C, Huber B, Qu W, Taguchi A, Du Yan S, et al. N-(Carboxymethyl)lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression. *J Biol Chem.* 1999;44:31740-31749.
- 56.** Hori M, Yagi M, Nomoto K, Ichijo R, Shimode A, Kitano T, et al. Experimental models for advanced glycation end product formation using albumin, collagen, elastin, keratin and proteoglycan. *J Anti Aging Med.* 2012;9(5):125-134.
- 57.** Thornalley PJ. Measurement of protein glycation, glycated peptides and glycation free adducts. *Periton Dialysis Int.* 2005;25:522-533.
- 58.** Srikishna G, Freeze HH. Endogenous damage-associated molecular pattern molecules at the crossroads of inflammation and cancer. *Neoplasia.* 2009;11:615-628.
- 59.** McFarlane S, Gleen JV, Lichanska AM, Simpson DA, Stitt AW. Characterization of advanced glycation end products receptor complex in human vascular endothelial cells. *Brit J Ophtalm.* 2005;89:107-112.
- 60.** Hanssen KF, Making sense of advanced glycation end products (AGE). *Int Diabetes Monit.* 1998;10(4):1-5.
- 61.** Horiuchi S, Sakamoto Y, Sakai M. Scavenger receptors for oxidized and glycated proteins. *Amino Acids.* 2003;25:283-292.
- 62.** Turk N, Momar A, Mrzljav V, Turk Z. Urinary excretion of advanced glycation end products in patients with type 2 diabetes and various stages of proteinuria. *Diabetes Metab J.* 2004;30:187-192.
- 63.** Forster A, Kuhne Y, Henle T. Studies on absorption and elimination of dietary Maillard reaction products. *Ann New York Acad Sci.* 2005;1043:474-481.
- 64.** Ott C, Jacobs K, Hauckec E, Navarrete-Santos A, Grunea T, Simm A. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox Biol.* 2014;2:411-429.
- 65.** Wautier M, Chappey O, Corda S, Stern DM, Schmidt AM, Wautier J. Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidative stress to altered gene expression via RAGE. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001;280:685-694.
- 66.** Fritz G. RAGE: a single receptor fits multiple ligands. *Trends Biochem Sci.* 2011;36(12):625-32.

- 
67. Ikeda K, Higashi T, Sano H, Jinnouchi Y, Yoshida M, Araki T. N(Carboxymethyl)lysine protein adduct is a major immunological epitope in proteins modified with advanced glycation end products of the Maillard reaction. *Biochemistry*. 1996;35:8075-8083.
68. Vlassara H, Cai W, Goodman S, Pyzik R, Yong A, Chen X, et al. Protection against Loss of Innate Defenses in Adulthood by Low Advanced Glycation End Products (AGE) Intake: Role of the Antiinflammatory AGE Receptor-1. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(11):4483-4491.
69. Lu C, He JC, Cai W, Lu H, Zhu L, Vlassara H. Advanced glycation endproduct (AGE) receptor 1 is a negative regulator of the inflammatory response to AGE in mesangial cells. *Proc Natl Acad Sci*. 2004;101(32):11767-11772.
70. He CJ, Zheng F, Stitt A, Striker L, Hattori M, Vlassara H. Differential expression of renal AGE-receptor genes in NOD mice: Possible role in nonobese diabetic renal disease. *Kidney Int*. 2000;58:1931-1940.
71. He CJ, Koschinsky T, Buenting C, Vlassara H. Presence of diabetic complications in type 1 diabetic patients correlates with low expression of mononuclear cell AGE-R1 and elevated serum AGE. *Mol Med*. 2001;7(3):159-168.
72. 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(26):16498-16506.
73. Huttunen HJ, Kuja-Panula J, Sorci G, Agneletti AL, Donato R, Rauvala H. Corregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphoterin and S100 proteins through RAGE activation. *J Biol Chem*. 2000;275:40096-40105.
74. Menini S, Iacobini C, Ricci C, Blasetti C, Salvi L, Pesce CM, et al. The galectin-3/RAGE dyad modulates vascular osteogenesis in atherosclerosis. *Cardiovasc Res*. 2013;100(3):472-480.
75. Ono Y, Aoki S, Ohnishi K, Yasuda T, Kawano K. Increased serum levels of advanced glycation end-products and diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract*. 1998;41(2):131-137.
76. Uribarri J, Cai W, Peppas M, Goodman S, Ferrucci L, Vlassara H. Circulating glycotoxins and dietary advanced glycation end products: two links to inflammatory response, oxidative stress, and aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2007;62(4):427-433.
77. Isami F, West BJ, Nakajima S, Yamagishi S. Association of advanced glycation end products, evaluated by skin autofluorescence, with lifestyle habits in a general Japanese population. *J In Med Res*. 2018;0(0):1-9.

- 
- 78.** Kellow NJ, Coughlan MT, Reid CM. Association between habitual dietary and lifestyle behaviours and skin autofluorescence (SAF), a marker of tissue accumulation of advanced glycation endproducts (AGEs), in healthy adults. *Eur J Nutr* 2017. DOI: 0.1007/s00394-017-1495-y.
- 79.** Organización Mundial de la Salud. Informe mundial sobre diabetes OMS 2014. Disponible en: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/254649/1/9789243565255-spa.pdf>. [Consultado el 04 de Diciembre de 2017].
- 80.** Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complication in diabetees. *Diabetes*. 1991;40:405-412.
- 81.** Awasthi S, Murugan NA, Saraswath NT. Advanced glycation end products modulate structure and drug binding properties of albumin. *Molec Pharm*. 2015;12(9): 3312-3322.
- 82.** Bryszwska M, Zavodnik IB, Niekurzak A, Szosland K. Oxidative processes in red blod cells from normal and diabetics individuals, *Biochem Mol Biol Int*. 1995;37(2):345-354.
- 83.** Passarelli M, Catanozi S, Nakandakare ER. Plasma lipoproteins from patients with poorly controlled diabetes mellitus and in vitro glycation of lipoproteins enhance the transfer rate of cholesteryl ester from HDL to apo-B-containing lipoproteins. *Diabetologia*. 1997;40:1085-1093.
- 84.** Raghav A, Ahmad J, Alam K. Nonenzymatic glycosylation of human serum albumin and its effect on antibodies profile in patients with diabetes mellitus. *PLoS One*. 2017;12(5):e0176970.
- 85.** Yoshimaru T, Suzuki Y, Inoue T, et al. Extracellular superoxide released from mitochondria mediates mast cell death by advanced glycation end products. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1783(12):2332–2343.
- 86.** Brett J, Schmidt AM, Yan SD, Zou YS, Weidman E, Pinsky D, et al. Survey of the Distribution of a Newly Characterized Receptor for Advanced Glycation End Products in Tissues. *Am J Pathol*. 1993;143(6):1699-1712.
- 87.** Cai W, Gao QD, Zhu L, Peppia M, He C, Vlassara H. Oxidative stress inducing carbonyl compounds from common foods; novel mediators of cellular dysfunction. *Mol Med*. 2002;8:337-346.
- 88.** Navarrete Santos A, Jacobs K, Simm A, Glaubitz N, Horstkorte R, Hofmann B. Dicarbonyls induce senescence of human vascular endothelial cells. *Mech Ageing Dev*. 2017;166:24-32.
- 89.** Stirban A, Gawlowski T, Roden M. Vascular effects of advanced glycation endproducts: Clinical effects and molecular mechanisms. *Mol Metab*. 2014;3:94-108.

- 
- 90.** Amore A, Cirina P, Mitola S. Nonenzymatically glycated albumin (Amadoriadducts) enhances nitric oxide synthase activity and gene expression in endothelial cells. *Kidney Int.* 1997;51:27-35.
- 91.** Xu B, Ji Y, Yoo K, Cao YX, Ferro A. Inhibition of human endothelial cell nitric oxide synthesis by advanced glycation end products but not glucose; relevance to diabetes. *Clin Sci.* 2005;109:439-446.
- 92.** Johnson LL, Tekabe Y, Kollaros M, Eng G, Bhatia K, Li C et al. Imaging RAGE expression in atherosclerotic plaques in hiperlipidemic pigs. *EJNMMI Res.* 2014; 4(26).
- 93.** Harja E, Bu DX, Hudson BI, Chang JS, Shen X, Hallam K. Vascular and inflammatory stresses mediate atherosclerosis via RAGE and its ligands in apoE<sup>-/-</sup> mice. *J Clin Invest.* 2008; 118:183-194.
- 94.** Tekabe Y, Li Q, Rosario R, Sedlar M, Majewski S, Hudson BI. Development of receptor for advanced glycation end products–directed imaging of atherosclerotic plaque in a murine model of spontaneous atherosclerosis. *Circ Cardiovasc Imaging.* 2008;1:212-219.
- 95.** Ramasamy R, Yan SF, Herold K, Clynes R, Schmidt AM. Receptor of advanced glycation end products fundamental roles in the inflammatory response: winding the way to the pathogenesis of endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Ann NY Acad Sci.* 2008;1126:7-13.
- 96.** Konishi H, et al. Advanced glycation end products induce secretion of chemokines and apoptosis in human first trimester trophoblasts. *Hum Rep.* 2004; 9(19): 2156-2162.
- 97.** Min C, Kang E, Yu SH, Shinn SH, Kim YS. Advanced glycation end products induce apoptosis and procoagulant activity in cultured human umbilical vein endothelial cells. *Diab Res Clin Prac.* 1999;46:197–202.
- 98.** Yu SY, Huang L, Song MB. Increased reactive oxygen species in endothelial cells stimulated by advanced glycation end products mediated by NADPH oxidase. *Chin J Arterioscler.* 2008;16(11):857-860.
- 99.** Hartley JDR, Ferguson BJ, Moffett A. The role of shed placental DNA in the systemic inflammatory syndrome of preeclampsia. *Am J Obs Gyn.* 2015;213(3):268-277.
- 100.** Holmlund U, Wähämaa H, Bachmayer N, Bremme K, Sverremark-Ekström E, Palmblad K. The novel inflammatory cytokine high mobility group box protein 1(HMGB1) is expressed by human term placenta. *Immunol.* 2007;122:430-437.
- 101.** Zhu L, Zhang Z, Zhang L, Shi Y, Qi J, Chang A, et al. HMGB1-RAGE signaling pathway in severe preeclampsia. *Placenta.* 2015;36:1148-1152.

- 
- 102.** Cooke CL, Brockelsby JC, Baker PN, Davidge ST. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is elevated in women with preeclampsia. *Pregnancy Hypertens.* 2003;22:173-184.
- 103.** Mutter WP, Karumanchi SA. Molecular mechanisms of preeclampsia. *Microvasc Res.* 2008;75(1):1-8.
- 104.** Duley L. The global impact of pre-eclampsia and eclampsia. *Semin Perinatol.* 2009;33:130-137.
- 105.** Steegers EA, von Dadelszen P, Duvekot JJ, Pijnenborg R. Pre- eclampsia. *Lancet.* 2010;376:631-644.
- 106.** Secretaría de Salud SSA. Observatorio de Mortalidad Materna en México (OMM). Numeralia 2013. (SSA/OPS/OMS). Disponible en: [http://www.omm.org.mx/images/stories/Documentos%20grandes/INDICADORES\\_2014\\_Web.pdf](http://www.omm.org.mx/images/stories/Documentos%20grandes/INDICADORES_2014_Web.pdf). [Consultado el 14 de Agosto de 2017].
- 107.** Bokslag A, Van Weissenbruch M, Mol BW, de Groot CJ. Preeclampsia; short and long-term consequences for mother and neonate. *Early Hum Dev.* 2016;102:47-50.
- 108.** Secretaría de Salud SSA. Catálogo Maestro de Guías de Práctica Clínica:IMSS-020-08. 2017. SSA. Disponible en: <http://www.cenetec-difusion.com/CMGPC/S-020-08/ER.pdf>. [Consultado el 22 de Diciembre de 2017].
- 109.** American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG), Task force on hypertension in pregnancy. Establishing the diagnosis of preeclampsia and eclampsia. *Hypertens Pregnancy.* 2013;122:1122-1134.
- 110.** Hauth JC, Ewell MG, Levine RJ, Esterlitz JR, Sibai B. Pregnancy outcomes in healthy nulliparas who developed hypertension. *Obstet Gynecol.* 2000;95:24-28.
- 111.** Buchbinder A, Sibai BM, Caritis S, Macpherson C, Hauth J. Adverse perinatal outcomes are significantly higher in severe gestational hypertension than in mild preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2002;186:66-71.
- 112.** Sibai BM. Diagnosis, controversies and management of the syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes and low platelet count. *Obstet Gynecol.* 2004;103(5): 981-991.
- 113.** Douglas KA, Redman CW. Eclampsia in the United Kingdom. *BMJ.* 1994;309:1395-1400.
- 114.** Williams PJ, Broughton PF. The genetics of pre-eclampsia and other hypertensive disorders of pregnancy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2011;25:405-417.
- 115.** Walker JJ. Pre-eclampsia. *Lancet.* 2000;356:1260-1265.

- 
- 116.** Sánchez-Rodríguez EN, Nava-Salazar S, Morán C, Romero-Arauz JF, Cerbón-Cervantes MA. Estado actual de la preeclampsia en México: de lo epidemiológico a sus mecanismos moleculares. *Rev Invest Clín.* 2010;62(3):252-260.
- 117.** Redman CWG, Sargent IL. Placental stress and pre-eclampsia: a revised view. *Placenta.* 2009;30:38-42.
- 118.** Heazell AEP, Crocker IP. Live and let die: Regulation of villous trophoblast apoptosis in normal and abnormal pregnancies. *Placenta.* 2008;29:772-783.
- 119.** Lyall FR. Mechanisms regulating cytotrophoblast invasion in normal pregnancy and pre-eclampsia. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2006;46:266-273.
- 120.** Brennan LJ, Morton JS, Davidge S. Vascular Dysfunction in Preeclampsia. *Microcirculation.* 2014;21:4-14.
- 121.** Yeh CC, Chao KC, Huang SJ. Innate immunity, decidual cells, and preeclampsia. *Rep Sci.* 2012;20(4):339-353.
- 122.** Pijnenborg R, Vercruyssen L, Hanssens M. The uterine spiral arteries in human pregnancy: facts and controversies. *Placenta.* 2006;27:939-958.
- 123.** Taylor RN, de Groot CJ, Cho YK, Lim KH. Circulating factors as markers and mediators of endothelial cell dysfunction in preeclampsia. *Semin Reprod Endocrinol.* 1998;16:17-31.
- 124.** Ziganshina MM, Pavlovich SV, Bovin NV, Sukhikh GT. Hyaluronic acid in vascular and immune homeostasis during normal pregnancy and preeclampsia. *Acta Naturae.* 2016;8(3):59-71.
- 125.** Striker LJ, Peten EP, Elliot SJ, Dio T, Striker GE. Mesangial cell turnover: effect of heparin and peptide growth factors. *Lab Invest* 1991;64(4): 446-456.
- 126.** Chui A, Murthi P, Brennecke SP, Ignjatovic V, Monagle PT, Said JM. The expression of placental proteoglycans in pre-eclampsia. *Gynecol Obstet Invest.* 2012;73(4):277-284.
- 127.** Rodgers GM, Taylor RN, Roberts JM. Preeclampsia is associated with a serum factor cytotoxic to human endothelial cells. *Am J Obstet Gynecol.* 1988;159:908-14.
- 128.** Hayman R, Warren A, Johnson I, Baker P. The preliminary characterization of a vasoactive circulating factor(s) in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2001;184(6):1196-1203.
- 129.** Anderson UD, Olsson MG, Kristensen KH, Åkerström B, Hansson SR. Review: Biochemical markers to predict preeclampsia. *Placenta.* 2012;33:42-47.
- 130.** Hertig A, Liere P. New markers in preeclampsia. *Clin Chim Acta.* 2010;411:1591-1595.

- 
- 131.** Cooke CL, Brockelsby JC, Baker PN, Davidge ST. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is elevated in women with preeclampsia. *Hypertens Pregnancy*. 2003;22:173-184.
- 132.** Huang QT, Zhang M, Zhong M. Advanced glycation end products as an upstream molecule triggers ROS-induced sFlt-1 production in extravillous trophoblasts: a novel bridge between oxidative stress and preeclampsia. *Placenta*. 2013;34(12):1177-1182.
- 133.** Jiang L, Yan J, Wu L. Study of the relationship between AGEs and oxidative stress damage to trophoblast cell mitochondria. *Ginekol Pol*. 2017;88(7):372-378.
- 134.** Loor G, Kondapalli J, Iwase H, Chandel NS, Waypa GB, Guzy RD. Mitochondrial oxidant stress triggers cell death in simulated ischemia-reperfusion. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813(7):1382-1394.
- 135.** Riboulet-Chavey A, Pierron A, Durand I, Murdaca J, Giudicelli J, Van Obberghen E. Methylglyoxal impairs the insulin signaling pathways independently of the formation of intracellular reactive oxygen species. *Diabetes*. 2006;55:1289-1299.
- 136.** Unoki H, Bujo H, Yamagishi S, Takeuchi M, Imaizumi T, Saito Y. Advanced glycation end products attenuate cellular insulin sensitivity by increasing the generation of intracellular reactive oxygen species in adipocytes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2007;76:236-244.
- 137.** Miele C, Riboulet-Chavey A, Maitan MA, Oriente F, Romano C, Formisano P, et al. Human glycated albumin affects glucose metabolism in L6 skeletal muscle cells by impairing insulin-induced receptor substrate (IRS) signaling through a protein kinase C alpha-mediated mechanism. *J Biol Chem*. 2003;278:47376-47387.
- 138.** Tsukimori K, Yoshitomi T, Morokuma S, Fukushima K, Wake N. Serum Uric Acid Levels Correlate With Plasma Hydrogen Peroxide and Protein Carbonyl Levels in Preeclampsia. *Am J Hyperten*. 2008;21(12):1343-1346.
- 139.** Chekir C, Nakatsuka M, Noguchi S, Konishi H, Kamada Y, et al. Accumulation of advanced glycation end products in women with preeclampsia: possible involvement of placental oxidative and nitrative stress. *Placenta*. 2006;27:225-233.
- 140.** Blaauw J, Smit AJ, Van Pampus MG, Van Doormaal JJ, Aarnoudse JG, et al. Skin autofluorescence, a marker of advanced glycation end products and oxidative stress, is increased in recently preeclamptic women. *Am J Obstet Gynecol*. 2006; 195(3):717-22.
- 141.** Coffeng SM, Blaauw J, Souwer ETD, Rakhorst G, Smit AJ, Graaff R, et al. Skin autofluorescence as marker of tissue advanced glycation end-products accumulation in formerly preeclamptic women. *Hypertens Pregnancy*. 2011;30(2):231-242.

- 
- 142.** Yan J, Jiang L. Expression of advanced glycation end products in placenta and concentration in maternal and umbilical serum in pre-eclampsia. *J Obstet Gynecol Res.* 2015;41(6):843-849.
- 143.** Xian N, Chen W. Correlation of the expressions of advanced glycation end products and its receptor in serum and placenta with the pathogenesis of preeclampsia. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 2015;50(7):493-499.
- 144.** Alexander KL, Mejia CA, Jordan C, Nelson MB, Howell BM, Jones CM. Differential receptor for advanced glycation end products expression in preeclamptic, intrauterine growth restricted, and gestational diabetic placentas. *Am J Reprod Immunol.* 2016;75(2):172-180.
- 145.** Founds S, Zeng X, Lykins D, Roberts JM. Developing potential candidates of preclinical preeclampsia. *Int J Mol Sci.* 2015;16:27208-27227.
- 146.** Enquobahrie DA, Qiu C, Muhie SY, Williams MA. Maternal peripheral blood gene expression in early pregnancy and preeclampsia. *Int J Mol Epidemiol Genet.* 2011;2(1):78-94.
- 147.** Vaiman D, Calicchio R, Miralles F. Landscape of transcriptional deregulations in the preeclamptic placenta. *PLoS ONE.* 2013;8(6): e65498.
- 148.** Shu C, Liu Z, Cui L, Wei C, Wang S. Protein profiling of preeclampsia placental tissues. *PLoS ONE.* 2014;9(11): e112890.
- 149.** Harsem NK, Braekke K, Torjussen T, Hanssen K, Staff AC. Advanced glycation end products in pregnancies complicated with diabetes mellitus or preeclampsia. *Hypertens Pregnancy.* 2008;27:374-386.
- 150.** Naruse K, Sado T, Noguchi T, Tsunemi T, Yoshida S, Akasaka J, et al. Peripheral RAGE (receptor for advanced glycation endproducts)-ligands in normal pregnancy and preeclampsia: novel markers of inflammatory response. *J Reprod Immunol.* 2012;93:69-74.
- 151.** Leenen, I. La prueba de la hipótesis nula y sus alternativas: revisión de algunas críticas y su relevancia para las ciencias médicas. *Inv Educ Méd.* 2012;1(4):225-234.
- 152.** Williams Z, Ben-Dov IZ, Elias R, Mihailovic A, Brown M, Rosenwaks Z, et al. Comprehensive profiling of circulating microRNA via small RNA sequencing of cDNA libraries reveals biomarker potential and limitations. *Proc Natl Acad Sci.* 2013;110 (11):4255-60.
- 153.** Norma Oficial Mexicana NOM-052-SEMARNAT-2005 que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos/Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, Protección ambiental-salud, ambiental-residuos peligrosos biológico-infecciosos clasificación y especificaciones de manejo. Disponible



---

en: [http://www.inb.unam.mx/stecnica/nom052\\_semarnat.pdf](http://www.inb.unam.mx/stecnica/nom052_semarnat.pdf). [Consultado el 15 de Enero de 2017].

**154.** Arranz MC, González RM. Utilización de un método rápido para la separación de la hormona libre y unida en el radioinmunoensayo de insulina. *Rev Cub Biomed.* 1989;17(3):150-156.

**155.** Reyes-Muñoz E, Martínez-Herrera EM, Ortega-González C, Arce-Sánchez L, Ávila-Carrasco A, Zamora-Escudero R. Valores de referencia de HOMA-IR y QUICKI durante el embarazo en mujeres mexicanas. *Ginecol Obstet Méx.* 2017;85(5):306-313.

**156.** Bretelle F, Sabatier F, Desprez D, Camoin L, Grunebaum L, Combes V, et al. Circulating microparticles: a marker of procoagulant state in normal pregnancy and pregnancy complicated by preeclampsia or intrauterine growth restriction. *Thromb Haemost* 2003; 89(03): 486-492.

**157.** Silver HM, Seebeck MA, RN, Carlson R. Comparison of total blood volume in normal, preeclamptic, and nonproteinuric gestational hypertensive pregnancy by simultaneous measurement of red blood cell and plasma volumes. *Am J Obstet Gynecol.* 1998;179:87-93.

**158.** Thangaratnam S, Ismail K, Sharp S, Coomarasamy A, O'Mahony F, Khan KS, et al. Prioritisation of tests for the prediction of preeclampsia complications: a Delphi survey. *Hypertens Pregnancy.* 2007;26:131-138.

**159.** Jeyabalan A, Conrad KP. Renal function during normal pregnancy and preeclampsia. *Front Biosci.* 2007;12:2425-2430.

**160.** Barker DJ. Adult consequences of fetal growth restriction. *Clin Obstet Gynecol.* 2006;49:270-283.

**161.** Bequer-Mendoza L, Gómez-Hernández T, Pérez de Alejo L, Molina Hernández O. Estudio bioquímico en sangre del cordón umbilical de recién nacidos teniendo en cuenta edad gestacional y peso al nacer. *Rev Lab Clin.* 2014;7(3):111-118.

**162.** Thornalley PJ, Battah S, Ahmed N, Karachalias N, Agalou S, Babaei-Jadidi R et al. Quantitative screening of advanced glycation end products in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectroscopy. *Biochem J.* 2003;375: 581-592.

**163.** Sharma C, Kaur A, Thind SS, Singh B, Raina S. Advanced glycation end-products (AGEs): an emerging concern for processed food industries. *J Food Sci Technol.* 2015;52(12):7561–7576.

**164.** Reece EA, Hobbins JC. *Obstetricia clinica / Clinical Obstetrics.* Ed. Médica Panamericana; 2010. 1312 p.p.

- 
- 165.** Chappell L, Seed P, Briley A, Kelly F, Hunt B, Charnock-Jones D. A longitudinal study of biochemical variables in women at risk of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 2002;187:127-136.
- 166.** Many A, Hubel C. Hyperuricemia and xantin oxidase in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 1996;174(1): 228-291.
- 167.** Hsu CD, Lee IS, Hong SF, Chou K, Copel JA. Is Hyperuricemia associated with placental infarction in preeclamptic pregnancy? *Am J Obstet Gynecol.* 1998;178(1):106s.
- 168.** Bainbridge SA, Roberts JM. Uric acid as a pathogenic factor in preeclampsia. *Placenta.* 2008;29:67-72.
- 169.** Belo L, Caslake M, Gaffney D, Santos-Silva A, Pereira-Leite L, Quintaniha A, et al. Changes in LDL size and HDL concentration in normal and preeclamptic pregnancies. *Atherosclerosis.* 2002;162:425–432.
- 170.** Ware-Jauregui S, Sanchez SE, Zhang C, Laraburre G, King IB, Williams MA. Plasma lipid concentrations in preeclamptic and normotensive peruvian women. *Int J Gynaecol Obstet.* 1999;67:147-155.
- 171.** Reyna-Villasmil E, Torres-Cepeda D, Peña-Paredes E, Mejia-Montill J, Reyna-Villasmil N, González-Rodríguez P. Concentraciones de homocisteína y perfil lipídico en preeclámpticas. *Gac Méd Caracas.* 2008;116:235-240.
- 172.** Raijmakers M, Van Tits B, Hak-Lemmers H, Roes E, Steegers E, Peters W. Low plasma levels of oxidized low density lipoprotein in preeclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2004;83:1173-1177.
- 173.** Sobenin IA, Tertov VV, Orekhov AN. Atherogenic modified LDL in diabetes. *Diabetes.* 1996;45(3):S35-S39.
- 174.** Brownlee M, Vlassara H, Cerami A. Nonenzymatic glycosylation products on collagen covalently trap LDL. *Diabetes.* 1985;34:938-941.
- 175.** Witztum JL. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet.* 1994;344: 793-795.
- 176.** Staff AC, Dechend R, Redman CWG. Preeclampsia: acute atherosclerosis of the spiral arteries and future cardiovascular disease. Two new hypothesis. *Placenta.* 2013;27:S73-S78.
- 177.** Rashduni DL, Rifichi VA, Schneider SH, Khachadurian AK. Glycation of HDL does not increase its susceptibility to oxidation or diminish its cholesterol efflux capacity. *Metabolism.* 1999;48:139-143.

- 
- 178.** Girouard J, Giguère Y, Moutquin J, and Forest J. Previous hypertensive disease of pregnancy is associated with alterations of markers of insulin resistance. *Hypertension*. 2007;49(5):1056-1062.
- 179.** Boyd AC, Abdel-Wahab YH, McKillop AM, McNulty H, Barnett CR, O'Harte FP, et al. Impaired ability of glycosylated insulin to regulate plasma glucose and stimulate glucose transport and metabolism in mouse abdominal muscle. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1523:128–134.
- 180.** Hunter SJ, Boyd AC, O'Harte FP, McKillop AM, Wiggam MI, Mooney MH. Demonstration of glycosylated insulin in human diabetic plasma and decreased biological activity assessed by euglycemic-hyperinsulinemic clamp technique in humans. *Diabetes*. 2003;52:492-498.
- 181.** Kooptiwut S, Kebede M, Zraika S, Visinoni S, Aston-Mourney K, Favaloro J, et al. High glucose induced impairment in insulin secretion is associated with reduction in islet glucokinase in a mouse model of susceptibility to islet dysfunction. *J Mol Endocrinol*. 2005;35:39-48.
- 182.** Schalkwijk CG, Brouwers O, Stehouwer CDA. Modulation of insulin action by advanced glycation endproducts: a new player in the field. *Horm Metab Res*. 2008;40:614 -619.
- 183.** Fiory F, Lombardi A, Miele C, Giudicelli J, Beguinot F, Van Obberghen E. Methylglyoxal impairs insulin signaling and insulin action on glucose-induced secretion in the pancreatic beta cell line INS-1E. *Diabetologia*. 2011;54:2941-2952.
- 184.** Naitoh T, Kitahara M, Tsuruzoe N. Tumor necrosis factor alpha is induced through phorbol ester and glycosylated human albumin-dependent pathway in THP-1 cells. *Cell Signal*. 2001;13:331-334.
- 185.** Miele C, Riboulet-Chavey A, Maitan MA, Oriente F, Romano C, Formisano P. Human glycosylated albumin affects glucose metabolism in L6 skeletal muscle cells by impairing insulin-induced receptor substrate (IRS) signaling through a protein kinase C alpha-mediated mechanism. *J Biol Chem*. 2003;278:47376-47387.
- 186.** Gugliucci A. "Blinding" of AMP-dependent kinase by methylglyoxal: a mechanism that allows perpetuation of hepatic insulin resistance? *Medical Hypotheses*. 2009;72:921-924.
- 187.** Unoki-Kubota H, Yamagishi S, Takeuchi M, Bujo H, Saito Y. Pyridoxamine, an inhibitor of advanced glycation endproducts (AGE) formation ameliorates insulin resistance in obese type 2 diabetic mice. *Protein Pept Lett*. 2010;17:1177-1181.