



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

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

T E S I S

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

DIRECTOR DE TESIS:
DR. EULISES DÍAZ DÍAZ

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



MÉXICO, D.F. JUNIO 2014



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES "ZARAGOZA"

DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN
ESCOLAR
PRESENTE.

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

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

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

Opción de titulación: **Tesis Experimental.**

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

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ
DIRECCIÓN

RECIBÍ:

OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES
Y DE GRADO

Vº Bº.

DRA. MARTHA A. SÁNCHEZ RODRÍGUEZ
JEFA DE LA CARRERA DE Q.F.B.

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Hormonas Proteicas del Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, bajo la dirección del Dr. Eulises Díaz Díaz y la asesoría de la Q.F.B. Georgina Ernestina Ríos Olivera. El trabajo fue financiado a través del Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social SSA/IMSS/ISSSTE-CONACYT mediante el proyecto SALUD-2011-01-161976 que lleva por título “Desarrollo y validación de un inmunoensayo para la cuantificación de productos finales de glicosilación avanzada: evaluación de su valor diagnóstico para predecir las complicaciones crónicas de la Diabetes Mellitus”.

DEDICATORIA

— *Existen tres tipos de alquimistas — Dijo mi Maestro*

*Aquellos que son imprecisos porque no saben de lo que están hablando;
aquellos que lo son porque saben de lo que están hablando, pero también
saben que el lenguaje de la Alquimia es un lenguaje dirigido al corazón y
no a la razón.*

— *¿Y cuál es el tercer tipo? — Pregunté*

*Aquellos que jamás oyeron hablar de alquimia pero que consiguieron, a
través de sus vidas, descubrir la Piedra Filosofal.*

Paulo Coelho, El alquimista

*“Con cariño y amor para todas aquellas personas que siempre han
estado presentes en mi incansable búsqueda de la piedra filosofal, a ustedes
por siempre mi corazón y mi agradecimiento”*

- ∞ A mis Padres, que me dieron la vida.*
- ∞ A mis Amigos, con quienes siempre puedo contar.*
- ∞ A mis Maestros, que siempre me guían.*

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** que a través de la **Facultad de Estudios Superiores Zaragoza** me brindó la oportunidad de pertenecer a ella; por adquirir en sus aulas y a través de sus maestros conocimientos y habilidades; por haber conocido en ella a excepcionales profesionales, pero sobre todo, excelentes compañeros y amigos. Orgullosamente puedo decir que soy UNAM.

Al **Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”** por permitirme realizar en sus instalaciones el presente trabajo experimental; al **CONACYT** y a la **Comisión Coordinadora de Institutos Nacionales de Salud y Hospitales de Alta Especialidad** por haberme otorgado el apoyo económico que me ayudó enormemente para que pudiera culminar este proyecto.

Agradezco de manera especial al **Dr. Eulises Díaz Díaz**, persona con una gran calidad humana, por dirigirme en el transcurso de este pequeño sueño que ahora se ha convertido en una realidad; por compartir conmigo un poco del gran conocimiento que posee, pero sobre todo, por ser un ejemplo de superación que me inspiro a salir siempre adelante y a nunca rendirme ante los pequeños tropiezos que la vida nos puede presentar.

Le doy gracias a la **Q.F.B. Georgina Ríos Olivera**, profesional digna de toda mi admiración, por confiar en mis capacidades e inspirarme a ser competitivo y a siempre buscar la excelencia.

Agradezco a los miembros del jurado por el tiempo dedicado a la lectura y revisión del presente trabajo.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1 Diabetes Mellitus	3
2.2 Productos finales de glicación avanzada.....	5
2.2.1 Antecedentes sobre la glicación.....	5
2.2.2 Formación y estructura de AGEs.....	6
2.2.3 Mecanismos de daño inducido por AGEs.....	9
2.2.3.1 Modificación de proteínas funcionales extracelulares y estructurales	10
2.2.3.2 Efectos mediados por receptores	11
2.2.3.3 Modificación de proteínas intracelulares.....	11
2.2.4 Degradación y eliminación de AGEs	12
2.3 Inmunoensayos.....	13
2.3.1 Radioinmunoanálisis, RIA	13
2.3.1.1 Componentes del RIA.....	13
2.3.1.2 Procesos básicos del RIA.....	14
2.3.2 Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzima, ELISA	19
2.3.2.1 Clasificación y Diseño de los ELISAs	19
2.3.2.2 Componentes del ELISA	21
2.3.2.3 Etapas del ELISA	22
2.4 Validación de métodos analíticos.....	26
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	30
4. OBJETIVO	32
5. HIPÓTESIS	32
6. MATERIAL Y MÉTODO	33
6.1 Preparación del antígeno AGE-BSA.....	33
6.1.1 Síntesis del AGE-BSA	34
6.1.2 Purificación del AGE-BSA por Affi-Gel Blue	34
6.1.3 Evaluación del proceso de síntesis y purificación del AGE-BSA mediante la medición de la Actividad Específica.....	36
6.1.4 Determinación de la concentración y de la actividad específica final del AGE-BSA preparado.....	36
6.2 Producción del suero hiperinmune anti AGE-BSA	37
6.2.1 Esquema de inmunización	37
6.2.2 Seguimiento de la respuesta inmune de los animales de experimentación por radioinmunoanálisis.....	38
6.3 Purificación de los anticuerpos policlonales anti-AGEs por cromatografía de inmunoafinidad	39
6.3.1 Síntesis de la matriz cromatográfica de Affi-Gel 102-AGE-BSA.....	39

6.3.2 Eliminación de los anticuerpos generados contra la matriz proteica de BSA	40
6.3.3 Purificación de los anticuerpos policlonales anti-AGEs mediante la matriz de Affi-Gel 102-AGE- BSA.....	40
6.4 Síntesis del conjugado Anticuerpos anti-AGEs – HRP.....	41
6.5 Normalización del Ensayo	42
6.5.1 Titulación de los inmunoreactantes	43
6.5.2 Recubrimiento y bloqueo de las placas de ELISA	43
6.5.3 Desarrollo del ensayo.....	43
6.6 Validación del Ensayo.....	45
6.6.1 Estudio de linealidad de la curva estándar	45
6.6.2 Límite de detección	45
6.6.3 Determinación de la precisión	46
6.6.4 Evaluación de la exactitud.....	46
6.7 Evaluación del desempeño del método.....	47
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	48
8. CONCLUSIÓN	63
9. ANEXOS	64
I. Radioinmunoanálisis para la cuantificación de AGEs	64
10. REFERENCIAS.....	68

1. INTRODUCCIÓN

Los productos finales de glicación avanzada (AGEs por sus siglas en inglés: Advanced Glycation End Products) son un grupo heterogéneo de compuestos que se forman por reacciones no enzimáticas entre la glucosa u otros azúcares reductores, con proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Estos compuestos se forman en varias etapas: las iniciales son reversibles y se llevan a cabo en tiempos relativamente cortos, mientras que las posteriores transcurren más lentamente y son irreversibles. Los AGEs se generan de manera normal durante el proceso de envejecimiento humano, pero se acelera su formación y acumulación en la diabetes mellitus, como consecuencia del estado de hiperglucemia sostenida durante largos períodos de tiempo.

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

Diversos estudios han tratado de correlacionar las concentraciones circulantes de AGEs, con el nivel de gravedad de las complicaciones asociadas a la diabetes mellitus, lo que constituiría una herramienta de gran utilidad para el control de la enfermedad y la prevención de las complicaciones crónicas en los pacientes diabéticos. A pesar de ello, esto se ha visto limitado debido a la falta de ensayos comerciales para medir de forma confiable las concentraciones de estos compuestos. Los métodos existentes, como HPLC, espectrometría de masas y cromatografía de gases, tienen la gran desventaja de no poder implementarse en laboratorios clínicos de rutina, debido a la utilización de equipo muy sofisticado para su realización, así como su baja capacidad de procesamiento simultáneo de muestras. Por lo cual, algunos laboratorios han comenzado a desarrollar métodos para cuantificar estos compuestos mediante inmunoensayos, utilizando procedimientos propios para la generación de los anticuerpos anti-AGEs.

El Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, ha diseñado en los últimos años métodos efectivos para producir anticuerpos específicos contra AGEs. El propósito del presente trabajo de investigación fue emplear estos métodos de obtención de anticuerpos, para desarrollar y validar un ensayo inmunoenzimático de competición, tipo ELISA, para la cuantificación de AGEs circulantes. Este ensayo será utilizado en estudios posteriores para evaluar la relación entre las concentraciones circulantes de los AGEs y el grado de complicación de los pacientes diabéticos; con el objetivo de establecer valores de corte a los que se asocien las complicaciones crónicas de la enfermedad tales como la retinopatía, la nefropatía, la angiopatía, etc. Todo ello con el fin de brindar un mejor diagnóstico y seguimiento del paciente diabético, lo que permitirá un mejor manejo clínico y por tanto se podrá evitar el desarrollo de complicaciones crónicas.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Diabetes Mellitus

La Diabetes Mellitus (DM) es una enfermedad metabólica crónico-degenerativa, caracterizada por hiperglucemia crónica debido a la deficiencia en la producción o acción de la insulina, lo que afecta el metabolismo intermediario de los carbohidratos, proteínas y grasas.¹

La fuente de energía celular más importante para el organismo es la glucosa, ésta se cataboliza por medio de la glucólisis para producir ATP, que es la fuente directa de energía metabólicamente utilizable por todas las células del organismo. La glucosa se obtiene principalmente de la dieta, se almacena como glucógeno en el hígado y los músculos, mediante un proceso denominado glucogénesis. Cuando la glucosa es requerida durante los períodos de ayuno prolongado, el glucógeno se hidroliza en glucosa a través del proceso de glucogenólisis.²

Los niveles sanguíneos de glucosa están controlados por seis hormonas, de las cuales cinco (glucagón, hormona del crecimiento, adrenalina, glucocorticoides y tiroxina) son agentes hiperglucemiantes y solamente una, la insulina, es hipoglucemiante. La insulina es producida y secretada por las células beta de los islotes de Langerhans en el páncreas endócrino, en respuesta a los niveles altos de glucosa en la sangre. La insulina favorece la incorporación de glucosa hacia el interior de las células dependientes de insulina (células musculares, adiposas y hepáticas) para que estas la utilicen como combustible, manteniendo a la vez la concentración de glucosa en la circulación dentro de un parámetro normal.^{2,3} Se toma como valores de referencia una concentración de glucosa sanguínea menor a 100 mg/dL (< 5.6 mmol/L) en ayunas y menor a 140 mg/dL (< 7.8 mmol/L) a las dos horas después de una carga oral de 75 g de glucosa.^{1,4}

La diabetes mellitus es clasificada con base a la etiología y la presentación clínica del desorden en 4 tipos: Diabetes mellitus tipo 1, tipo 2, gestacional y otros tipos. Los pacientes diabéticos padecen más frecuentemente la diabetes del tipo 1 y 2.^{1,4} En la DM tipo 1, el páncreas no produce o produce muy poca insulina, en la diabetes tipo 2, las células de los tejidos dependientes de insulina no responden normalmente a su efecto, condición conocida como resistencia a la insulina. En ambos casos se imposibilita o dificulta la entrada de glucosa en las células musculares y adipocíticas, que normalmente son las principales consumidoras de glucosa, aumentando sus niveles en sangre (condición conocida como hiperglucemia). Por el contrario en el resto de las células, que no requieren de insulina para el ingreso de la glucosa, se produce

un incremento en la concentración de la glucosa intracelular (hiperglucemia intracelular).^{2,3,4}

Es bien conocido que las manifestaciones clínicas de la diabetes se deben a la no producción endógena o a la falta de acción de la insulina, que independientemente de la etiología, dará lugar a una hiperglucemia crónica, la cual es responsable de la triada clásica de poliuria, polidipsia y polifagia, así como la presencia de otras manifestaciones tales como debilidad, pérdida de peso y glucosuria.^{5,6} Las complicaciones agudas que se presentan en la diabetes no controlada, como la cetoacidosis o el síndrome hiperosmolar no acetoacidótico, también pueden ser entendidas a través de falta de actividad de la insulina, la activación de las hormonas contrarreguladoras y de los altos niveles de glucosa sanguínea.⁶

La DM sin tratamiento o con un tratamiento ineficiente, conduce al deterioro progresivo del estado de salud del paciente. Para la diabetes existe el control pero no la cura, y dependiendo del grado de control que se consiga de la glucemia, así como de la coexistencia de otros factores, como pueden ser la hipertensión arterial o la dislipidemia, se acelerará el deterioro del diabético, agravándose su situación y dando lugar a las complicaciones crónicas.⁷ Las complicaciones crónicas en la diabetes se pueden dividir en vasculares y no vasculares; dentro de las vasculares encontramos las complicaciones microangiopáticas, tales como la retinopatía, nefropatía y neuropatía diabética y las complicaciones macroangiopáticas, tales como la cardiopatía isquémica, la enfermedad cerebro vascular y la enfermedad arterial periférica. Dentro de las complicaciones no vasculares encontramos la gastroparesia diabética, la disfunción sexual y las afecciones de la piel.⁶

Los mecanismos celulares y bioquímicos que conllevan a las complicaciones a largo plazo de la diabetes no han sido completamente entendidos; sin embargo, diversos estudios clínicos morfológicos y bioquímicos han proporcionado suficientes evidencias para considerar que la hiperglucemia, que resulta de la deficiencia absoluta o relativa de insulina y/o de su acción, es el factor que determina el desarrollo de las complicaciones crónicas de la diabetes mellitus.⁸ Se han propuestos varios mecanismos como responsables para explicar la relación entre la hiperglucemia crónica y el desarrollo de las complicaciones crónicas de la diabetes, entre los que se encuentran los siguientes: vía de los polioles o del sorbitol, modificación de la actividad de la proteína cinasa C, activación de la vía de las hexosaminas y los procesos de glicación de biomoléculas.^{9,10} En los últimos años la investigación biomédica se ha enfocado en el estudio del mecanismo de glicación como elemento clave en el desarrollo de las complicaciones crónicas de la diabetes.

2.2 Productos finales de glicación avanzada

2.2.1 Antecedentes sobre la glicación

Las primeras observaciones sobre las reacciones entre carbohidratos y aminoácidos fueron realizadas por el químico francés Louis Camille Maillard en 1912 al realizar estudios sobre la conservación de alimentos; él describió la formación de productos café-oscuros o amarillo marrón, que se originaban durante el calentamiento de mezclas de aminoácidos y carbohidratos.^{8, 11,12}

En las ciencias biomédicas la reacción de Maillard, también llamada glicosilación no enzimática y recientemente denominada glicación (este último término aceptado preferentemente) se refiere a un amplio conjunto de reacciones no enzimáticas ocurridas entre azúcares reductores y grupos amino libres de proteínas, pero también, en menor grado con lípidos y ácidos nucleicos, que se desarrollan en varias etapas: las iniciales son reversibles y se llevan a cabo en tiempos relativamente cortos, mientras que las posteriores transcurren más lentamente y son irreversibles, originando una serie de compuestos denominados genéricamente como productos finales de glicación avanzada (AGEs por Advanced Glycation End Products).^{8,12} La velocidad con la que se forman los AGEs depende directamente de la concentración y del tipo de azúcares que estén reaccionando; la glucosa reacciona lentamente, mientras que azúcares intracelulares como la glucosa-6-fosfato o la fructuosa forman AGEs más rápidamente.¹³

Debido a los trabajos sobre la hemoglobina glucosilada en los años 70, se retomó la atención sobre la reacción de Maillard y se le dio la debida importancia, como la vía a través de la cual la estructura y función de proteínas son modificadas "*in vivo*". Se descubrió una variante de hemoglobina denominada hemoglobina A_{1c} (HbA_{1c}), en la que se comprobó que un producto de Amadori, derivado de la glucosa, se hallaba unido al residuo de valina N-terminal, por lo que se dedujo que la HbA_{1c} se forma como resultado de una modificación postraducciona de la hemoglobina por la glucosa. Se comprobó que la HbA_{1c} aumentaba en función de la glucemia en los pacientes diabéticos y empezó a medirse por los laboratorios clínicos para el seguimiento del control glucémico de estos pacientes.^{2,11}

2.2.2 Formación y estructura de AGEs

En la primera etapa de la reacción de Maillard el grupo carbonilo de los azúcares reductores como la glucosa y fructuosa, reacciona con los grupos amino libres de las proteínas; principalmente con el amino terminal y con los de lisina, arginina e histidina, sin la participación de enzimas. Originándose así una aldimina reversible denominada base de Schiff, la cual se forma en horas (Figura 1).^{8,12}

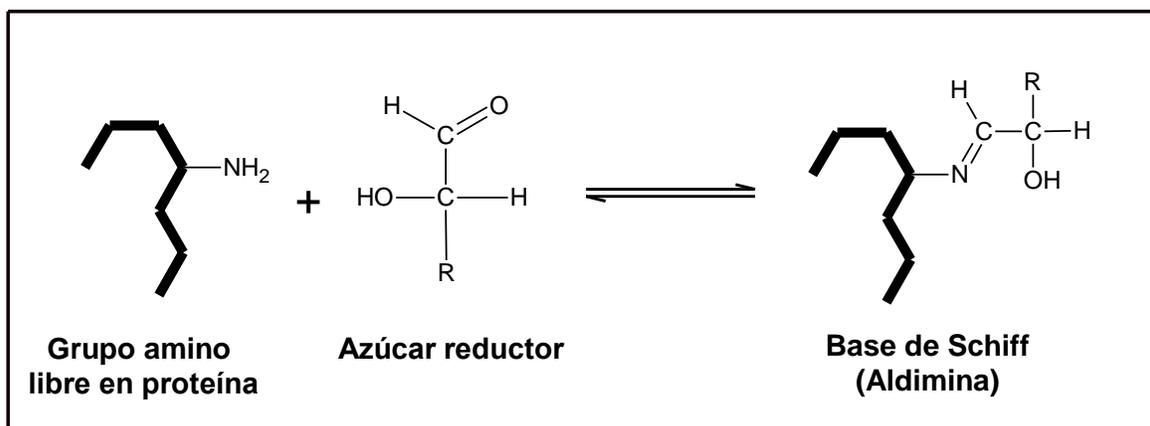


Figura 1. Formación de la base de Schiff. Los azúcares reductores reaccionan con los grupos amino libres de las proteínas, sin la participación de enzimas, para formar una aldimina reversible.

A continuación este producto intermedio sufre un reacomodo interno del doble enlace para formar una cetoamina reversible llamada producto de Amadori o fructosamina (1-amino-1-desoxifruktuosa, si el azúcar es la glucosa), esta transformación ocurre en días (Figura 2).^{8,12}

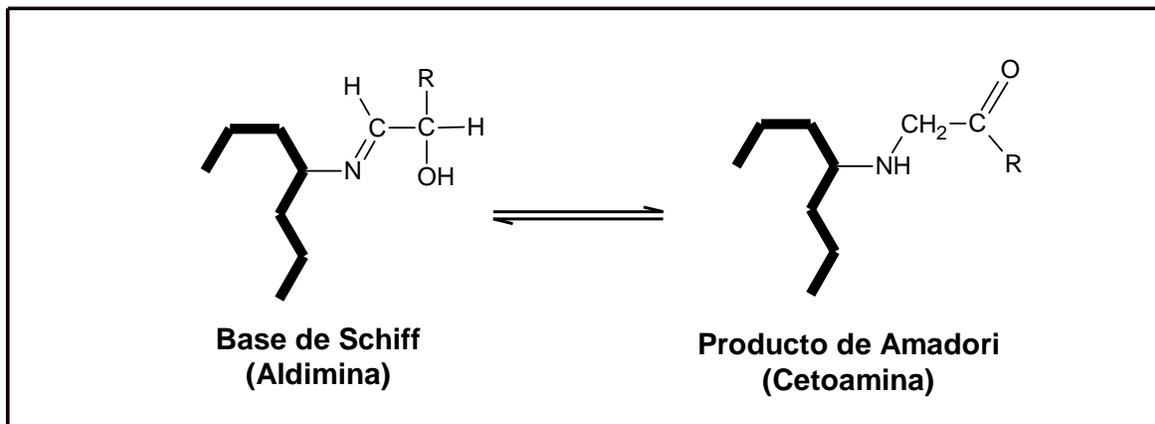


Figura 2. Formación del producto de Amadori. Por reacomodo interno del doble enlace, la base de Schiff forma una cetoamina reversible.

Hasta este punto las reacciones son completamente reversibles y los productos no se acumulan indefinidamente sino que alcanzan su concentración de equilibrio y su nivel “*in vivo*” dependerá fundamentalmente de la concentración de glucosa presente.¹¹ Como ejemplos de productos de Amadori tenemos a la hemoglobina y proteínas séricas glucosiladas que se determinan en el laboratorio clínico bajo el nombre de prueba de hemoglobina A_{1c} (HbA_{1c}) y prueba de fructosamina, respectivamente, para monitorear el control de glucemia en pacientes diabéticos durante periodos cortos de tiempo de hasta 3 meses.^{2,10,13}

Si el estado de hiperglucemia se mantiene prolongadamente, los productos de Amadori sufren una serie de reacciones de deshidratación, condensación, oxidación y ciclización, generándose un grupo heterogéneo de estructuras unidas a las proteínas llamados productos finales de glicación avanzada (AGEs). Este último proceso es irreversible y toma semanas o meses, por lo que ocurre principalmente sobre proteínas de vida media larga, como las que forman parte de la matriz extracelular (colágeno, elastina, mioglobina, mielina y cristalina) y sobre proteínas plasmáticas tales como las inmunoglobinas, albúmina y lipoproteínas de baja densidad.^{8, 12,13}

Los AGEs pueden formarse por medio de reacciones oxidativas y no oxidativas. Cuando las reacciones que les dan origen son oxidativas, el proceso en conjunto se conoce como glicoxidación y mediante este, se forman AGEs tales como la carboximetil lisina (CML) y pentosidina; mientras que por procesos no oxidativos se forman AGEs como pirralina, entre otros muchos.^{12,13} De gran importancia durante la reacción de Maillard es la formación de productos intermediarios reactivos. Estos productos son conocidos como oxoaldehídos e incluyen compuestos como glioxal, metilglioxal (MGO) y 3-desoxiglucosona (3-DG), sin embargo, estos compuestos también pueden generarse a partir de otras rutas metabólicas como la de los polioles o a través del catabolismo de los cuerpos cetónicos.¹³ Los oxoaldehídos pueden dar lugar a AGEs como carboximetil lisina (CML), carboxietil lisina (CEL) y pirralina, y también a los productos de entrecruzamiento o dímeros de lisina: dímero de lisina y glioxal (GOLD), dímero de lisina y metilglioxal (MOLD) y dímero de lisina y desoxiglucosona (DOLD) (**Figura 3**).^{12,13}

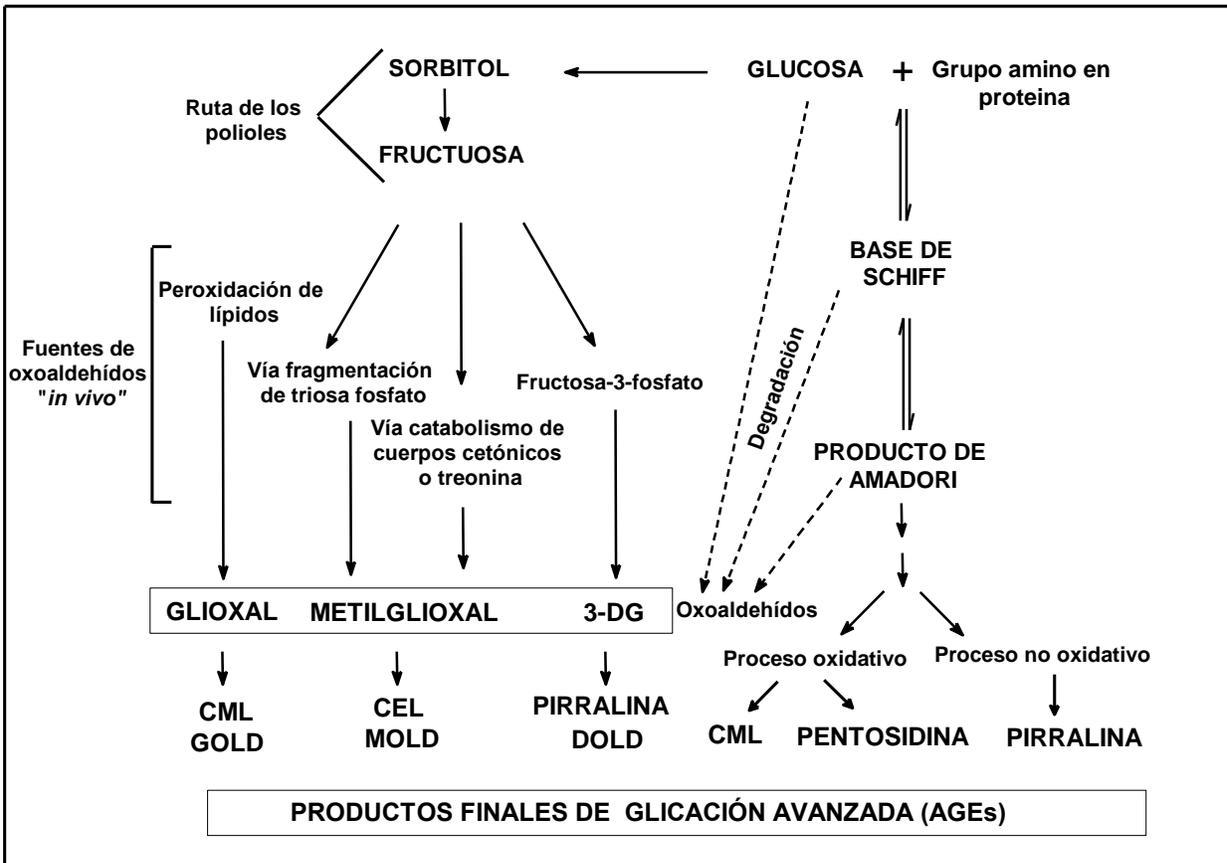


Figura 3. Formación de AGEs. Proceso de generación de AGEs en el cual se incorpora la ruta de los polioles y la formación de oxoaldehídos. 3-DG (3-desoxiglucosona), CML (carboximetil lisina), CEL (carboxietil lisina), GOLD (dímero de lisina y glioxal), MOLD (dímero de lisina y metilglioxal), DOLD (dímero de lisina y desoxiglucosona).

Los AGEs son compuestos estructuralmente heterogéneos y de vida media larga. Muchos de estos productos son fuertemente pigmentados y algunos de ellos fluorescentes, asimismo, algunos tienen la propiedad de formar entrecruzamiento AGE-AGE (**Figura 4**). Entre los diferentes tipos de AGEs, la CML y la pentosidina son los que más comúnmente se forman tanto "in vivo" como "in vitro". Los estudios realizados a la fecha, sugieren que los AGEs conocidos constituyen sólo una pequeña fracción de aquellos que se producen "in vivo". A pesar de los avances, se desconocen en gran medida, tanto los procesos que llevan a la formación de AGEs "in vivo", como la estructura de los mismos; sin embargo, se considera que los AGEs obtenidos "in vitro" bajo condiciones similares a las patológicas que caracterizan a la diabetes mellitus (hiperglucemia), comparten epítopes y dominios comunes con las proteínas modificadas por AGEs "in vivo".¹²

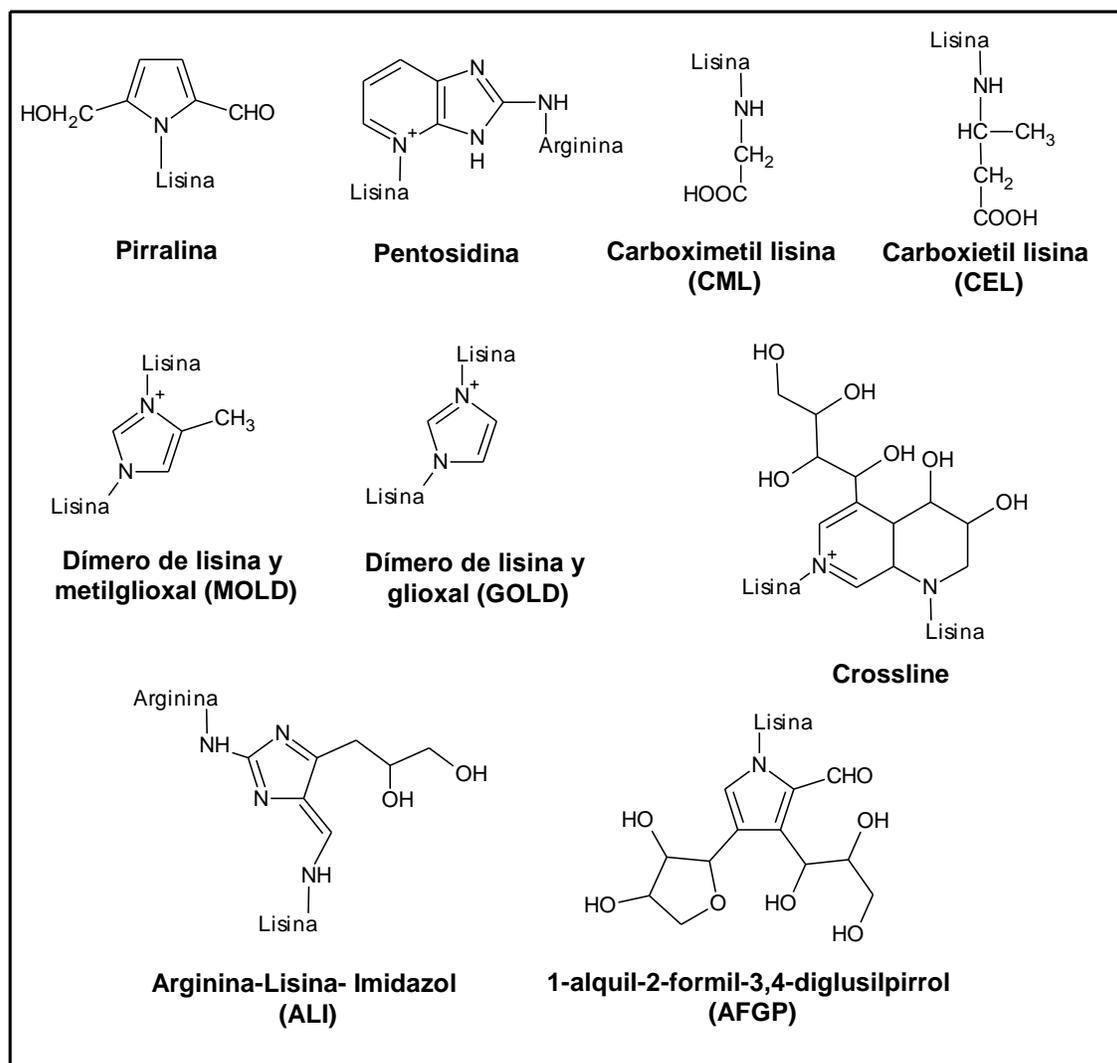


Figura 4. Estructura química de varios AGEs y sus nombres triviales.

2.2.3 Mecanismos de daño inducido por AGEs

Entre los mecanismos a través de los cuales los AGEs producen daño a tejidos y órganos, se encuentran los siguientes: modificación de proteínas funcionales extracelulares y de proteínas estructurales, generación de procesos de señalización intracelulares a través de uniones a receptores de membrana, y modificación de proteínas intracelulares.^{12,14}

2.2.3.1 Modificación de proteínas funcionales extracelulares y estructurales

Entre las diferentes proteínas funcionales extracelulares, las lipoproteínas de baja densidad (LDL) han sido de las más estudiadas en relación de como son afectadas por la glicación, debido a que tienen una participación clave en el proceso aterogénico y por tanto en el desarrollo de las complicaciones micro y macroangiopáticas de la diabetes. Las LDL transportan la mayor parte del colesterol plasmático y lo distribuyen a las células que lo requieren. Las células captan estas lipoproteínas (LP) por fijación a receptores de membrana, a través de la fracción apoB, para que posteriormente puedan catabolizarlas. En los pacientes diabéticos, si bien la concentración de LDL se mantiene muchas veces dentro del rango normal, se producen alteraciones en las fracciones componentes, en el diámetro, en la densidad y en la composición lipídica, que las hacen más aterogénicas.¹⁵ También en los diabéticos, una gran porción de LDL se encuentra glicada y oxidada, lo que interfiere en el reconocimiento de la LDL por sus receptores específicos de membrana en las células, disminuyendo su fijación y degradación, y favoreciendo el aumento del nivel plasmático de LDL. Asimismo, la LDL modificada es captada por los macrófagos, a través de los receptores de AGEs o de los receptores para LP, transformándose en células espumosas en la íntima de las arterias, con la consiguiente formación de ateromas.¹³

La formación de AGEs modifica las propiedades funcionales de las moléculas de la matriz extracelular. La glicación del colágeno o cualquier otra proteína de la matriz, favorece la formación de entrecruzamientos AGE-AGE entre diferentes zonas de la misma proteína, entre diferentes proteínas, así como también, con proteínas del plasma sanguíneo (como albumina, inmunoglobulinas y lipoproteínas de baja densidad). Estos productos de entrecruzamiento forman aglomerados insolubles y resistentes a proteasas, produciendo engrosamiento de la membrana basal e hipertrofia de la matriz extracelular. En los capilares sanguíneos esto trae como consecuencia aumento de la permeabilidad, reducción de la luz, pérdida de la flexibilidad vascular, estado protrombótico y disminución del flujo sanguíneo; lo cual conlleva a la aparición de alteraciones microvasculares en la retina y el glomérulo, entre otros.^{10,12,14}

Estudios “*in vitro*” e “*in vivo*” han mostrado que en el caso de la nefropatía diabética, la formación de AGEs en la colágena tipo IV, laminina, fibronectina y proteoglicanos heparán sulfato, proteínas que forman parte de la membrana basal glomerular, altera la estructura de ésta. Dichas moléculas, a su vez, son las que aportan la carga negativa a la membrana basal que evita el paso de proteínas. Estos cambios traen como consecuencia la pérdida de las propiedades de filtración selectiva de la membrana

basal glomerular y, por lo tanto, la incapacidad del glomérulo para retener proteínas, lo cual resulta en proteinuria.^{10,12}

Se considera que el riñón normal elimina eficientemente los AGEs circulantes, pero que en la disfunción renal, y particularmente en asociación con la diabetes, estos productos se acumulan en el suero. Por lo tanto, en la nefropatía diabética ocurre una alta tasa de producción de AGEs y éstos a su vez, no son eliminados adecuadamente por el riñón, lo cual favorece el incremento de su vida media en el torrente sanguíneo, así como su acumulación, favoreciendo sus efectos nocivos sobre tejidos y órganos.^{10,12}

2.2.3.2 Efectos mediados por receptores

Se considera que muchos de los efectos patológicos de los AGEs se generan a través de su unión a los receptores específicos (RAGE por sus siglas en inglés: Receptor of AGEs). En células endoteliales, la interacción de AGE con RAGE activa vías de señalización intracelular, que incluyen la proteína cinasa C y las MAP cinasas, entre otras. Éstas inducen la generación de especies reactivas de oxígeno, vía activación de la NADPH oxidasa, disfunción de la cadena de transporte de electrones mitocondrial y depleción de glutatión reducido (GSH) y vitamina C. Por otro lado, la unión de AGE con RAGE disminuye la producción de óxido nítrico (NO), al reducir la actividad de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), disminuyendo la capacidad de relajación del tono vascular. El incremento del estrés oxidativo, a través de estos procesos, favorece la ocurrencia de cambios potencialmente dañinos en la expresión génica, misma que modifica la función celular por la inducción de respuestas inflamatorias, vasoconstricción y expresión de genes protrombóticos, eventos relacionados con disfunción endotelial y aterosclerosis.^{10,12,13,14}

2.2.3.3 Modificación de proteínas intracelulares

Los AGEs también se pueden formar dentro de las células, como consecuencia de la hiperglucemia intracelular. El proceso de glicación intracelular se lleva a cabo con la participación de azúcares como glucosa-6-fosfato, gliceraldehído-3-fosfato y fructosa, esta última derivada de la vía de los polioles. El factor básico de crecimiento de fibroblastos en células endoteliales, además de las proteínas histonas de hepatocitos y en células beta de islotes de Langerhans, son ejemplos de proteínas intracelulares modificadas por AGEs. También, se ha detectado insulina glicada dentro de células beta pancreáticas y en plasma, con niveles elevados, en ratones y sujetos diabéticos. La glicación afecta la actividad biológica de estas proteínas y podría contribuir a la resistencia a la insulina, en la DM tipo 2.^{10,12}

2.2.4 Degradación y eliminación de AGEs

Bajo condiciones fisiológicas, la generación de AGEs ocurre de manera constante y baja, y es controlada por mecanismos de degradación y eliminación de los mismos. Se ha propuesto que el principal mecanismo de degradación de AGEs ocurre a través de endocitosis, mediada por receptores en los macrófagos.¹²

La proteólisis de AGEs produce péptidos-AGE y aductos-AGE libres (AGE unidos a uno o dos aminoácidos), los cuales son liberados a la circulación. Los aductos-AGE son eliminados directamente por vía renal, mientras que los péptidos-AGE son retomados por endocitosis en el túbulo contorneado proximal del riñón y degradados en aductos-AGE, aunque algunos péptidos-AGE regresan íntegramente a la circulación. Estos péptidos-AGE se pueden unir covalentemente a otras proteínas como colágena, LDL y fosfolípidos, originando una segunda generación de AGEs más reactivos y agresivos que los AGEs de los cuales derivan. Estos AGEs más reactivos, se incrementan en situaciones de daño renal, más aún asociado a diabetes mellitus, por lo que probablemente contribuyen a acelerar el daño vascular extrarrenal en estos pacientes.^{10,12,13}

2.3 Inmunoensayos

Los análisis por enlace son aquellos en los que se requiere de la participación de dos sustancias, una que funcione como ligador y la otra como ligando o sustancia a ser unida, la cual también es identificada como analito. En estos procedimientos, la medición del analito se basa en su capacidad de saturar a su ligador específico, y la determinación subsecuente de las fracciones libre y unida del ligando. Este principio general puede incluir diferentes ligadores y diferentes métodos para determinar la distribución entre las fracciones libre y unida. Los inmunoensayos son los análisis por enlace en los que el ligador es un anticuerpo.^{16,17}

La forma de conocer la proporción de las fracciones libre y unida resultantes, es empleando una marca ya sea en el ligador o en el ligando, lo cual permite la cuantificación después de lograr la separación de las fracciones. Se entiende por marca la incorporación de un elemento, molécula o partícula que pueda ser cuantificada por un método analítico sensible; tales como isótopos radioactivos (Radioinmunoanálisis, RIA), compuestos fluorescentes (Fluoroinmunoanálisis, FIA), enzimas (Enzimoinmunoanálisis, EIA), átomos metálicos y radicales libres.^{16,17}

2.3.1 Radioinmunoanálisis, RIA

El RIA es una técnica en la cual se utiliza una reacción en donde el analito en cantidades variables, compete con una cantidad constante y conocida del trazador (marca radiactiva del ligando) para ocupar los sitios de unión de un anticuerpo específico. El radioinmunoanálisis requiere de cuatro componentes fundamentales y de cinco procesos básicos.¹⁸

2.3.1.1 Componentes del RIA

- 1. Ligando marcado radiactivamente o trazador.** El ligando debe ser marcado radiactivamente de manera que no pierda su inmunoreactividad y debe poseer alta pureza. El isótopo radiactivo más frecuentemente utilizado como marca es el yodo-125 debido a su vida media de 60 días.^{16,18} En el RIA, el trazador se encuentra en una cantidad constante.
- 2. Anticuerpo específico o ligador.** Es un anticuerpo obtenido tradicionalmente por la inmunización de animales (anticuerpos policlonales); recientemente gracias a la introducción de las técnicas de hibridomas, son utilizados también anticuerpo monoclonales. Lo más importante de un anticuerpo es que sea específico para

interaccionar con el antígeno. El anticuerpo en un RIA se encuentra en una cantidad constante y limitante. Por regla general, la concentración o dilución de anticuerpo seleccionada para utilizarse en una curva estándar debe de ser aquella que permita la unión de entre 30 y 50 % del trazador.^{16,18}

- 3. Estándares.** Son cantidades conocidas del ligando o analito que se desea medir. Para evitar alteraciones en los resultados se requiere que el estándar sea de la misma especie de las muestras a evaluar, que este en su forma biológica activa, y que se encuentre en una formulación que le brinde la máxima estabilidad.^{16,18}
- 4. Muestra.** La cual contendrá el analito no marcado que será medido y es análogo o idéntico al ligando empleado como estándar.^{16,18}

El RIA es un tipo de análisis por saturación, es decir es un análisis donde se emplea una cantidad limitada del ligador en presencia del ligando específico en exceso (sin marca en concentraciones variables y marcado en una concentración constante), por lo tanto, si el anticuerpo específico está en tal cantidad que es saturado, la distribución de la fracción unida y lo que se queda libre del ligando marcado, depende de la relación de concentración inicial de los ligandos marcados y no marcados.¹⁷

Para estimar la concentración del analito, los inmunoensayos requieren de la comparación de los resultados obtenidos de las muestras, con los obtenidos de una serie de estándares de concentraciones conocidas.^{16,17,18}

2.3.1.2 Procesos básicos del RIA

1. La reacción del RIA

El ligando marcado (trazador) y el no marcado compiten entre sí para unirse al anticuerpo hasta alcanzar el equilibrio de reacción, con la formación de los correspondientes complejos antígenos-anticuerpo. A partir de esta reacción puede determinarse la radioactividad presente en los complejos inmunes, y asociarlos con las concentraciones de los estándares empleados, lo que permite establecer una relación dosis respuesta. Pudiéndose estimar la dosis o concentración del analito presente en la muestra a evaluar, por comparación con el comportamiento obtenido por los estándares de concentración conocida (**Figura 5**).^{17,18}

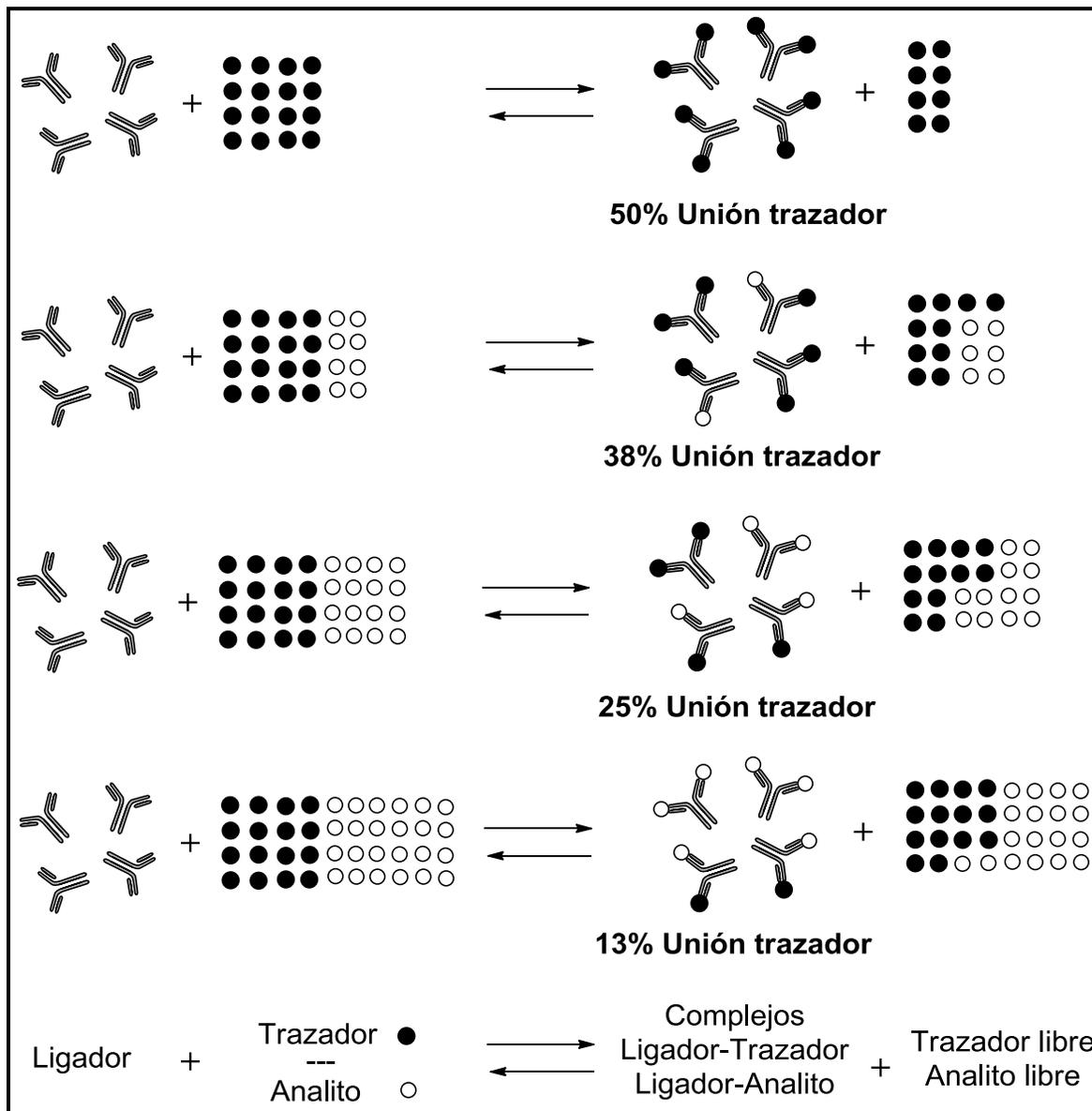


Figura 5. Análisis por enlace en el RIA. En el RIA la cantidad de radiactividad presente en la fracción unida es inversamente proporcional a la cantidad de antígeno no marcado, por lo que esta va disminuyendo desde 50% que es la unión máxima, en donde no está presente el antígeno no marcado, hasta un 13% cuando existe mayor cantidad de antígeno no marcado que de trazador, en esta figura. Nótese que las cantidades de anticuerpo y trazador son limitadas y constantes, no así la del antígeno sin marcar, estas van aumentando, por lo que la unión ligador-trazador disminuye.

2. El proceso de incubación

Tiene una duración que va desde 2 hasta 24 horas, con una temperatura que varía entre 4 °C a 37 °C, dependiendo del anticuerpo utilizado y el método empleado. Tiene como finalidad que se establezca un estado de equilibrio entre el trazador y el ligando no marcado en su unión con el anticuerpo (**Figura 6**).^{17,18}

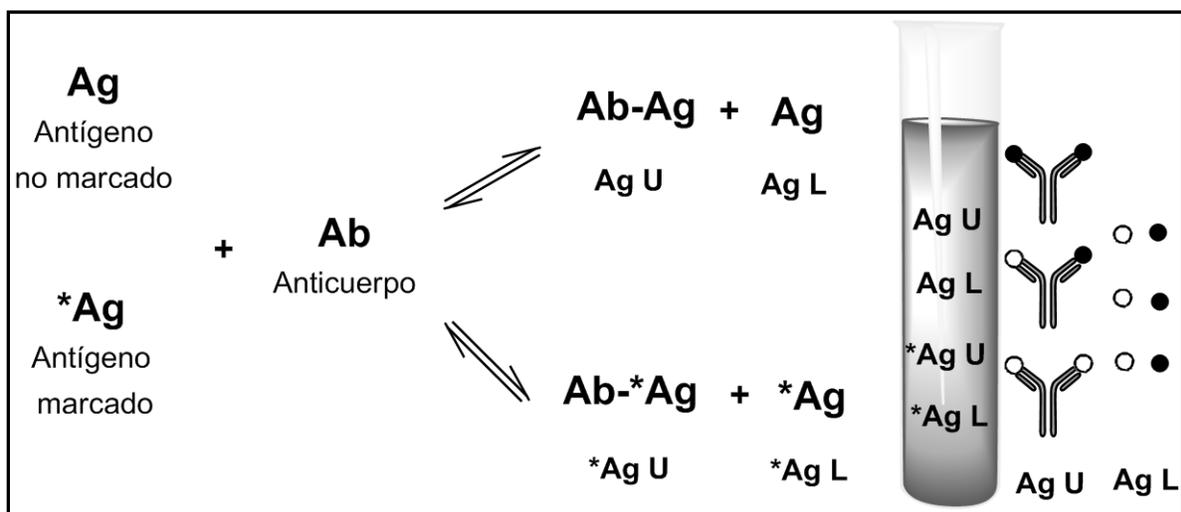


Figura 6. Reacción de equilibrio en el RIA. Mediante este esquema se demuestra la relación de las fracciones unidas al anticuerpo y libres de los antígenos marcados y no marcados. Su distribución en los complejos inmunes, está en función de la relación de concentraciones del antígeno marcado y el no marcado.

3. Separación de las fracciones libre y unida

Existen muchos métodos para separar el ligando libre del unido al anticuerpo, entre los que se encuentran la migración diferencial, la precipitación de los inmunocomplejos formados mediante la utilización de un segundo anticuerpo o por absorción del ligando libre utilizando carbón activado o resinas, seguidos de un proceso de centrifugación. Otros métodos emplean fases sólidas donde la formación de inmunocomplejos ocurre unida a tubos o placas de polipropileno y la fracción libre solo se decanta.^{17,18}

4. Medición de la radioactividad

La radioactividad del trazador libre o del unido al anticuerpo, es medida en contadores gamma si se trata de sustancias que emiten rayos gamma como el yodo-125. Los contadores de centelleo líquido se utilizan cuando la sustancia emite partículas beta como el tritio o el carbono-14.¹⁸

El conteo de las radiaciones de los tubos procesados se expresa en cuentas por minutos (cpm). Una vez que se les restan los cpm obtenidos de la unión no específica (UNE), se convierte a porcentaje de la radiactividad unida al anticuerpo (% de Unión Específica) por medio de la fórmula:

$$\frac{\text{cpm de la muestra} - \text{cpm de la UNE}}{\text{cpm totales}} \times 100 = \% \text{ de Unión Específica}$$

Donde, cuentas totales es la cantidad total de radiactividad del trazador presente al inicio de la reacción y las cuentas de la muestra es la cantidad de radiactividad unida al anticuerpo después del método de separación, ya sea que se halla adicionado estándares o la muestra problema.¹⁸

Ejemplo. Cantidad total de trazador presente al inicio de la reacción: 21,480 cpm. Después del método de separación (en ausencia de analito sin marcar, que compita con el trazador) la cantidad del trazador presente en:

Fracción unida: 7,567 cpm Fracción libre: 13,913 cpm UNE: 502 cpm

Por lo que, el porcentaje de unión es igual al 32.9 %; éste valor representa la máxima unión del trazador al ligando específico en ausencia de analito y es llamado U₀ (Unión a estándar cero o unión específica máxima).

En el siguiente ejemplo, se dan las respuestas correspondientes a cada dosis cuando se cuantifica la fracción unida de un trazador radiactivo, representado como porcentaje de la radiactividad total.

cpm totales: 21480 cpm			
UNE: 502 cpm			
Concentración Analito (unidades arbitrarias)	cpm	cpm – cpm de UNE	% de Unión especifica
0	7567	7065	32.9
300	7199	6697	31.2
600	6842	6340	29.5
1200	6054	5552	25.8
2400	4839	4337	20.2
4800	3595	3093	14.4
9600	2633	2131	9.9
19200	1838	1336	6.2
38400	1618	1116	5.2

5. Análisis de los datos

Al graficar el porcentaje de trazador unido contra las concentraciones de los estándares en una escala semilogarítmica se obtiene una curva sigmoide. La forma de conocer las concentraciones de las muestras problema es a través de la interpolación de la respuesta producida en la curva estándar (**Figura 7**).¹⁶

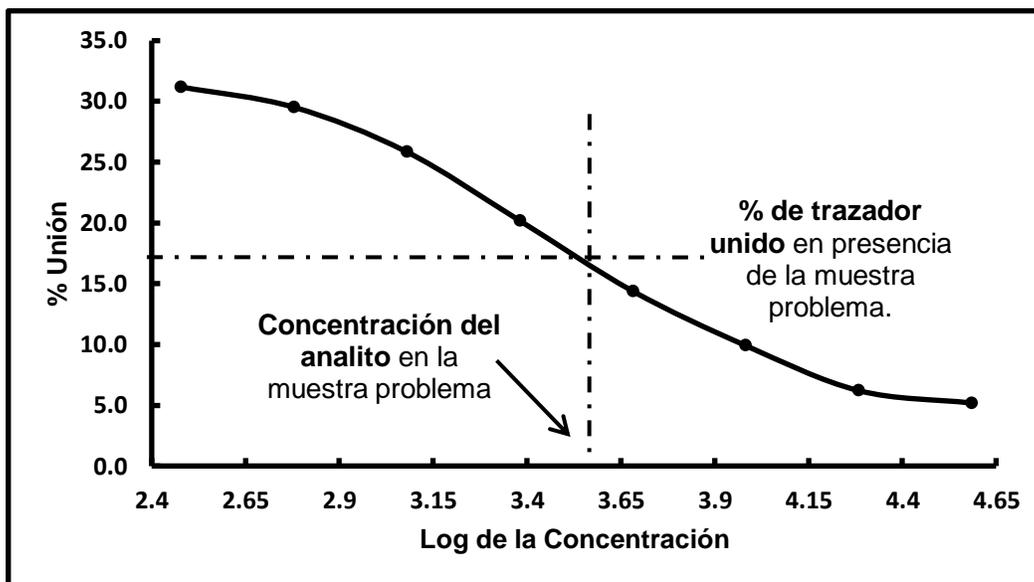


Figura 7. Estimación de la cantidad de analito presente en una muestra desconocida utilizando una curva estándar. La muestra desconocida es tratada bajo las mismas condiciones que los estándares, y el porcentaje de trazador unido es de aproximadamente 17.5%; esto corresponde a un valor de 3.52 (escala logarítmica) y un resultado final de 3311 unidades arbitrarias de concentración.

En la mayoría de los casos se requieren realizar cálculos adicionales o transformaciones matemáticas con la finalidad de obtener una curva estándar, que al representarse en forma gráfica de una línea recta, ya que esto facilita el procesamiento de los datos.^{16,18}

Uno de los métodos más utilizados y uno de los más prácticos es la transformación Logit. Es un método que emplea la conversión de la dosis a logaritmos y la respuesta expresada como el logaritmo de la relación de $((U/U_0) / (1-(U/U_0)))$.¹⁸

$$X = \text{Log de la dosis} \quad Y = \text{Logit} = \text{Log de } ((U/U_0) / (1-(U/U_0)))$$

Donde:

U = % de unión específica de cada dosis; U_0 = % de unión máxima a dosis cero.

En algunas situaciones la transformación de los datos de la curva estándar mediante el sistema Logit puede no resultar en una línea recta, por lo que es necesario utilizar otros modelos y representaciones matemáticas como el modelo logarítmico, el modelo de ley de acción de masas o el modelo logístico de 4 parámetros; muchos de los cuales están ya disponibles en programas computacionales o en el mismo software del equipo que realiza la lectura de radiactividad.¹⁶

2.3.2 Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzima, ELISA

Los ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzima (ELISA, por sus siglas en Ingles) son un tipo de inmunoensayos enzimáticos (EIA) que se diferencian por el hecho de que uno de los reactivos (antígeno o anticuerpo) es inmovilizado a un soporte sólido, lo que facilita la separación de la fracción libre y unida, una vez que se han formado los complejos antígeno-anticuerpo. Éstos se distinguen de otros inmunoensayos como el RIA por el uso de una enzima acoplada ya sea al anticuerpo o al antígeno; al anticuerpo o antígeno acoplado a la enzima se le conoce como conjugado. Para poner de manifiesto la presencia de la enzima, esta se hace reaccionar con un sustrato incoloro para generar un producto coloreado, este sustrato se denomina sustrato cromógeno.^{19,20}

Los ELISAs presentan grandes ventajas, que hacen que cada día se vayan imponiendo sobre métodos tales como aquellos basados en la utilización de trazadores radiactivos o trazadores emisores de luz. Entre las ventajas que presenta se encuentran las siguientes: no requiere un equipamiento demasiado sofisticado y caro para su implementación en el laboratorio; los reactivos empleados tienen un vida media muy larga (en el caso del RIA, un trazador radiactivo marcado con yodo-125 tiene una vida media de 60 días, mientras que un conjugado enzimático utilizado en ELISA suele conservarse en buen estado durante años) y; no se corre el riesgo de contaminación producida por el manipuleo de isótopos radiactivos.^{21,22}

2.3.2.1 Clasificación y Diseño de los ELISAs

En la actualidad existen una gran variedad de diseños de ELISA que permiten la detección cualitativa o la medición cuantitativa de antígenos o anticuerpos. La configuración de un sistema de ELISA específico dependerá de los objetivos que se pretendan alcanzar; sin embargo, independientemente del diseño del ELISA, estos se pueden clasificar de forma general en dos tipos:

- A. De ampliación de actividad, multiplicativos o no competitivos.** En estos métodos la señal obtenida es directamente proporcional a la concentración del analito que se está midiendo. Tal es el caso de los ELISA tipo sándwich.^{21,22}
- B. De modulación de actividad, de inhibición o competitivos.** En estos métodos la señal obtenida es inversamente proporcional a la concentración del analito que se está midiendo.^{21,22}

Existen varios diseños del tipo competitivo, uno de ellos es aquel en el que se inmoviliza el antígeno y se utiliza un anticuerpo anti-antígeno marcado con enzima. En este caso se produce una competición entre el antígeno unido a la placa (fase sólida) y el antígeno libre presente en la fase líquida, por unirse al anticuerpo conjugado con enzima. Como consecuencia de esta competición, la actividad enzimática detectable disminuye a medida que se emplean concentraciones crecientes de antígeno libre, pues el anticuerpo es neutralizado por el antígeno de la fase líquida y se limita su unión a la fase sólida (**Figura 8**).²¹

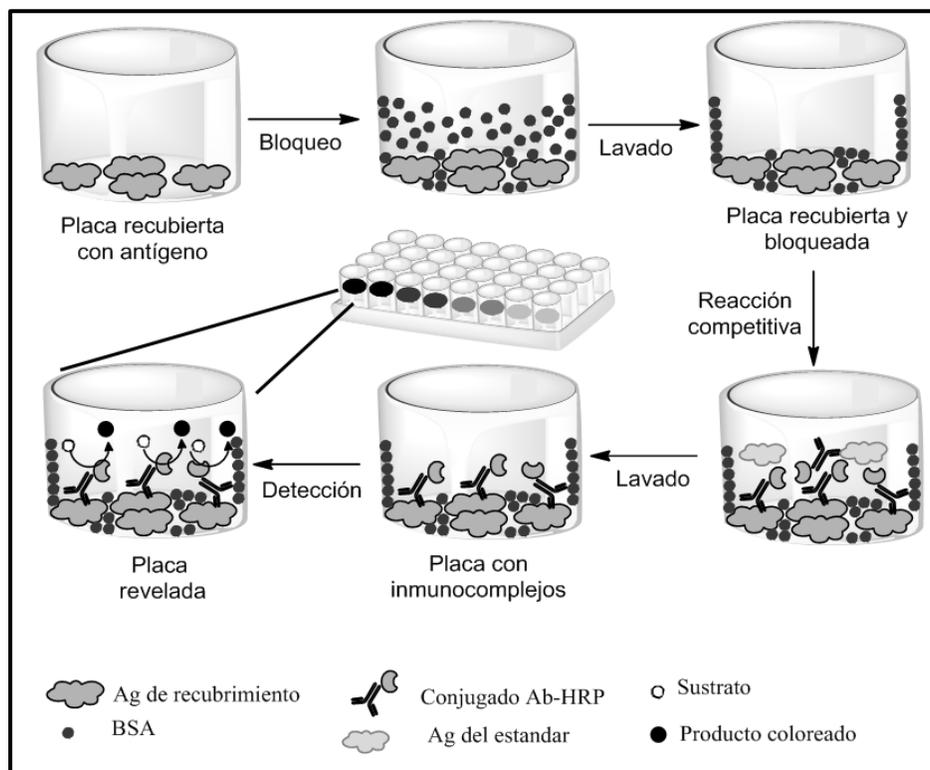


Figura 8. Diagrama esquemático del ELISA competitivo.

2.3.2.2 Componentes del ELISA

- I. **Fase sólida.** La fase sólida más ampliamente utilizada es la placa de ELISA de 96 pocillos manufacturada de cloruro de polivinilo (placas flexibles) o poliestireno (placas rígidas), que tienen un formato de 8 x 12 pocillos. Su función es proveer un soporte en donde uno de los reactivos (antígeno o anticuerpo) pueda ser inmovilizado para facilitar la separación de las fracciones libre y unida, una vez que se han formado los complejos antígeno-anticuerpo. Estas fases sólidas deben reunir ciertas características, tales como poseer una alta capacidad de unión de inmunoreactantes, ser capaces de inmovilizar diversos inmunoreactantes, producir una desorción mínima y desnaturalización despreciable de la molécula inmovilizada.^{21,23}
- II. **Buffer de recubrimiento.** Los más utilizados son el buffer carbonatos 50 mM, pH 9.6; Tris-HCl 20 mM, pH 8.5; y PBS, pH 7.2. Estos buffers proporcionan las condiciones de pH y fuerza iónica necesarias para que los antígenos o anticuerpos puedan ser unidos a la fase sólida por absorción pasiva.^{21,23}
- III. **Buffer de lavado.** Se emplea para separar la fracción libre de la unida, el buffer empleado típicamente es el PBS (100 mM, pH 7.4), aunque también son empleados los buffer de fosfatos de baja molaridad (10 mM); independientemente del tipo de buffer, estos pueden llevar un detergente como el Tween-20 al 0.05%.^{21,23}
- IV. **Buffer de bloqueo.** Es un buffer de recubrimiento el cual lleva un agente bloqueante (la cual es una molécula que no interacciona con los componentes del sistema); entre los más utilizados se encuentran la leche descremada, BSA, gelatina, casina, Tween-20, entre otros. Este buffer es empleado para prevenir cualquier unión no específica, de las proteínas en los sitios libres de la placa, con lo que se disminuye el background o fondo.^{21,23}
- V. **Conjugado.** Estos se obtienen por unión química de unos de los reactivos (antígeno o anticuerpo) con una enzima. Las enzimas empleadas comúnmente son la peroxidasa de rábano picante (HRP por sus siglas en inglés), la fosfatasa alcalina (ALP por sus siglas en inglés), la β -galactosidasa y la ureasa. Existen numerosos métodos de conjugación química entre los que se encuentran la conjugación con m -NaIO₄ (meta-peryodato de sodio), con glutaraldehído, con PBQ (p-benzoquinona), entre otros; la elección del método a utilizar dependerá de las características del antígeno o anticuerpo a unir y de la enzima. Un buen conjugado enzimático se caracteriza por tener una composición definida y homogénea, se obtiene sin pérdida de la actividad enzimática ni de la capacidad de reconocimiento antigénico,

es altamente estable al almacenamiento por periodos prolongados, el método empleado para su obtención produce un alto rendimiento en conjugado y un bajo rendimiento en homopolímeros y, debe ser económico, rápido y fácil de preparar.^{21,22,23}

VI. Sustrato / Agente cromógeno /buffer de sustrato. El sustrato es un compuesto químico el cual reacciona específicamente con la enzima del conjugado; esta reacción produce una señal que se lee como una reacción de color (directamente como un cambio de color del sustrato o indirectamente por el efecto de la reacción sobre otro producto químico llamado agente cromógeno); para que la reacción tenga lugar es necesario controlar las condiciones de pH y fuerza iónica, lo cual se logra mediante el empleo de buffers. En el **cuadro 1** se enlistan los sustratos, agentes cromógenos y buffer empleados para las diferentes enzimas empleadas en los métodos de ELISA.²³

VII. Solución stop. Es una solución que se emplea para detener la reacción entre la enzima y el sustrato. En el **cuadro 1** se enlistan las soluciones stop empleados para cada enzima.²³

2.3.2.3 Etapas del ELISA

1. Inmovilización de inmunoreactantes en la fase sólida

La inmovilización del inmunoreactante en la fase sólida puede ser no covalente o covalente. La primera se lleva a cabo por absorción pasiva, un proceso llamado comúnmente recubrimiento. La mayoría de las proteínas se absorben en las superficies plásticas, probablemente como resultado de interacciones hidrofóbicas entre estructuras no polares de la molécula y la matriz de plástico. Los factores más importantes que afectan en el proceso de absorción, son la temperatura, el tiempo, el pH, fuerza iónica y la concentración. De forma común, el proceso de recubrimiento se realiza incubando toda la noche a 4 °C o a 37 °C durante 1-3 horas.

Un rango de concentraciones de entre 1-10 µg/mL en un volumen de 50 o 100 µL de la molécula de recubrimiento, es suficiente para saturar los sitios disponibles en los pocillos de la placa. Para controlar el pH y la fuerza iónica, los inmunoreactantes se diluyen en buffers de recubrimiento.^{21,23}

La inmovilización covalente se realiza empleando métodos químicos, ejemplo de ello es el uso de glutaraldehído. Estos se emplean cuando las moléculas se unen con muy baja afinidad al plástico o tienen un alta desorción, tal es el caso de la unión de DNA, haptenos y oligopeptidos pequeños.^{22,23} La concentración óptima del inmunoreactante para el recubrimiento, debe determinarse por titulación previa.^{21,23}

Cuadro 1. Enzimas, cromógenos y condiciones de stop empleadas en los ELISAs.²³

Enzima	Sustrato	Cromógeno	Buffer de sustrato	Solución stop	Color		Lectura (nm)	
					Sin detener	Detenida la reacción	Sin detener	Detenida la reacción
HRP	H ₂ O ₂ (0.004%)	OPD	Fosfato / citrato, pH 5.0	1.25 M ácido sulfúrico	Verde / anaranjado	Anaranjado/café	450	492
	H ₂ O ₂ (0.004%)	TMB	Acetatos 0.1 M, pH 5.6	SDS (1%)	azul	Amarillo	650	450
	H ₂ O ₂ (0.002%)	ABTS	Fosfato / citrato, pH 4.2	No stop	Verde	Verde	414	414
	H ₂ O ₂ (0.006%)	5-AS	Fosfatos, pH 6.8	No stop	Café	Café	450	450
	H ₂ O ₂ (0.02%)	Diaminobenzidina	Tris o PBS, pH 7.4	No stop	Café	Café		
ALP	p-NPP (2.5 mM)	p-NPP	Dietanolamina 10 mM y cloruro de magnesio 0.5 mM, pH 9.5	2 M carbonato de sodio	Amarillo/verde	Amarillo/verde	405	405
β-galactosidasa	ONPG (3 mM)	ONPG	Cloruro de magnesio y 2-mercaptoetanol en PBS, pH 7.5.	2 M carbonato de sodio	Amarillo	Amarillo	420	420
Ureasa	Urea	Bromocresol	pH 4.8	Mertiolate 1%	Purpura	Purpura	588	588

p-NPP: para nitrofenil fosfatos; ONPG: o-nitrofenil β-d-galactopiranososa; OPD: o-fenilendiamina; TMB: tetrametilbencidina; ABTS: 2,2'-Azino dietilbenzotiazolina ácido sulfónico; 5-AS: ácido 5-aminosalicílico; SDS: dodecilsulfato sódico.

2. Lavado

Para ello se hace empleo de los buffers de lavado los cuales facilitan la eliminación del inmunoreactante de recubrimiento no unido a la placa. Esta etapa de lavado y las posteriores, son críticas para separar el componente específicamente unido al inmunoreactante inmovilizado en la fase sólida, de componentes que puedan reaccionar de forma no específica.^{21,23}

3. Bloqueo

Los buffers de bloque se utilizan debido a que después de la etapa de recubrimiento de la fase sólida persisten sitios de unión al plástico no ocupados, y es necesario bloquear estos sitios con proteínas no relacionadas con el reconocimiento inmunológico. De otro modo, los inmunoreactantes que se emplearan en etapas posteriores podrán unirse a estos sitios, produciendo resultados alterados.^{21,23}

4. Formación de inmunocomplejos

Es esta etapa se incuba la muestra problema y/o los estándares en los pocillos de la placa, de modo que estos reaccionen con el inmunoreactante inmovilizado. En esta etapa además se amplifica o modula la actividad por medio de la utilización del conjugado enzimático. La adición de la muestra problema (o estándares) y del conjugado se puede realizar simultáneamente o en pasos consecutivos con lavados intermedios, todo ello dependerá del diseño del ELISA. El tiempo y temperatura óptimos de incubación con cualquiera de los inmunoreactantes debe establecerse en forma empírica.^{21,23}

En esta etapa existe el riesgo de que algunas moléculas del inmunoreactante (antígeno, anticuerpo o el conjugado enzimático) se unan en forma no específica a algún componente inmovilizado en la fase sólida, lo que produciría resultados alterados. Para evitar este efecto se diluye cada inmunoreactante en presencia de un gran exceso (0.1-1%) de una proteína no relacionada inmunológicamente, con objeto de que compita con el inmunoreactante por estos sitios de unión no específicos. Además y con el mismo fin, a estas soluciones diluyentes suele agregárseles un detergente no iónico, siendo el más empleado el Tween-20 al 0.05%.²¹

La dilución óptima del conjugado enzimático a ser empleada debe determinarse por titulación previa.²¹

5. Revelado

Después de un lavado para eliminar todas las moléculas no unidas a la fase sólida en forma de inmunocomplejos, se añade el sustrato enzimático en solución. Se deja reaccionar y se lee la absorbancia del color generado mediante espectrofotometría, utilizando un lector de placas.²³

6. Análisis de los resultados

De manera similar a lo discutido para el análisis de resultados en el RIA, la forma de conocer las concentraciones de la muestra problema en los ELISA, es a través de la interpolación de la respuesta producida por cada muestra problema, en el gráfico de dosis-respuesta generado por la curva estándar.

2.4 Validación de métodos analíticos

Un método analítico se define como la descripción de secuencias de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir, para llevar a cabo el análisis de un componente específico en una muestra, denominado analito. Como todo proceso de medición, éste debe de ser confiable para ser utilizado con un propósito definido.²⁴

La validación de métodos analíticos es el proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada; es decir cumple con su propósito. Según su objetivo los métodos analíticos se clasifican en cuatro categorías: 1) pruebas de identificación, 2) pruebas cuantitativas para impurezas, 3) pruebas de límites de impurezas y 4) pruebas de concentración o potencia.

Al llevar a cabo el proceso de validación, uno debe tener en cuenta que los parámetros de validación pertinentes dependen de la finalidad específica de la medición; además de si la validación a realizarse será parcial o completa.^{24,25} En el **cuadro 2** se resumen las 4 categorías de los métodos analíticos y los parámetros de validación a estudiar en cada uno de ellos.

Cuadro 2. Parámetros de desempeño a estudiar en la validación de los métodos analíticos.

Clasificación del método. <i>Parámetros</i>	<i>Identificación</i>	<i>Prueba para impurezas</i>		<i>Contenido, Potencia, Valoración</i>
		<i>Cuantitativa</i>	<i>Límite</i>	
<i>Exactitud</i>	-	+	-	+
<i>Precisión</i>				
▪ <i>Repetibilidad</i>	-	+	-	+
▪ <i>Precisión intermedia</i>	-	+(1)	-	+(1)
<i>Especificidad</i> ⁽²⁾	+	+	+	+
<i>Linealidad</i>	-	+	-	+
<i>Límite de detección</i>	-	-(3)	+	-
<i>Límite de cuantificación</i>	-	+	-	-
<i>Rango</i>	-	+	-	+

- Significa que esta característica no se evalúa normalmente. + significa que esta característica normalmente se evalúa. (1) En los casos en que ha realizado reproducibilidad, la precisión intermedia no es necesaria. (2) La falta de especificidad de un procedimiento analítico podría ser compensado por otros procedimientos analíticos de apoyo. (3) Puede ser necesaria en algunos casos.

A. Exactitud

La exactitud de un método analítico expresa el grado de concordancia entre el valor que se acepta, ya sea como un valor convencional verdadero o un valor de referencia aceptado y el valor encontrado con el método.

Existen diversas formas para determinar la exactitud de un método.

- a. Empleando el método para analizar un analito de pureza conocida (por ejemplo una sustancia de referencia).²⁴
- b. Por comparación de los resultados obtenidos por el método analítico a validar con los de un segundo procedimiento bien caracterizado, al evaluar las mismas muestras.²⁴
- c. Por pruebas de recobro, en donde se analiza una muestra antes y después de adicionar una cantidad conocida del analito, y el resultado se calcula y expresa matemáticamente en forma de porcentaje de recuperación ((valor obtenido/valor esperado) x 100).^{24,26} Un criterio de aceptación para esta prueba, en el caso de los ELISAs, es que el porcentaje de recuperación se encuentre entre 80% y 120%.²⁶
- d. Una forma muy empleada para evaluar la exactitud, en los métodos por ELISA, es a través de **ensayos de paralelismo o dilución**, el cual es usado también para evaluar la linealidad. Para que los resultados de este método sean validos es esencial que el analito en el estándar y las muestras tengan un comportamiento similar; por esta razón las diluciones no deben afectar el resultado final. Con este ensayo se evalúa el efecto matriz. Para llevar a cabo esta evaluación se realiza al menos tres diluciones de diferentes muestras que cubren el rango analítico; los resultados obtenidos se corrigen por el factor de dilución y deben ser idénticos dentro del rango experimental, por lo que el coeficiente de variación no debe ser mayor al de la precisión del ensayo. También se puede evaluar los resultados a través del coeficiente de determinación (r^2) y correlación (r).²⁶

B. Especificidad

La especificidad es la capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no de otros componentes de la muestra, entre los cuales se pueden encontrar impurezas, productos de degradación, matriz, etc.²⁵

Para el caso de los bioensayos basados en unión a ligandos (como el ELISA, RIA) se deben evaluar las interferencias causadas por sustancias fisiológicamente similares al analito (metabolitos, fármacos, compuestos endógenos, etc.) de forma individual y en combinación con el analito de interés. También se debe estudiar los efectos causados por la matriz y/o compuestos presentes dentro de esta, como lípidos, hemoglobina, anticoagulantes, etc. Mediante pruebas de paralelismo se puede evaluar la especificidad del método.^{26,27}

C. Precisión

La precisión de un método analítico expresa grado de dispersión entre una serie de mediciones obtenidas a partir del muestreo múltiple de la misma muestra homogénea. La precisión puede ser considerada en tres niveles:

- 1. Repetibilidad:** expresa la precisión en las mismas condiciones de operación (mismo analista, mismos equipos, etc.) durante un intervalo corto de tiempo (mismo día). A la repetibilidad también se le denomina precisión intra-ensayo.
- 2. Precisión intermedia:** expresa las variaciones dentro de laboratorio; diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos, etc.
- 3. Reproducibilidad:** expresa la precisión entre laboratorios (estudios de colaboración, por lo general se aplica a la estandarización del método).²⁵

La precisión debe ser evaluada usando un mínimo de cinco determinaciones por concentración. Se recomienda un mínimo de tres concentraciones dentro del rango de concentraciones del método. La precisión es generalmente expresada a través de la varianza, desviación estándar o el coeficiente de variación (CV). Los inmunoensayos enzimáticos, por su propio carácter, son menos precisos que las técnicas químicas o físicas, por lo que el criterio de aceptación es menos riguroso. Para cada nivel ensayado se acepta un CV no mayor al 20%, salvo el límite inferior de cuantificación el cual no puede superar el 25% de CV²⁷; se consideran óptimos los CV menores al 5 o 10%.²⁶

D. Linealidad

La linealidad es la habilidad del método para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática definida, son proporcionales a la concentración del analito, dentro de un determinado rango de concentraciones.

En la evaluación de éste parámetro es recomendable utilizar una serie de cinco concentraciones del analito de interés. La linealidad del método puede evaluarse, analizando los resultados experimentales, por medio de un método estadístico apropiado, como es la línea de regresión obtenida por el método de mínimos cuadrados, que permiten llevar a cabo la estimación matemática del grado de linealidad del método analítico. El coeficiente de determinación (r^2) es utilizado como criterio de aceptación en la determinación de la linealidad del método; considerándose como óptimo un $r^2 \geq 0.98$.²⁴

E. Límite de detección

El límite de detección es la dosis más baja distinta de cero del analito, que puede ser detectada por el método, pero no necesariamente cuantificada como un valor exacto.²⁴

Para el caso de los inmunoensayos una forma para calcular el límite de detección es a través de la medición de la respuesta de un número considerable de blancos (muestras que carecen del analito), típicamente 20 a 50. Entonces se calcula la media de la respuesta (absorbancia de la dosis cero) y se le resta (si el método es competitivo) o se le suma (si el método es no competitivo) dos veces el valor de la desviación estándar. Finalmente dicho valor obtenido se interpola en la curva estándar y cualquier concentración arriba (método competitivo) o abajo (método no competitivo) de este valor tiene un 95 por ciento de probabilidad de ser un resultado distinto de cero.^{19,26}

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La epidemia de la diabetes mellitus (DM) es reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una amenaza mundial.¹ Se estimó que en el año 2011 aproximadamente 366 millones de personas alrededor del mundo padecían diabetes. Si estas tendencias continúan, para el año 2030, unos 552 millones de personas presentarán diabetes.²⁸ En México la DM es una de las principales causas de defunciones en hombre y mujeres^{1,29,30} y su tasa de prevalencia en adultos en 2011 fue de aproximadamente 14.8%, una de las más altas del mundo.²⁸

En la actualidad la diabetes mellitus es la principal causa de amputación de miembros inferiores y de insuficiencia renal en los Estados Unidos de Norteamérica; es la principal causa de ceguera en la población económicamente activa y una de las principales causas de discapacidad y de mortalidad prematura, cardiopatía isquémica y enfermedad cerebro vascular. Así, la diabetes es un problema de salud pública, es un padecimiento crónico con un alto impacto económico, social y familiar, que conlleva a una disminución en la calidad de vida de los sujetos que la padecen así como a pérdida de años de vida productiva y años de vida potencial, como consecuencia de sus complicaciones crónicas o de la mortalidad.³¹

En las últimas décadas, la investigación biomédica ha aportado mucha información en lo referente a la participación de los AGEs en las complicaciones cardiovasculares y renales de los pacientes diabéticos. Aparentemente, los AGEs pueden mantenerse en la circulación hasta un año después de su síntesis, y su actividad nociva de entrecruzamiento con otras proteínas y de depósito en los tejidos, continúa aún después de que las concentraciones séricas de glucosa regresen a su valor normal como consecuencia de un tratamiento médico efectivo. Por tal razón, los AGEs podrían ser un mejor indicador del estado de control glicémico a largo plazo y del daño acumulado en los tejidos del paciente diabético. Conocer las concentraciones séricas de AGEs en el paciente diabético, constituirá una herramienta de gran utilidad para el control de la enfermedad y la prevención de las complicaciones cardiovasculares y renales de los pacientes diabéticos; y contribuirá a la disminución de la incidencia de muerte de estos pacientes debido a las complicaciones propias de la enfermedad.

A pesar de ello, debido a complicaciones metodológicas, aún no se cuenta con un método comercial para medir de forma confiable, las concentraciones circulantes de AGEs, que permita establecer su relación con el nivel de gravedad de las complicaciones asociadas a la Diabetes Mellitus. El desarrollo de metodologías para la cuantificación de los AGEs, se ha visto limitado debido a la falta de preparaciones estándares de referencia y de una unidad estándar reconocida internacionalmente para

su medida, lo que dificulta la comparación de resultados entre diferentes laboratorios. Esto se debe a la heterogeneidad estructural que presentan los AGEs, que no permite establecer cuales AGEs deberían ser medidos, y en particular, cuales estructuras químicas tienen mayor relevancia biológica.³²

Los métodos existentes para la cuantificación de AGEs están basados en técnicas como HPLC, espectrometría de masas y cromatografía de gases, con los cuales se ha intentado determinar si a través de la medición de los niveles de AGEs, es posible establecer valores pronósticos para predecir las complicaciones de la diabetes. Sin embargo, estos métodos tienen la gran desventaja de no poder implementarse en laboratorios clínicos de rutina debido a la utilización de equipo muy sofisticado para su realización, así como la baja capacidad de procesamiento simultáneo de muestras.^{13,14,32} Por lo cual, algunos laboratorios han comenzado a desarrollar métodos para cuantificar estos compuestos mediante inmunoensayos, utilizando procedimientos propios para la generación de los anticuerpos anti-AGEs.

En los últimos años, el Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (INCMNSZ), después de haber probado diferentes procedimientos químicos y ensayado varios esquemas de inmunización, ha desarrollado una metodología apropiada para la síntesis química de AGEs, que reproduce a escala de laboratorio, los procesos que normalmente ocurren en la sangre de los diabéticos. También han logrado desarrollar una metodología efectiva para producir anticuerpos específicos contra AGEs con valor diagnóstico para el monitoreo del paciente diabético. Ya han iniciado el desarrollo y validación de un radioinmunoanálisis específico para medir AGEs en suero, con resultados preliminares alentadores; sin embargo las desventajas que presenta este método como son la vida media corta del trazador radioactivo, el equipo sofisticado para su lectura, así como los permisos necesarios emitidos por las autoridades correspondientes, para el manejo de material radioactivo, hacen que se dificulte la implementación de esta metodología en los laboratorios de rutina de otras instituciones de salud que no disponen de grandes recursos económicos ni tecnológicos.

Por todo lo anterior, el presente trabajo centra su atención en el desarrollo de un ensayo inmunoenzimático de competición, tipo ELISA, para la cuantificación de AGEs circulantes; que pueda ser empleado de forma confiable por los laboratorios clínicos de rutina. El desarrollo de este ensayo inmunoenzimático permitiría su empleo en estudios posteriores para evaluar la relación entre las concentraciones circulantes de los AGEs y el grado de complicación de los pacientes diabéticos, con el fin de brindar un mejor manejo clínico del paciente diabético.

4. OBJETIVO

General

Desarrollar y validar un inmunoensayo enzimático de competición, tipo ELISA, para la cuantificación de productos finales de glicación avanzada (AGEs).

Específicos

- I. Preparar el antígeno AGE-BSA.
- II. Producir el suero hiperinmune anti-AGE-BSA y purificar los anticuerpos anti-AGEs por cromatografía de inmunoafinidad.
- III. Sintetizar un conjugado enzimático utilizando los anticuerpos anti-AGEs purificados acoplándolos con peroxidasa de rábano picante.
- IV. Normalizar el proceso de recubrimiento de las placas de ELISA con AGE-BSA.
- V. Determinar el título de trabajo del conjugado enzimático.
- VI. Normalizar las condiciones del ensayo.
- VII. Validar el inmunoensayo a través de la evaluación de la exactitud del método a través del análisis de linealidad y el límite de detección, así como la precisión intra- e interensayo.
- VIII. Evaluar el desempeño del método en condiciones reales de trabajo al procesar muestras de individuos sanos controles y de pacientes diabéticos sin y con complicaciones crónicas de la diabetes.

5. HIPÓTESIS

El inmunoensayo enzimático de competición, tipo ELISA, desarrollado para la cuantificación de AGEs circulantes, presentará una respuesta analítica satisfactoria que permitirá encontrar diferencias en las concentraciones del analito, entre individuos controles sanos y pacientes con diabetes mellitus. Quedando demostrado así, la utilidad práctica del ensayo, no sólo por la confiabilidad de los resultados, sino también, por su capacidad para ser utilizado en estudios posteriores en donde se evaluara la relación entre las concentraciones de AGEs y el grado de complicación de los pacientes diabéticos.

6. MATERIAL Y MÉTODO

6.1 Preparación del antígeno AGE-BSA

Equipo

- Campana de flujo laminar.
- Estufa de cultivo.
- Centrifuga refrigerada (J-6B; BECKMAN).
- Bomba peristáltica (Pump P-1; Pharmacia Biotech).
- Fraccionador (Waters).
- Fluorómetro (Luminescence Spectrometer LS-50B; Perkin Elmer).

Material

- Sistema desechable de esterilización por filtración con membrana de acetato de celulosa con poro de 0.22 μm (CORNING).
- Membrana de diálisis de 6-8 KDa (Spectra).
- Columnas cromatográficas 1.5 x 10 cm (Glass Econo-Column BIO RAD).
- Tubos de ensayo 13 x 100 mm.
- Material para RIA de AGEs (Anexo 1).

Reactivos

- D-(+)-Glucosa anhidra (Sigma Aldrich).
- Albúmina Sérica Bovina, BSA (Sigma Aldrich).
- Borohidruro de sodio (Merck Millipore).
- Reactivo de Bradford.
- Reactivo DC, para cuantificación de proteínas por Lowry (BIO RAD).
- Affi-Gel Blue (BIO RAD).
- PBS 0.1 M, pH 7.4.
- PBS EDTA-Timerosal: Buffer PBS con 25 mM de EDTA y 0.05% de timerosal.
- Buffer de elución A: buffer de fosfatos 20 mM, pH 7.1.
- Buffer de elución B: 1.4 M de NaCl en buffer de fosfatos 20 mM, pH 7.1.
- Buffer de elución C: 2 M de guanidina-HCl en buffer de fosfatos 20 mM, pH 7.1.
- Reactivos para RIA de AGEs (Anexo 1).

6.1.1 Síntesis del AGE-BSA

Se disolvió 45.5 g (0.25 mol) de D-(+)-glucosa anhidra (Sigma Aldrich) y 25 g de BSA (Sigma Aldrich) en 500 mL de PBS 0.1 M, pH 7.4. La disolución se esterilizó por filtración, en campana de flujo laminar, utilizando un sistema desechable de filtración con membrana de 0.22 μm (CORNING); y se incubó a 37 °C por 14 semanas. Simultáneamente, fue preparado un control negativo siguiendo el procedimiento anterior, pero sin la adición de glucosa. El monitoreo de la formación de AGEs se realizó mediante la medición de la fluorescencia emitida. Para ello, cada semana se tomó, bajo condiciones de esterilidad, una alícuota de la muestra, se le realizó una dilución 1:50 con buffer PBS 0.1M, pH 7.4 y se leyó en fluorómetro (Luminescence Spectrometer LS-50B; Perkin Elmer) a 370 nm / 440 nm (longitud de excitación / emisión), con rejillas de 2.5 nm de apertura.

Transcurridas las 14 semanas de incubación, la solución de AGE-BSA fue reducida para estabilizar las bases de Schiff formadas y permitir la completa formación de los productos finales de glicación avanzada. Para lo cual, se adicionó lentamente 10 mL de una solución de 200 mg/mL de borohidruro de sodio en agua bidestilada, a la solución de AGE-BSA (500 mL), y se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 1 hora. Posteriormente, se dializó extensivamente contra buffer fosfato de sodio 20 mM, pH 7.1 (Buffer A) durante 3 días con cambios sucesivos de buffer, utilizando membranas de diálisis Spectra de 6-8 KDa. Finalmente se tomó una alícuota del AGE-BSA para cuantificar su concentración de proteína mediante método de Lowry, y se realizó la evaluación por fluorescencia. Se estableció su actividad específica como la relación de la fluorescencia 370/440 nm y se definió su concentración como UAF/mL (Unidades Arbitrarias de Fluorescencia que tenía una solución de 1 mg/mL de AGE-BSA).

6.1.2 Purificación del AGE-BSA por Affi-Gel Blue

Para eliminar la albúmina menos glicada en la mezcla de reacción, se hizo empleo de la tecnología cromatográfica de Affi-Gel Blue. El Affi-Gel Blue es un gel de agarosa reticulada, que tiene unido covalentemente el colorante Cibacron Blue F3GA, el cual tiene la capacidad de unir específicamente a la albúmina.³³ Previo a la purificación del AGE-BSA se evaluó la capacidad de la matriz cromatográfica para unir la BSA así como el proceso de elución.

Para evaluar la capacidad de unión de la matriz, se empacó una columna cromatográfica 1.5 x 10 cm (Glass Econo-Column, BIO RAD) con 20 mL de Affi-Gel Blue (BIO RAD) y se lavó con 60 mL de Buffer A. Se diluyó 1 g de BSA en 20 mL de buffer A y se aplicó en la columna cromatográfica a un flujo de 30 mL/h, utilizando una bomba peristáltica (Pump P-1; Pharmacia Biotech). Se recolectaron fracciones de 2.0 mL en tubos de vidrio, empleando para ello un colector de fracciones (Waters). Se lavó la columna con 60 mL de buffer A para eliminar toda la proteína no unida a la matriz. Posteriormente se pasó 60 mL de buffer B para eluir la proteína unida débilmente a la matriz y 60 mL de buffer C para eluir la proteína fuertemente unida. Finalmente se lavó la columna con 100 mL de buffer A, para restablecer las condiciones de pH y fuerza iónica iniciales, quedando la matriz lista para un nuevo proceso de purificación. Con las fracciones colectadas y por el método de Bradford, se obtuvo el cromatograma. Se determinó la concentración de proteína de cada pico por método de Lowry y se estimó la capacidad de unión máxima de la columna como la sumatoria de la proteína unida en los picos 2 y 3.

Posteriormente, se llevó a cabo la purificación del AGE-BSA. Para ello, 4.3 mL de AGE reducido y dializado con una concentración de 35.15 mg/mL (150 mg de proteína) diluidos con 23 mL de Buffer A fueron aplicados en la columna de Affi-Gel Blue de 20 mL de lecho cromatográfico a un flujo de 30 mL/h, utilizando una bomba peristáltica (Pump P-1; Pharmacia Biotech). Se recolectaron fracciones de 2.0 mL, empleando para ello un colector de fracciones (Waters). Se lavó la columna con 60 mL de buffer A para eliminar toda la proteína no unida a la matriz (BSA altamente glicada). Posteriormente se pasó 60 mL de buffer B para eluir la proteína unida débilmente a la matriz (BSA moderadamente glicada) y 60 mL de buffer C para eluir la proteína fuertemente unida (BSA poco glicada). Finalmente se lavó la columna con 100 mL de buffer A, para restablecer las condiciones de pH y fuerza iónica iniciales. Con las fracciones colectadas se obtuvieron dos cromatogramas; el primero por el método de Bradford (medición de proteína), y el segundo a través de la medición de fluorescencia. Para lo segundo, a cada fracción colectada se le realizó una dilución 1:10 con buffer A y se le leyó en fluorómetro (Luminescence Spectrometer LS-50B; Perkin Elmer) a 370 nm / 440 nm (longitud de excitación / emisión), con rejillas de 2.5 nm de apertura. Por último, se determinó la concentración de albúmina glicada y no glicada, por cuantificación de cada pico del cromatograma mediante Lowry.

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

Se cuantificó por Lowry las concentraciones de proteína del control negativo, del AGE-BSA sintetizado sin reducir (semana 14), del AGE-BSA reducido, y del AGE-BSA purificado por Affi-Gel Blue (primer pico); y se ajustaron a una concentración de 1 mg/mL, utilizando Buffer A. A partir de cada muestra, se realizaron 4 diluciones seriadas 1:2 para obtener las siguientes concentraciones de proteína: 1.0, 0.5, 0.25, 0.125 y 0.063 mg/mL. A cada dilución se le midió la fluorescencia (Luminescence Spectrometer LS-50B; Perkin Elmer) a 370 nm / 440 nm (longitud de excitación / emisión), con rejillas de 2.5 nm de apertura. Finalmente se determinó la actividad específica de cada muestra como el resultado de la pendiente al graficar la concentración de proteína de cada dilución contra la fluorescencia emitida y se expresó en UAF/(mg/mL).

6.1.4 Determinación de la concentración y de la actividad específica final del AGE-BSA preparado

Para establecer el valor de la concentración en masa del AGE-BSA sintetizado, reducido y purificado para ser empleado como recubrimiento y como estándar, se le determinó su concentración por el método de Lowry. Una vez establecida su concentración en masa, se prepararon diluciones seriadas del AGE-BSA en concentraciones de entre 3 hasta 50 ng/mL y se estimó su concentración en Unidades de AGEs/mL en función de su reconocimiento inmunológico; utilizando el RIA previamente desarrollado (Anexo 1). Las concentraciones de AGEs obtenidas para cada dilución fueron ajustadas por la concentración másica y se estableció la actividad específica en UAF/(mg/mL).

6.2 Producción del suero hiperinmune anti AGE-BSA

Animales de experimentación

- 3 conejos machos de raza Nueva Zelanda de 3-4 kg de peso.

Equipo

- Contador de radiaciones gamma (Cobra II Auto Gamma; Packard).

Material

- Material para RIA de AGEs (Anexo 1).

Reactivos

- Adyuvante completo de Freund (Sigma Aldrich).
- Adyuvante incompleto de Freund (Sigma Aldrich).
- AGE-BSA purificado y caracterizado.
- Complete mini (Protease Inhibitor Cocktail Tables, Roche).
- Reactivos para RIA de AGEs (Anexo 1, variante A).

6.2.1 Esquema de inmunización

Tres conejos machos de la raza Nueva Zelanda de 3-4 kg de peso, fueron inmunizados según un esquema de hiperinmunización prolongada, que consistió en una inmunización inicial con 1 mL de AGE-BSA disuelto en Adyuvante Completo de Freund (Sigma Aldrich) a una concentración de 1 mg/mL. 15 días posteriores a la primera inmunización, se les administró un segundo estímulo con 1 mL de AGE-BSA disuelto en Adyuvante Incompleto de Freund (Sigma Aldrich) a la misma concentración. Posteriormente, los animales fueron inmunizados una vez al mes, durante los siguientes 3 meses, con 1 mL de AGE-BSA en adyuvante incompleto de Freund a una concentración de 0.5 mg/mL. En cada inmunización realizada, se recolectaron 3 mL de sangre de cada conejo, por punción en la vena marginal de la oreja, para seguir la respuesta inmune contra el inmunógeno inoculado.

Finalmente, mediante el seguimiento de la respuesta inmune de los conejos por radioinmunoanálisis, se decidió sangrar a los conejos 120 días posteriores a la primera inmunización. La sangre obtenida de cada animal fue centrifugada para separar el suero, y a éste se le adiciono por cada 10 mL de suero, 1 tableta de inhibidores de proteasas (complete mini, Roche) disuelta en 1.5 mL de buffer fosfatos 0.1 M, pH 7.0. El suero hiperinmune así obtenido, se conservó en congelación a 4 °C hasta el momento de ser evaluado.

6.2.2 Seguimiento de la respuesta inmune de los animales de experimentación por radioinmunoanálisis.

Las muestras de sangre obtenidas de cada sangrado realizado, en cada etapa del protocolo de inmunización, fueron centrifugadas y se les realizaron 19 diluciones seriadas 1:2 con buffer PBS-gelatina al 0.01%, pH 7.4 hasta obtener una dilución final de 1/ 524 288, y fueron analizadas por RIA como se indica en el **anexo 1, variante A**.

Finalmente para cada animal y para cada sangrado realizado, se graficó la dilución del suero contra el porcentaje de unión específica (% UE) obtenido, verificando así el transcurrir de la respuesta inmune de cada conejo; cuando los títulos no se incrementaron con sucesivas inmunizaciones se decidió terminar el esquema de inmunización y realizar el sangrado total de los conejos.

6.3 Purificación de los anticuerpos policlonales anti-AGEs por cromatografía de inmunoafinidad

Equipo

- Bomba peristáltica (Pump P-1; Pharmacia Biotech).
- Fraccionador (Waters).

Material

- Columna cromatográfica 1.5 x 10 cm (Glass Econo-Column BIO RAD).
- Tubos de ensayo 13 x 100 mm.
- Sistema desechable de esterilización por filtración con membrana de acetato de celulosa con poro de 0.22 μm (CORNING).
- Unidades de filtración por centrifugación con membrana de celulosa de 10 kDa (Amicon Ultra; Merck Millipore).
- Material para RIA de AGEs (Anexo 1).

Reactivos

- Suero hiperinmune anti-AGE-BSA producido en conejo.
- Affi-Gel 102 (BIO RAD).
- BSA (Sigma Aldrich).
- AGE-BSA purificado y caracterizado.
- EDAC (hidrocloruro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodimida; Sigma Aldrich)
- Buffer de elución A: buffer de fosfatos 20 mM, pH 7.1.
- Buffer de elución D: buffer Tris 0.1M, pH 7.4.
- Buffer de elución E: 1M de NaCl en buffer glicina 0.1M, pH 3
- Buffer de elución F: 1M de NaCl en buffer trietanolamina 0.1 M, pH 11.
- Buffer de fosfatos 20 mM, pH 4.7.
- Reactivo de Bradford.
- Reactivo DC, para cuantificación de proteínas por Lowry (BIO RAD).
- Reactivos para RIA de AGEs (Anexo 1, variante A).

6.3.1 Síntesis de la matriz cromatográfica de Affi-Gel 102-AGE-BSA

Para la síntesis de la matriz de Affi-Gel 102-AGE-BSA, se procedió según lo propuesto por el fabricante.³⁴ Para ello se mezcló 60 mL de AGE-BSA (con una concentración de 3.2 mg/mL) con 20 mL de Affi-Gel 102. Bajo agitación, se añadió 700 mg de reactivo acoplador EDAC, se ajustó el pH a 5.0 con HCl 1 N y se dejó a 4 °C durante 12 horas en agitación circular, para que la reacción se completara.

Se empacó una columna cromatográfica 1.5 x 10 cm (Glass Econo-Column BIO RAD) con la matriz de Affi-Gel 102–AGE-BSA preparada y se lavó con 100 mL de buffer A. Se cuantificó la cantidad de proteína en el eluato; a través de la estimación de la concentración por Lowry y su multiplicación por el volumen total del lavado. De esta forma se pudo determinar la cantidad de proteína acoplada a la matriz, como la diferencia entre la proteína adicionada en la reacción y la recuperada en el lavado. Posteriormente se equilibro la columna con 30 mL de buffer D, para dejarla lista para el inicio del proceso de purificación.

6.3.2 Eliminación de los anticuerpos generados contra la matriz proteica de BSA

A 100 mL del suero hiperinmune anti-AGEs diluido con 200 mL de buffer D, se le adicionó 1.5 gramos de BSA (Sigma Aldrich), y se dejó incubando a 4 °C durante 12 horas. La mezcla se centrifugó durante 30 minutos a 3000 rpm a 4 °C y el sobrenadante resultante se recuperó y filtró por vacío, utilizando una unidad de filtración desechable con membrana de 0.2 µm (CORNING).

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

Se aplicó a la columna cromatográfica con matriz Affi-Gel 102–AGE- BSA, los 300 mL del suero hiperinmune libre de anticuerpos anti-BSA, a un flujo de 35 mL/h. Se lavó la columna con 200 mL de buffer D conteniendo 0.1 M de NaCl, para arrastrar todas las proteínas no unidas a la matriz y aquellas unidas mediante interacciones débiles no específicas; dicho volumen no fue fraccionado. Posteriormente se pasó 200 mL de buffer E para eluir los anticuerpos cuyas interacciones con la matriz son sensibles al pH ácido (pico 2), recolectándose fracciones de 3.5 mL. Posteriormente, se pasó 200 mL de buffer F para eluir los anticuerpos cuyas interacciones con la matriz son sensibles al pH básico (pico 3). Finalmente se lavó la columna con 120 mL de buffer D, para restablecer las condiciones de pH y fuerza iónica iniciales. Con las fracciones colectadas se obtuvieron dos cromatogramas; el primero por el método de Bradford (medición de proteína), y el segundo a través de la medición de la capacidad de unión de los anticuerpos por radioinmunoanálisis (**anexo 1, variante A**).

Se mezclaron las fracciones correspondientes a los picos 2 y 3, y se concentraron los anticuerpos empleando Unidades de filtración por centrifugación con membrana de celulosa de 10 kDa. Una vez concentrados, los anticuerpos fueron dializados extensivamente contra buffer de fosfatos 20 mM, pH 7.1 y se les cuantificó la concentración de proteína mediante Lowry.

6.4 Síntesis del conjugado Anticuerpos anti-AGEs – HRP

Material

- Unidades de filtración por centrifugación con membrana de celulosa de 10 kDa (Amicon Ultra; Merck Millipore).

Reactivos

- Peroxidasa de rábano picante (HRP tipo VI, $Rz \approx 3$; Sigma).
- Peryodato de sodio (Merck).
- Borohidruro de sodio (Merck).
- Anticuerpos Anti-AGEs purificados (21.6 mg).
- Buffer fosfato de sodio 10 mM, 0.15 M NaCl, pH 7.2.
- Buffer acetato de sodio 1 mM, pH 4.
- Buffer carbonato de sodio 200 mM, pH 9.5.
- Buffer PBS.
- Glicerol (Fluka).

Se sintetizó el conjugado enzimático por el método del peryodato de sodio.³⁵ Para ello se disolvió 21 mg de peroxidasa de rábano picante (tipo VI, $Rz \approx 3$; Sigma) en 2 mL de buffer fosfato de sodio 10 mM, 0.15 M NaCl, pH 7.2, y se le adicionó 0,5 mL de peryodato de sodio (Merck) 0,1 M, preparado recientemente en el buffer fosfato mencionado anteriormente. Protegiéndose de la luz, se incubó la solución a temperatura ambiente durante 20 minutos, con agitación magnética. Posteriormente se dializó contra tampón acetato de sodio 1 mM pH 4 a 4 °C, utilizando unidades de filtración por centrifugación con membrana de celulosa de 10 kDa, se empleó un volumen de buffer 3 veces el volumen de la muestra oxidada inicial y se repitió el procedimiento 2 veces. Simultáneamente los 21.6 mg de anticuerpos anti-AGEs disueltos en 5 mL, se dializaron contra tampón carbonato de sodio 200 mM, pH 9.5.

Posteriormente, se mezcló ambas disoluciones y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas con agitación magnética. A continuación se adicionó 1.5 mL de borohidruro de sodio (Merck) 0,1 M en agua destilada, para estabilizar las bases de Schiff, y se incubó nuevamente a temperatura ambiente durante 2 horas con agitación magnética. Transcurrido el tiempo de incubación, la mezcla se dializó extensivamente contra buffer PBS, empleando las unidades de filtración por centrifugación, y se obtuvo así un volumen final de 25 mL de conjugado, el cual se diluyó 1:2 con glicerol (Fluka), y se conservó hasta ser empleado, a -20 °C.

6.5 Normalización del Ensayo

Equipo

- Lavador de microplacas (Stat Fax 2600; Awareness Technology Inc.).
- Lector de microplacas (Stat Fax 2100; Awareness Technology Inc.).
- Refrigerador.

Material

- Placas de poliestireno de 96 pocillos, de alta capacidad de unión (Costar, Corning; 3590).
- Micropipetas de volumen variable.
- Puntas para micropipetas.

Reactivos

- AGE-BSA purificado y caracterizado con una actividad específica de 112 UAF/ (mg/mL) estimada por RIA.
- Buffer de recubrimiento: PBS 0.1 M, pH 7.4.
- Buffer de lavado: PBS-T; PBS 0.05 M, pH 7.4, Tween-20 al 0.05%.
- Buffer de bloqueo: PBS 0.1 M, pH 7.4, Tween-20 al 0.05%, 0.5% de gelatina.
- Buffer de ensayo: PBS-BSA 1%, conteniendo 25 mM de EDTA y 0.05% de timerosal.
- Buffer para conjugado: buffer de ensayo conteniendo Tween-20 al 0.05% y SDS al 0.4%.
- Conjugado: conjugado Ab anti AGEs-HRP diluido 1:70 en buffer para conjugado.
- Estándares de AGEs: AGE-BSA disuelto en buffer de ensayo en las siguientes concentraciones: 69, 207, 621, 1863 y 5589 mU de AGEs/mL (0.62, 1.85, 5.55, 16.66 y 50 µg/mL).
- Controles internos de calidad: AGE-BSA disuelto en buffer de ensayo en las siguientes concentraciones:
Control I; 224 mU de AGEs/mL (2 µg/mL).
Control II; 1120 mU de AGEs/mL (10 µg/mL).
- Sustrato (preparar al momento): 1 tableta de OPD dihidrocloruro de 5 mg (Sigma Aldrich) disuelta en 11 mL de buffer fosfatos 0.2 M, pH 5.0, más 74 µL de una solución comercial de peróxido de hidrogeno. Utilizar una tableta por cada placa a montar.
- Solución stop: Ácido sulfúrico 2 N.

6.5.1 Titulación de los inmunoreactantes

La concentración óptima del antígeno de recubrimiento (AGE-BSA), y la dilución de trabajo del conjugado enzimático se determinó mediante titulación en formato de tablero de ajedrez.²³ Para ello se recubrió filas, de la placa de ELISA, con cantidades decrecientes del antígeno y se ensayaron contra diluciones crecientes del conjugado enzimático. Se evaluaron para el antígeno de recubrimiento (AGE-BSA) las siguientes concentraciones: 25, 20, 15, 10, 5, 2.5, 1 y 0.5 $\mu\text{g/mL}$; las cuales se titularon contra las siguientes diluciones del conjugado: 1:30, 1:50, 1:70 y 1:100. Finalmente se selecciono aquel par, concentración de recubrimiento-dilución de conjugado, que presento una absorbancia entre 1 y 1.5.

6.5.2 Recubrimiento y bloqueo de las placas de ELISA

Se recubrieron placas de poliestireno de alta capacidad de unión (Costar; Corning) con 100 μL por pocillo de AGE-BSA a una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ en buffer de recubrimiento. El primer pocillo de cada placa (blanco o unión no específica) se recubrió con 100 μL de PBS-BSA 1%. Las placas se incubaron a 4 $^{\circ}\text{C}$ en cámara húmeda durante 24-48 horas. El antígeno de recubrimiento no absorbido se eliminó lavando las placas tres veces con 300 μL por pocillo con buffer de lavado. Se realizó el bloqueo con 300 μL de buffer de bloqueo por pocillo, incubándose las placas a 4 $^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas en cámara húmeda. Finalmente las placas se lavaron nuevamente tres veces con 300 μL por pocillo con buffer de lavado.

6.5.3 Desarrollo del ensayo

La curva estándar se estableció con 5 concentraciones de AGE-BSA seriadas al triple, desde 69 hasta 5589 mU/mL (0.62 a 50 $\mu\text{g/mL}$), las cuales fueron preparadas a partir del AGE-BSA purificado y caracterizado con una actividad específica de 112 UAF/(mg/mL). También fueron preparados dos controles internos con concentraciones de 224 y 1122 mU/mL (2 y 10 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente).

El desarrollo del ensayo se realizó como a continuación se describe. A los tres primeros pocillos de cada placa se les adicionó 100 μL del buffer de ensayo (UNE: pocillo A1; y uniones máximas, dosis cero: pocillos B1 y C1). Se adicionó por duplicado, en cada placa, 100 μL de cada estándar (pocillos D1 a E2) y 100 μL de cada control (pocillos F2 a A3). A partir del pocillo B3 y hasta el H12, se les adiciono 100 μL de cada muestra a analizar.

A todos los pocillos se les adicionó 50 μ L de la dilución de trabajo del conjugado Ab anti AGEs-HRP (dilución 1:70) y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos para que la reacción antígeno-anticuerpo se llevara a cabo. Se lavaron las placas 3 veces y se revelaron añadiendo 100 μ L de sustrato por cada pocillo. Se dejó que la reacción procediera a temperatura ambiente durante 30 minutos y se detuvo con 20 μ L de ácido sulfúrico 2 N. Se midió la absorbancia en un lector de microplacas (Stat Fax 2100; Awareness Technology Inc.) a 492 nm, restándole la absorbancia a 630 nm y se interpretaron los resultados empleándose la transformación Logit para obtener la línea de regresión a partir de las concentraciones de los estándares.

6.6 Validación del Ensayo

Muestras

- Cuatro muestras de sueros de pacientes diabéticos con concentraciones altas de AGEs.

Equipo

- Lavador de microplacas (Stat Fax 2600; Awareness Technology Inc.).
- Lector de microplacas (Stat Fax 2100; Awareness Technology Inc.).

Material

- Materiales para ELISA de AGEs.

Reactivos

- Reactivos para ELISA de AGEs.
- AGE-BSA purificado y caracterizado con una actividad específica de 112 UAF/ (mg/mL).

6.6.1 Estudio de linealidad de la curva estándar

Para evaluar la linealidad de la curva estándar se analizaron por quintuplicado 5 niveles de concentración de AGEs (69, 207, 621, 1863 y 5589 mU/mL). Los resultados obtenidos se analizaron empleándose el modelo logístico para obtener la ecuación de regresión. Se estableció como criterio de aceptación para este parámetro un coeficiente de determinación (r^2) mayor o igual a 0.98.

6.6.2 Límite de detección

Para determinar el límite de detección se montó la curva estándar por duplicado y 30 blancos utilizando solo el buffer de ensayo como muestra; se calculó la media de las absorbancias de las 30 repeticiones y a ese valor se le restaron 2 desviaciones estándar. El nuevo valor obtenido se interpoló en la curva estándar siendo el resultado el límite de detección calculado.

6.6.3 Determinación de la precisión

Para ello se ensayaron las 2 muestras controles con valores de concentración de AGE conocidos (224 y 1120 mU/mL) y que se encontraban dentro del rango de la curva estándar. Se evaluó la repetibilidad a través del análisis de 10 replicas de cada una de las 2 muestras controles, en un ensayo. La precisión intermedia (reproducibilidad), se determinó mediante el análisis de los resultados obtenidos por el mismo analista, al analizar las 2 muestras controles, durante tres momentos diferentes en un lapso de un mes. La precisión se expreso a través del coeficiente de variación (CV), estableciéndose como óptimo un CV menor al 10% y aceptable un CV menor al 20%.

6.6.4 Evaluación de la exactitud

La exactitud del método se estudió mediante la realización de ensayos de paralelismo. Para lo cual se emplearon cuatro muestras de sueros con concentraciones altas de AGEs, a las cuales se les realizó cuatro diluciones seriadas 1:2, empleando buffer de ensayo como diluyente. Cada dilución así preparada se analizó por ELISA de AGEs. Finalmente, las concentraciones de AGEs encontradas se corrigieron por el factor de dilución. La exactitud se evaluó a través del coeficiente de variación de los resultados obtenidos para cada muestra analizada, estableciéndose como criterio de aceptación un CV no mayor al de la precisión del ensayo.

6.7 Evaluación del desempeño del método

Muestras

- 170 sueros de individuos sanos que no padecen diabetes (grupo control).
- 100 sueros de pacientes diabéticos que no presentan complicaciones crónicas de la enfermedad.
- 139 sueros de pacientes diabéticos con nefropatía diabética.
(Todas las muestras después de su obtención, fueron preservadas en congelación hasta su análisis).

Material

- Material para ELISA de AGEs.

Reactivos

- Reactivos para ELISA de AGEs.

Para evaluar el desempeño del método en condiciones reales de trabajo se midió, la concentración de AGEs circulantes presentes en 170 sueros de individuos sanos, 100 sueros de pacientes diabéticos que no presentaban complicaciones crónicas de la enfermedad y 139 muestras de suero de pacientes con nefropatía diabética. El análisis estadístico se realizó empleando el programa SigmaPlot versión 12.3 (Systat Software, Inc.). Se calcularon los estadísticos descriptivos para cada grupo de estudio y las concentraciones de AGEs circulantes encontradas fueron comparadas usando pruebas no paramétricas. Los tres grupos se compararon mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de una comparación por parejas por el método de Dunn.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El presente trabajo experimental describe el desarrollo de un ensayo inmunoenzimático de competición tipo ELISA para medir AGEs circulantes en muestras de sueros, los cuales podrían ser un excelente indicador del estado de control glicémico a largo plazo y del daño acumulado en los tejidos de los pacientes diabéticos. El desarrollo de este nuevo método para medir AGEs comenzó con la producción y caracterización de los reactivos primarios y secundarios, entre ellos el antígeno y los anticuerpos; seguido de la normalización y la validación analítica y clínica del inmunoensayo enzimático. A continuación se describen los resultados obtenidos durante las etapas de desarrollo del ELISA.

Preparación del antígeno AGE-BSA

En la **figura 9** y **cuadro 3** se muestran los resultados correspondientes a la cinética de formación del AGE – BSA, los cuales fueron obtenidos mediante la medición de la fluorescencia de las alícuotas muestreadas semanalmente, durante el periodo de incubación de la mezcla de reacción. Como se puede observar, a medida que transcurre el tiempo de incubación se produce un incremento en la intensidad de la fluorescencia emitida, apreciándose que cerca de la semana 14 se alcanza el máximo de fluorescencia; lo cual concuerda con otros lotes preparados previamente en el Departamento de Biología de la Reproducción. Por lo que transcurridas las 14 semanas de incubación, la solución de AGE-BSA fue reducida para estabilizar las bases de Schiff formadas y permitir la completa formación de los productos finales de glicación avanzada.

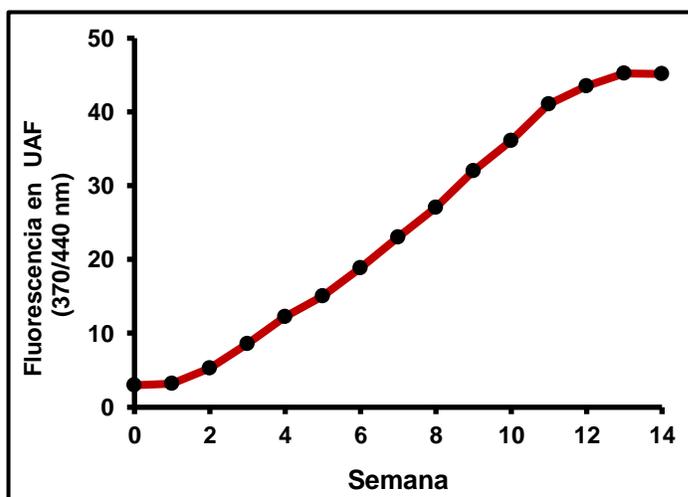


Figura 9. Cinética de formación de AGEs. Muestras leídas a una dilución 1/50. **UAF:** Unidades Arbitrarias de Fluorescencia.

Cuadro 3. Cinética de Formación de AGEs

Semana	Fluorescencia en UAF
0	2.96
1	3.15
2	5.26
3	8.58
4	12.24
5	15.05
6	18.83
7	23.02
8	27.06
9	32.04
10	36.10
11	41.05
12	43.50
13	45.20
14	45.16

La mezcla de reacción una vez reducida, fue dializada extensivamente contra buffer fosfato de sodio 20 mM, pH 7.1. Con este paso se eliminó aquellos compuestos de bajo peso molecular presentes en la mezcla, como la glucosa y el borohidruro de sodio sin reaccionar, y aquellos compuestos secundarios formados durante el proceso de reacción. Así mismo, el proceso de diálisis se empleó para equilibrar el medio, hacia el necesario, para llevar a cabo el siguiente paso en la purificación del AGE-BSA. Al cuantificar la concentración de proteína por Lowry se obtuvo un resultado de 35.15 mg de BSA por mililitro de solución.

Seguidamente se realizó el proceso de purificación del AGE-BSA, con el objetivo de eliminar la BSA que fue menos glicada durante el periodo de incubación, y de esta forma conseguir un antígeno con mayor actividad específica y por tanto más inmunogénico. Para ello se utilizó la tecnología de Affi-Gel Blue (BIO RAD), el cual es un gel particulado de agarosa, que tiene unido covalentemente el colorante Cibacron Blue F3GA, el cual posee una alta afinidad por la BSA nativa.³³ Por lo tanto resulta muy útil para separar la BSA que ha sido altamente modificada por el proceso de glicación, y que por consiguiente ha perdido su afinidad por la matriz, de aquella BSA que aún conserva su afinidad por la matriz, por haber sido poco modificada estructuralmente.

Previo a la purificación mediante esta matriz de afinidad, se evaluó el proceso de elución y se determinó la capacidad máxima de unión de la columna de Affi-Gel Blue. El cromatograma obtenido se muestra en la **figura 10**. Como se puede apreciar en el cromatograma, se obtuvieron tres picos, correspondientes a los buffers empleados. El primer pico corresponde a la BSA en exceso que no se unió a la matriz, por estar está completamente saturada de proteína, y que es eluida por el buffer de lavado. El pico 2 corresponde a la BSA unida con fuerza moderada y que para su elución es necesario un aumento en la fuerza iónica del buffer. Finalmente, el pico 3 corresponde a la fracción de albumina fuertemente unida a la matriz y que para su elución es necesario el empleo de un agente caotrópico en el buffer, como lo es la guanidina.

De los 1000 mg de BSA aplicados a la columna, se recuperaron 296.5 mg de proteína en el pico 2 y 164.7 mg en el pico 3; la sumatoria de estas dos cantidades de proteína (461.2 mg de BSA) corresponde a la capacidad máxima de unión de la matriz. Esto nos permitió establecer que en cada proceso de purificación no se debe de aplicar en la columna más de 460 mg de proteína (por si esta no está bien glicada). Además como se puede observar, con el proceso de elución empleado se obtiene una buena resolución de los 3 picos.

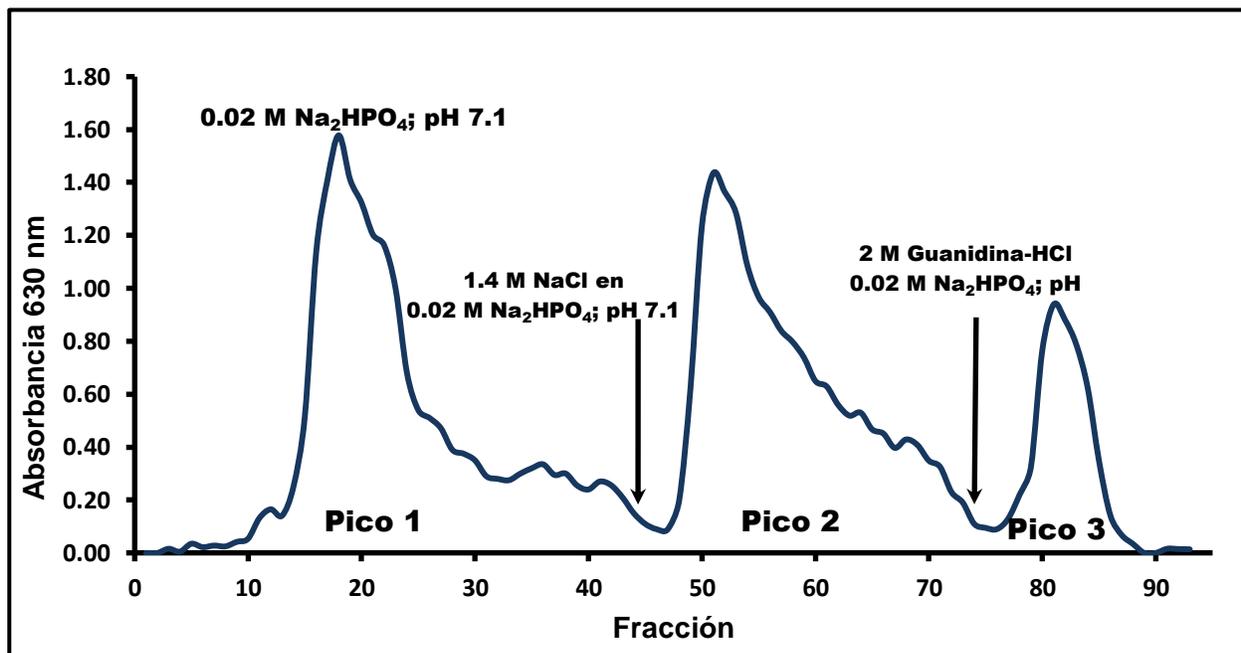


Figura 10. Determinación de la capacidad de unión del Affi-Gel Blue. Se aplicaron a la columna cromatográfica 1000 mg de BSA, de la cual se recuperó 296.5 mg de proteína en el pico 2 y 164.7 mg en el pico 3. La capacidad de unión de la matriz (sumatoria de proteína en los picos 2 y 3) fue por lo tanto de 461.2 mg de BSA.

La **figura 11** muestra los cromatogramas obtenidos en el proceso de purificación del AGE-BSA sintetizado, mediante la columna de Affi-Gel Blue; donde se aprecia una buena resolución de los picos. Para no saturar la columna (en caso de que toda la BSA estuviese sin glicar) se aplicó 150 mg de proteína, de la cual la mayor cantidad de proteína corresponde a la BSA altamente glicada (134.2 mg; pico 1), que al ser modificada estructuralmente, pierde su afinidad por la matriz y es por tanto eluida con el buffer de lavado. El pico 2 corresponde a la BSA que ha sido modificada ligeramente (1.1 mg) y que tiene afinidad moderada por la matriz, mientras que el pico 3 corresponde a la albumina sin glicar que mantiene su afinidad por el colorante (13.2 mg). El proceso de purificación también fue evaluado a través de la medición de fluorescencia, con un cromatograma resultante similar al de proteína; en este puede observarse como el pico uno, donde se encuentra la fracción altamente glicada, presencia la mayor fluorescencia con respecto a las otras dos fracciones.

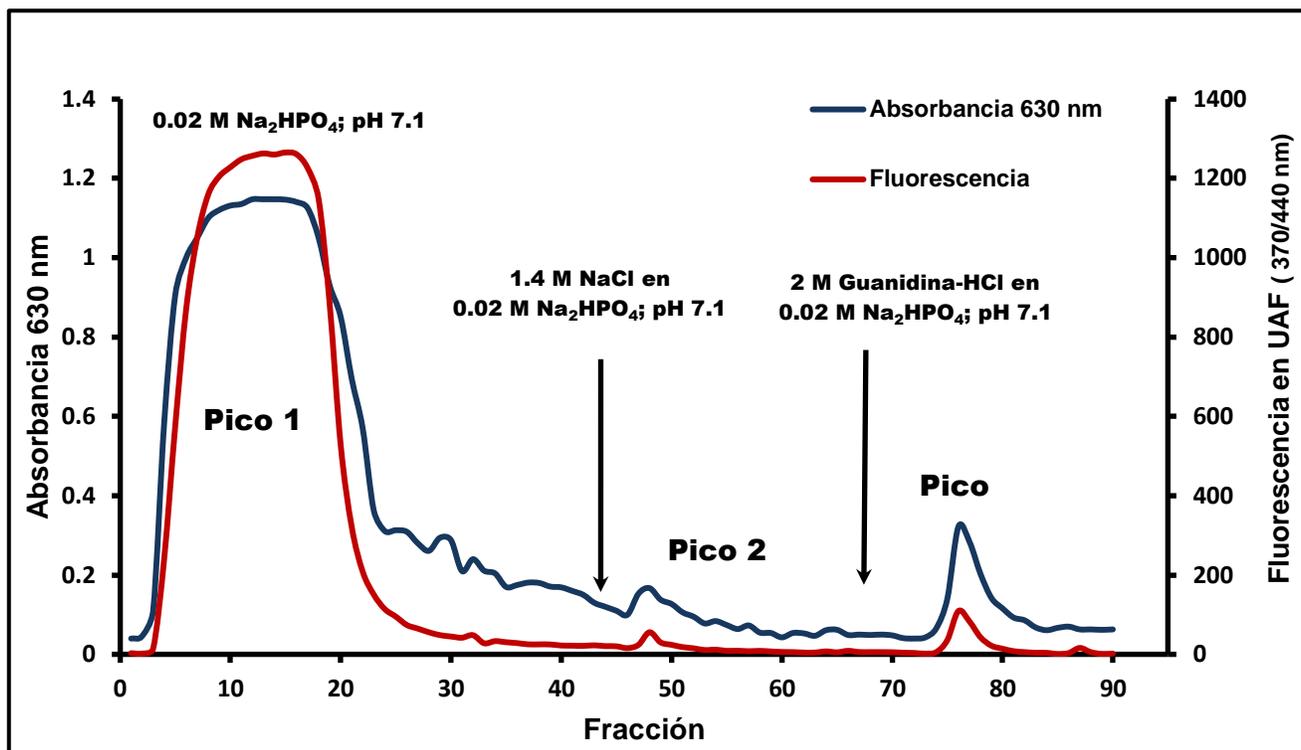


Figura 11. Purificación del AGE-BSA en Affi-Gel Blue. Se aplicó a la columna cromatográfica 150 mg de proteína, de la cual se recuperó 134.2 mg en el pico 1, 1.1 mg en el pico 2 y 13.2 mg en el pico 3.

La **figura 12** muestra los resultados obtenidos al realizar el seguimiento de las diferentes etapas del proceso de síntesis y purificación del AGE-BSA, mediante la medición de la Actividad Específica; así como su comparación con un control negativo de BSA incubado bajo las mismas condiciones que el AGE-BSA. Al analizar el control negativo se puede ver que es necesaria la presencia de glucosa en la mezcla de reacción para que se puedan formar los AGEs mediante reacciones no enzimáticas, la sola incubación de proteína a 37 °C, no favorece la formación de estos compuestos, razón por la cual la fluorescencia del control negativo es significativamente baja. Por el contrario, la mezcla que contiene proteína y glucosa al cabo de las 14 semanas de incubación presenta una alta fluorescencia. Mediante esto y a través del seguimiento de la formación de AGEs se pudo comprobar que la fluorescencia es una propiedad característica de la formación de AGEs y que es dependiente de la presencia de glucosa y del tiempo de reacción.

Se puede apreciar además que la reducción con borohidruro de sodio produjo un aumento del 41% en la actividad específica, debido a que el borohidruro estabiliza las bases de Schiff y permite la completa formación de los AGEs. La reducción química más la purificación mediante Affi-Gel Blue (donde se elimina la proteína menos glicada), provocó un aumento del 97% en la actividad específica con respecto al AGE no reducido y no purificado.

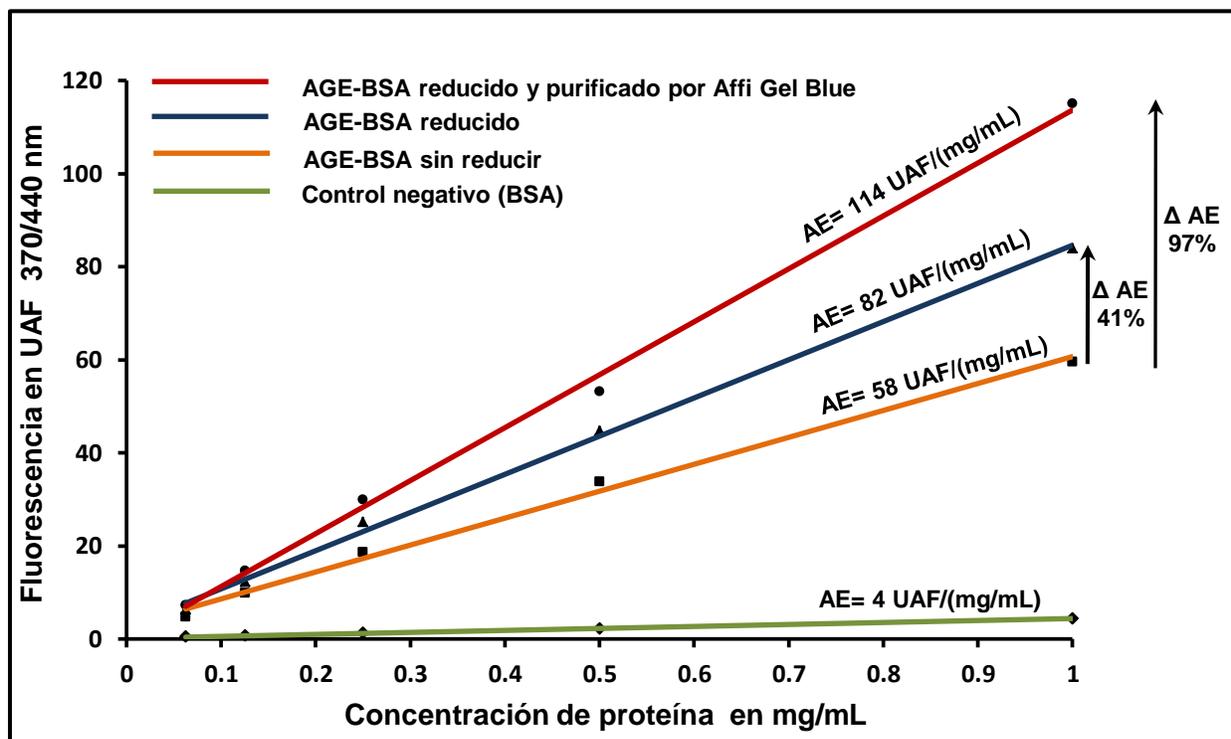


Figura 12. Incremento de la Actividad Específica (AE) del AGE-BSA a lo largo del proceso de síntesis y purificación. UAF: Unidades Arbitrarias de Fluorescencia.

Finalmente, mediante Lowry se determinó que el AGE-BSA sintetizado y purificado posee una concentración de 3.2 mg/mL de proteína y una actividad específica medida por RIA de 112 UAF/(mg/mL), muy similar a la obtenida al medir directamente la fluorescencia, que fue de 114 UAF/(mg/mL) (**Figura 12**).

Producción del suero hiperinmune anti AGE-BSA

Para monitorear el progreso de la respuesta inmune de los animales en cada etapa del protocolo de inmunización, se determinó los títulos de anticuerpos de los sueros obtenidos antes y después de cada inmunización. En la **figura 13** se puede observar que los títulos aumentan lo suficiente y se mantienen después de la cuarta inmunización, por lo que en el día 105 se administró el último refuerzo y 15 días posteriores a este, se realizó el sangrado total de los animales por punción cardiaca.

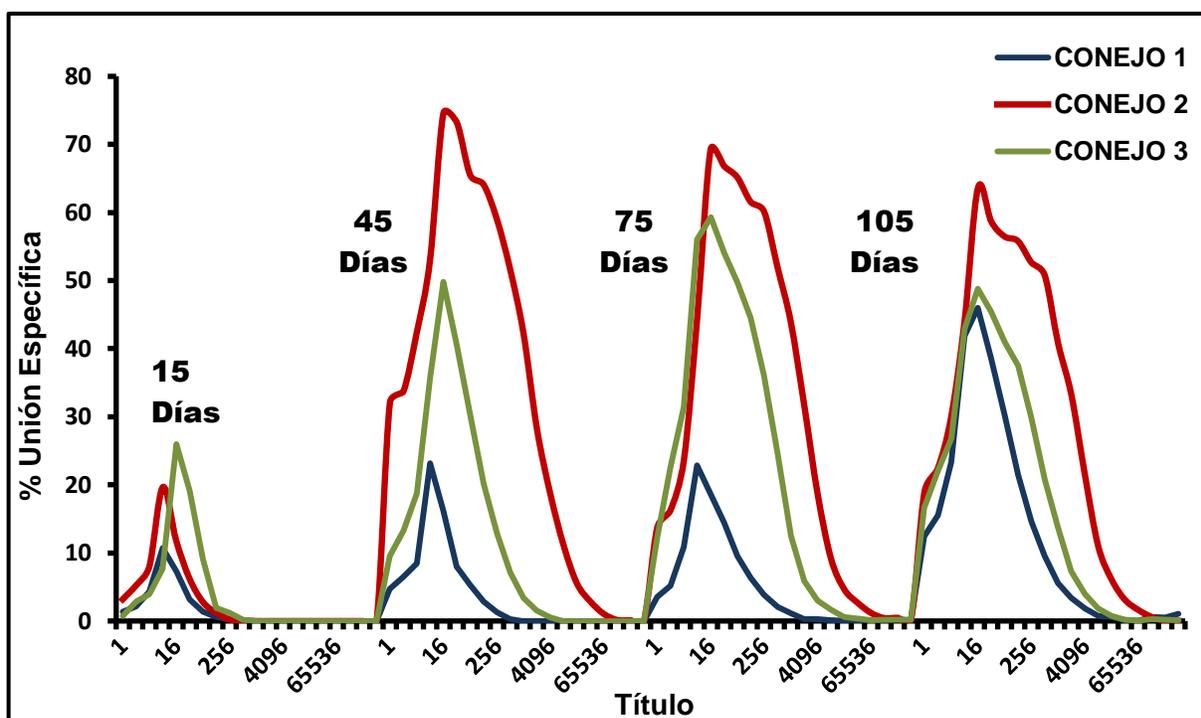


Figura 13. Título de los antisueros anti-AGE.

Purificación de los anticuerpos policlonales anti-AGEs por cromatografía de inmunoafinidad

Los anticuerpos policlonales específicos anti-AGEs del suero hiperinmune se purificaron mediante cromatografía de inmunoafinidad empleando la matriz Affi-Gel 102-AGE-BSA. Previa a ello, los anticuerpos generados contra la matriz proteica de BSA que se encontraban presentes en el suero hiperinmune se eliminaron mediante la adición de BSA para generar macrocomplejos inmunes, los cuales fueron separados mediante centrifugación y filtración.

La matriz de afinidad empleada (Affi-Gel 102-AGE-BSA) se sintetizó según el procedimiento propuesto por el fabricante (BIO RAD).³⁴ De los 192 mg de AGE-BSA que se hicieron reaccionar con 20 mL de Affi-Gel 102, se recuperaron 85.83 mg durante el lavado de la columna, por lo que sólo 106.2 mg de AGE-BSA fueron los que se unieron a la matriz.

En la **figura 14** se presenta el cromatograma obtenido en el proceso de purificación de los anticuerpos anti-AGEs. Se aplicó en la columna cromatográfica 100 mL de suero hiperinmune, diluido con 200 mL de buffer tris 0.1 M, pH 7.4 (para equilibrar las condiciones de fuerza iónica y pH) y se lavó la columna con dicho buffer, para eliminar la proteína no unida; este volumen no fue fraccionado por lo que en el cromatograma no se aprecia el pico 1. Posteriormente se aplicó el buffer glicina pH 3, para eluir los anticuerpos cuyas interacciones con la matriz fueron sensibles al pH ácido (pico 2) y finalmente se aplicó el buffer trietanolamina pH 11 para eluir los anticuerpos cuyas interacciones con la matriz fueron sensibles al pH básico (pico 3). Estos dos picos (2 y 3) se mezclaron, y se concentró y dializó contra buffer fosfato de sodio 20 mM, pH 7.1. Se obtuvo finalmente 21.6 mg de anticuerpos los cuales fueron empleados para la síntesis del conjugado con peroxidasa de rábano picante. Se puede ver, mediante el cromatograma, que con el empleo de este sistema de elución se logra una buena resolución de los picos.

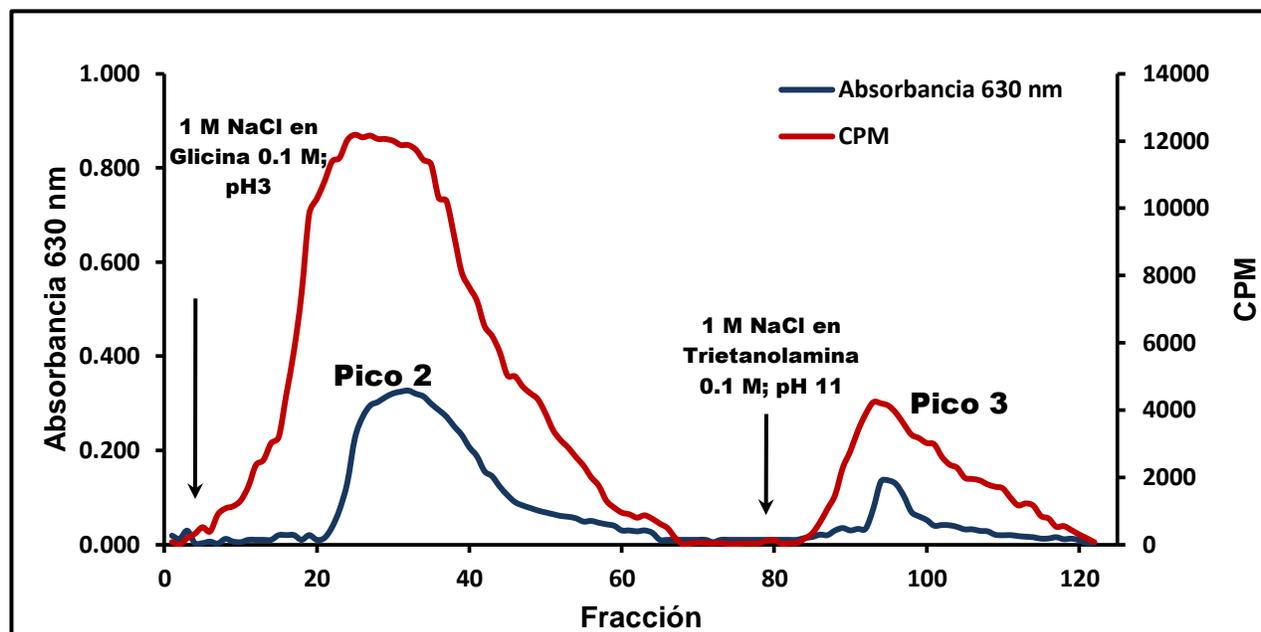


Figura 14. Purificación de Ab anti-AGEs mediante cromatografía en Affi-Gel 102-AGE-BSA. Se aplicó a la columna cromatográfica 100 mL de suero hiperinmune libre de anticuerpos anti-BSA, diluidos 1:3 con buffer tris 0.1 M, pH 7.4. De estos 100 mL de suero se obtuvo 21.6 mg de anticuerpos anti-AGEs.

Síntesis del conjugado enzimático

Los anticuerpos policlonales anti-AGEs purificados se acoplaron con peroxidasa de rábano picante para sintetizar el conjugado enzimático, empleándose el método del peryodato de sodio. La enzima una vez activada por el peryodato de sodio, se hizo reaccionar con los anticuerpos para formar bases de Schiff, las cuales se estabilizaron con borohidruro de sodio. Transcurrida la reacción de acoplamiento, el conjugado se dializó utilizando las unidades de filtración por centrifugación. El conjugado sintetizado, y dializado se diluyó 1:2 con glicerol para su conservación a -20 °C. Se obtuvo un volumen final de 50 mL, que implica una dilución de 20 veces del volumen de reacción inicial.

Normalización del ensayo

Una vez preparados los inmunoreactantes se procedió a normalizar el ensayo. El método diseñado para la cuantificación de AGEs sigue el principio básico de los ELISAs competitivos, donde existe competencia entre el antígeno unido a la placa y el presente en las muestras, por los sitios de unión del anticuerpo. La cantidad de inmunocomplejos formados entre el anticuerpo y el AGE-BSA fijado a la placa, es inversamente proporcional a la concentración del AGE presente en la muestra. Cuando el sistema alcanza el equilibrio químico, los inmunocomplejos no fijados a la placa y el analito libre se eliminan con una etapa de lavado, finalmente los inmunocomplejos unidos a la placa se detectan a través de la actividad catalítica de la peroxidasa unida al anticuerpo sobre un sustrato cromógeno adicionado. La cuantificación de los AGEs circulantes se logra por comparación de la señal producida por cada muestra problema con las señales obtenidas de la curva dosis-respuesta del ensayo.

La concentración óptima del recubrimiento con AGE-BSA y la dilución de trabajo del conjugado enzimático se determinó por titulación. Se decidió recubrir las placas de ELISA con una concentración de 10 µg/mL de AGE-BSA y utilizar una dilución de 1:70 para el conjugado enzimático ($1:70 \times 20$ (dilución previa) = 1:1400 dilución final de trabajo del conjugado), ya que como puede observarse en la **figura 15**, bajo estas condiciones se consigue una absorbancia entre 1 y 1.5. Con otros pares de concentraciones también se consigue una absorbancia cercana a 1.5, sin embargo debido a que el conjugado se debe emplear más concentrado, se decidió no utilizar estas combinaciones, pues el conjugado es el reactivo más costoso.

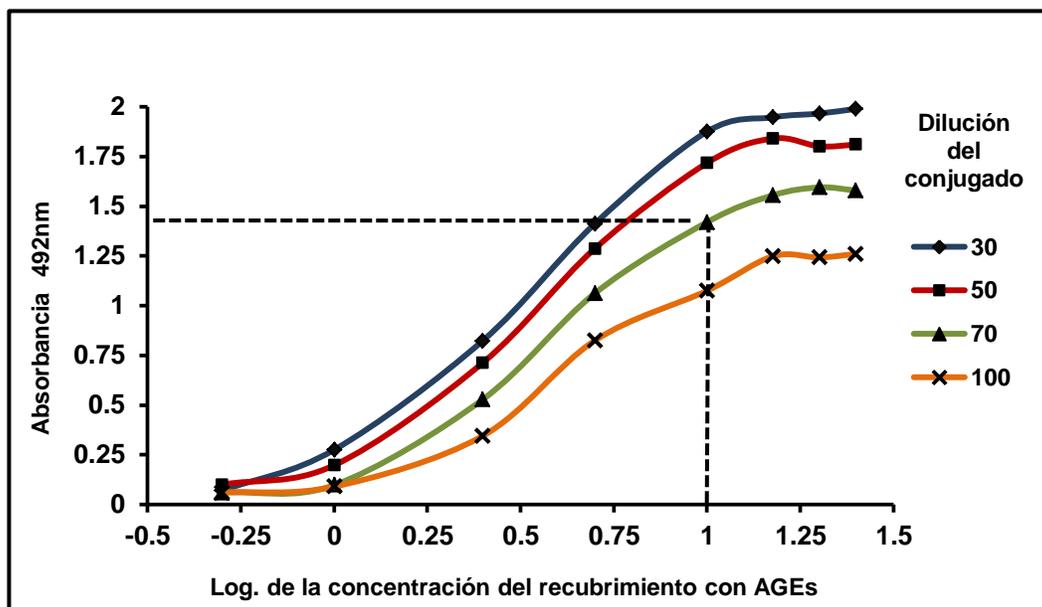


Figura 15. Titulación de los inmunoreactantes del ELISA de AGEs

Después de evaluar diversas condiciones de ensayo como temperatura, tiempos de incubación, buffers, etc. se encontró que las condiciones idóneas son las que se mencionan en la sección de material y método de este trabajo. La curva de calibrado del método, se estableció con cinco concentraciones que van desde 69 hasta 5589 mU/mL de AGEs; además se decidió introducir en el ensayo dos controles internos de calidad con concentraciones de 224 y 1120 mU/mL, los cuales también fueron empleados para la evaluación del parámetro de precisión durante la validación del método.

Validación del ensayo

Los inmunoensayos empleados en estudios clínicos requieren de una adecuada consistencia en sus resultados. La apropiada estandarización del ensayo analítico, seguida de su validación analítica y clínica, son elementos imprescindibles para alcanzar óptimos resultados. A continuación se presentan los resultados obtenidos durante la evaluación de los diferentes parámetros estudiados en la validación del método.

A. Estudio de la linealidad

En el estudio de linealidad realizado se analizaron por quintuplicado 5 niveles de concentración de AGEs (69, 207, 621, 1863 y 5589 mU/mL), los resultados obtenidos (**cuadro 4**) se analizaron empleando el modelo logístico para obtener la línea y la

ecuación de regresión que se muestran en la **figura 16**. Se obtuvo un coeficiente de determinación (r^2) igual a 0.995, el cual fue mayor al criterio de aceptación establecido (0.98). Se pudo establecer que el ensayo tiene valor diagnóstico en un rango de concentraciones de 69 a 5589 mU de AGEs/mL, donde existe una relación inversamente proporcional entre la concentración de AGE y la respuesta medida.

Cuadro 4. Linealidad de la curva estándar del ELISA de AGEs

Concentración del estándar (mU/mL)	Absorbancia promedio (n=5)	Desviación estándar (n=5)	Coefficiente de variación (n=5)	Logaritmo de la concentración del estándar	Logit $\text{Log} [(B/B_0)/(1-(B/B_0))]$
0	1.040	0.044	4.3		
69	0.885	0.050	5.7	1.839	0.755
207	0.682	0.066	9.6	2.316	0.280
621	0.437	0.020	4.6	2.793	-0.140
1863	0.272	0.027	9.9	3.270	-0.451
5589	0.125	0.012	9.8	3.747	-0.865

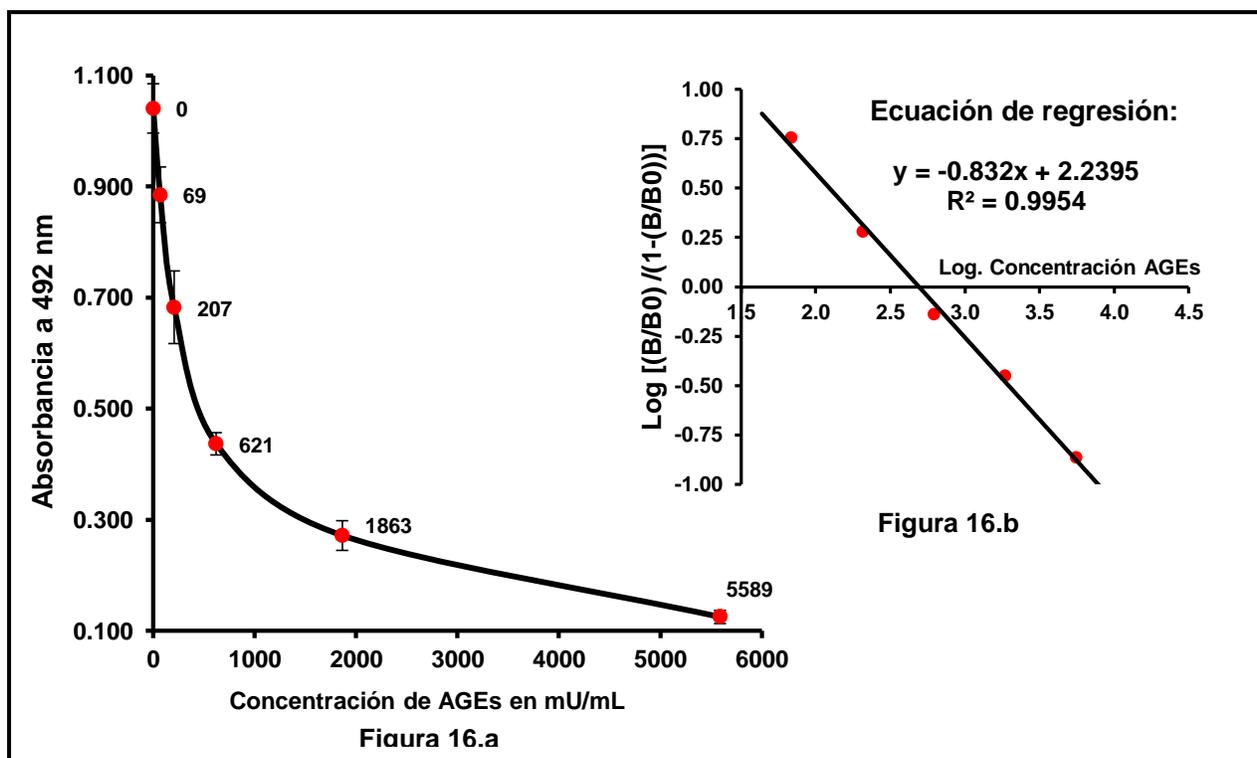


Figura 16. Linealidad de la curva estándar del ELISA de AGEs. La **figura 16.a** muestra el gráfico obtenido al graficar directamente la concentración de cada estándar contra su absorbancia. La **figura 16.b** muestra el gráfico obtenido una vez linealizada la curva estándar empleando el modelo matemático logístico. Valor de la pendiente = -0.832, intersección = 2.239, coeficiente de determinación = 0.995.

B. Determinación del límite de detección

Para determinar este parámetro se realizaron 30 repeticiones del blanco reactivo, se calculó la media de las absorbancias obtenidas y a dicho valor se le restaron 2 desviaciones estándar (**cuadro 5**). El Logit del valor obtenido se interpola en la curva dosis-respuesta obtenida del procesamiento de los estándares (**figura 17**), obteniéndose así un resultado de 24 mU/mL de AGEs.

Cuadro 5. Determinación del límite de detección del ELISA de AGEs

Curva estándar					
Concentración del estándar (mU/mL)	Absorbancia promedio (n=2)	Log. Estándar	Logit		
0	1.203				
69	1.077	1.839	0.934		
207	0.855	2.316	0.391		
621	0.643	2.793	0.060		
1863	0.436	3.270	-0.246		
5589	0.196	3.747	-0.711		
Análisis de los blancos					
Absorbancia promedio (n=30)	Desviación estándar (n=30)	Promedio - 2 desviaciones estándar	Logit	Log. De la concentración al interpolar el valor del Logit.	Límite de detección (aplicando antilogaritmo)
1.1833	0.0225	1.1383	1.249	1.379	24 mU/mL

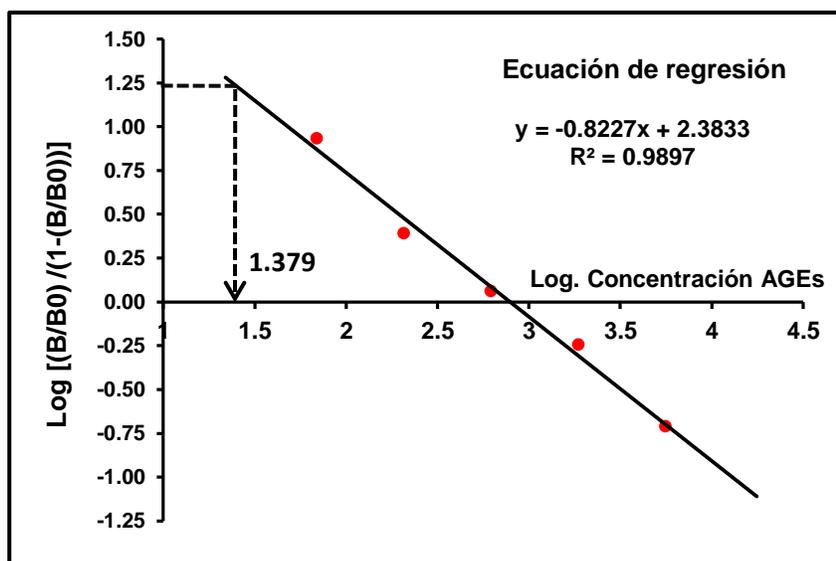


Figura 17. Determinación del límite de detección. Una vez calculado el Logit de la media menos 2 desviaciones estándar de la absorbancia de los blancos ensayados, el valor se interpoló en la línea de regresión obteniéndose un resultado de **1.379**, el cual corresponde al logaritmo del límite de detección (24 mU/mL).

C. Evaluación de la precisión

La precisión se evaluó a través de la repetibilidad y la precisión intermedia al ensayar 2 muestras controles con concentraciones de AGEs conocidos. Como puede apreciarse en el **cuadro 6** los coeficientes de variación obtenidos tanto para la repetibilidad como la precisión intermedia fueron en general algo mayores al 10%, pero menores al 20%, en ambos niveles de concentración evaluados. Esto nos permite afirmar que el ensayo presenta una adecuada capacidad para reproducir el valor esperado cuando el análisis se realiza a concentraciones diferentes y en días diferentes.

Cuadro 6. Determinación de la precisión del ELISA de AGEs

	Día 1		Día 2		Día 3		Precisión Intermedia
	Concentración mU/mL	Promedio (n=10)	Concentración mU/mL	Promedio (n=10)	Concentración mU/mL	Promedio (n=10)	Promedio (n=30)
Control 1	229	239	218	214	211	212	222
	260		237		246		
	232		213		258		
	257	Des. Est.	235	Des. Est.	222	Des. Est.	Des. Est.
	188	26.7	186	30.4	153	29.7	30.6
	236		180		216		
	260	CV	224	CV	181	CV	CV
	258	11.2	273	14.2	217	14.0	13.7
	267		202		204		
	203		173		216		
Control 2	Concentración mU/mL	Promedio	Concentración mU/mL	Promedio	Concentración mU/mL	Promedio	Promedio (n=30)
	989	1071	1059	1149	1123	1148	1122
	1051		1408		1192		
	942		964		1167		
	1052	Des. Est.	1011	Des. Est.	984	Des. Est.	Des. Est.
	937	95.6	1191	124	1015	152	127
	1125		1177		1292		
	1080	CV	1202	CV	1451	CV	CV
	1204	8.9	1134	10.8	1195	13.2	11.3
	1135		1209		1124		
1195	1130		936				

Valor teórico esperado CC1: 224 mU/mL, CC2: 1120 mU/mL

D. Evaluación de la exactitud

La exactitud del método se estudió mediante la realización de ensayos de paralelismo. Se emplearon cuatro muestras de sueros a las cuales se les realizó cuatro diluciones seriadas 1:2, y se les analizó por ELISA de AGEs. Como puede observarse en el **cuadro 7** los coeficientes de variación obtenidos para las concentraciones de AGEs de cada muestra, son en su mayoría menores al CV de la precisión del ensayo (11.3%),

con excepción de la muestra 2 que fue ligeramente superior. Los resultados obtenidos indican que el método desarrollado es exacto y que por tanto permite medir la concentración real de AGEs circulantes presentes en las muestras, dentro del error experimental.

Cuadro 7. Evaluación de la exactitud del método a través de ensayos de paralelismo

Muestra	Dilución	AGEs medidos (mU/mL)	AGEs (mU/mL) x dilución	Concentración promedio de AGEs y CV
Muestra 1	1	917	917	825 mU/mL CV: 10.9%
	2	359	718	
	4	197	788	
	8	110	880	
Muestra 2	1	1048	1048	887 mU/mL CV: 12.9%
	2	442	884	
	4	208	832	
	8	98	784	
Muestra 3	1	1038	1038	982 mU/mL CV: 7.6%
	2	475	950	
	4	223	892	
	8	131	1048	
Muestra 4	1	1009	985	863 mU/mL CV: 10.6%
	2	407	814	
	4	194	776	
	8	111	878	

Estudio del desempeño del método

Como ya se ha mencionado en el planteamiento del problema de este trabajo de investigación, el Departamento de Biología de la Reproducción del INCMNSZ cuenta con un radioinmunoanálisis específico para medir AGEs en suero, mediante el cual ha obtenido resultados preliminares muy alentadores, ya que ha sido posible mediante su uso, encontrar una diferencia en la concentración de AGEs entre individuos no diabéticos y diabéticos. Por lo cual en la última parte de este proyecto se evaluó la capacidad del método de ELISA desarrollado, para diferenciar entre las concentraciones de AGEs presentes en individuos sanos y pacientes diabéticos sin y con complicaciones de la enfermedad; todo ello con el fin de asegurar que el método es adecuado para ser empleado en estudios posteriores en donde se evaluara la relación entre las concentraciones circulantes de AGEs y el grado de complicación de los pacientes diabéticos, con el objetivo de establecer valores de corte a los que se asocian las complicaciones crónicas de la diabetes. Para ello se analizaron, sueros procedentes de tres grupos de estudios (grupo control, grupo diabético sin complicaciones y grupo con nefropatía diabética).

En la **figura 18** se puede observar que los valores obtenidos de los individuos controles son muy cercanos entre sí, mientras que los valores de los pacientes con diabetes y nefropatía tienen una mayor dispersión, probablemente asociada al nivel de daño y/o al tiempo de evolución de la enfermedad.

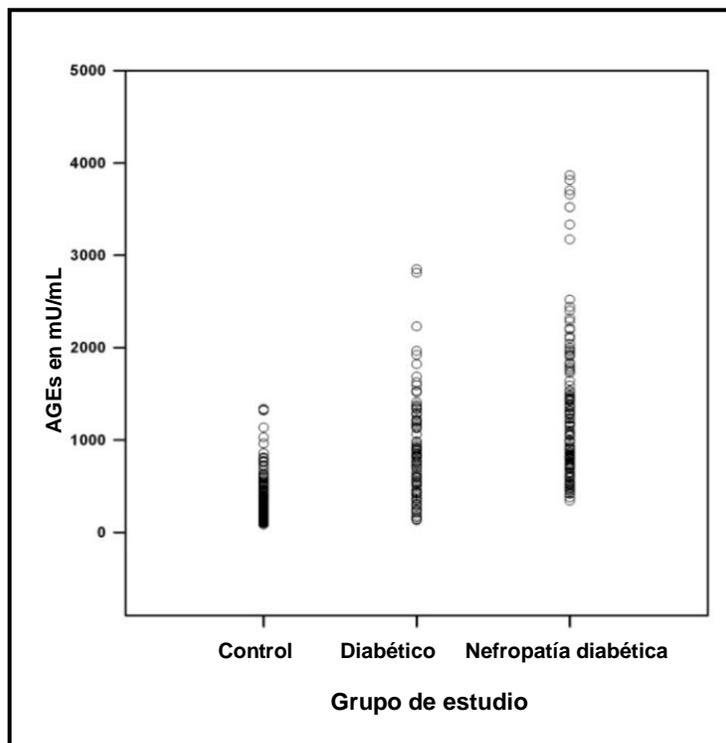


Figura 18. Concentraciones de AGEs circulantes halladas en cada grupo de estudio, empleando el métodos de ELISA desarrollado.

Como puede observarse en el **cuadro 8**, los niveles de AGEs circulantes en los sueros de pacientes diabéticos sin y con complicaciones están incrementados en comparación con el grupo control, siendo aún mayores en los pacientes con nefropatía diabética. La prueba de Kolmogorov –Smirnov demostró que las concentraciones de AGEs presentan una distribución no normal (**cuadro 9**). Se corrobora, mediante el análisis de varianza de Kruskal-Wallis y el método de Dunn, que los resultados obtenidos muestran diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.001$) entre los 3 grupos (**cuadro 10**).

Los resultados anteriores indican que el método analítico desarrollado permite evaluar muestras de individuos sanos y enfermos, siendo capaz de detectar diferencias entre las concentraciones circulantes de AGEs entre los distintos estados metabólicos asociados al estado de control glicémico y a la presencia o no de complicaciones crónicas como la nefropatía diabética.

Cuadro 8. Análisis descriptivo de las concentraciones de AGEs circulantes halladas en cada grupo de estudio, empleando el ELISA desarrollado.

	Grupo Control (N=170)	Grupo Diabético (N=100)	Grupo con nefropatía diabética (n=139)
Promedio	365	891	1260
Desviación estándar	235	540	775
Mediana	317	817	1043
Percentil 25%	210	510	704
Percentil 75%	435	1172	1518

Los resultados están dados en mU de AGEs/mL

Cuadro 9. Test de normalidad de Kolmogorov - Smirnov ($\alpha = 0.05$)

	Grupo Control	Grupo Diabético	Grupo con nefropatía diabética
Estadístico	0.171	0.106	0.135
Valor P	<0.001	0.008	<0.001

Valores de P menores a 0.05 indican un comportamiento no normal.

Cuadro 10. Análisis de varianza por rangos de Kruskal-Wallis ($\alpha = 0.05$)

Estadístico H	199.771		
Grados de libertad	2		
Valor de P	<0.001		
Comparación múltiple por parejas (método de Dunn)			
Comparación	Diferencia de rangos	Valor Q	P<0.05
Control vs Nefrópatas	185.106	13.693	Si
Diabéticos vs Nefrópatas	54.214	3.498	Si
Control vs Diabéticos	130.892	8.786	Si

Valores de P menores a 0.05 indican que existe diferencia estadísticamente significativa entre los resultados de los grupos comparados.

8. CONCLUSIÓN

A través de métodos definidos, reproducibles y accesibles, para la producción de reactivos biológicos, se logró desarrollar un ensayo de ELISA de tipo competitivo para la cuantificación de productos finales de glicación avanzada. Se demostró, a través de la validación analítica y clínica, que el método cumple satisfactoriamente con el propósito para el cual fue desarrollado.

El empleo del ensayo inmunoenzimático desarrollado (ELISA) en condiciones reales de trabajo, permitió obtener resultados preliminares muy alentadores, pues fue posible encontrar diferencias en las concentraciones de AGEs circulantes entre personas que no padecen diabetes y aquellas que si la padecen. Por lo que se puede concluir que la metodología analítica desarrollada en este trabajo, constituye una herramienta valiosa que permitirá estudiar más a detalle el papel de los AGEs en la etiopatología de las complicaciones crónicas de la diabetes. Así mismo pudiera contribuir al diagnóstico preventivo de la aparición de las mismas, al mejoramiento de la calidad de vida en general de los pacientes que sufren de esta enfermedad, al favorecer la aplicación de tratamientos oportunos para controlar el estado metabólico de estos pacientes, y de esta forma evitar las complicaciones crónicas que conllevan a gastos excesivos de tratamientos e intervenciones clínicas tales como la hemodiálisis y/o el trasplante de riñones, mismo que no están al alcance económico y de cobertura médica de la mayoría de los mexicanos.

9. ANEXOS

I. Radioinmunoanálisis para la cuantificación de AGEs

Principio del método

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

Reactivos

- a. **Buffer de ensayo (estándar A).** PBS pH 7.4 conteniendo 25 mM de EDTA, 0.05 % de timerosal, 1% de BSA.
- b. **Anticuerpo primario.** Anticuerpo anti-AGE (producidos en conejo y purificado por cromatografía de afinidad) diluido 1/7000 en buffer de ensayo. Contiene colorante artificial azul 0.1%.
- c. **AGE-BSA marcada con I^{125} .** El AGE-BSA - I^{125} esta disuelto en buffer de ensayo ajustándose la marca a 20 000 CPM, conteniendo 1% de suero normal de conejo y colorante artificial rojo al 0.1%.
- d. **Estándares de AGEs.** AGE-BSA sintetizado y altamente purificado disuelto en buffer de ensayo en las siguientes concentraciones: 300, 600, 1200, 2400, 4800, 9600 y 19200 μ U/mL (0.97, 1.94, 3.88, 7.76, 15.5, 31.0 y 62.0 ng/mL). Contiene colorante artificial amarillo 0.1%.
- e. **Controles internos de calidad.** AGE-BSA altamente purificado disuelto en buffer de ensayo en las siguientes concentraciones:
Control I: 1000 μ U/mL
Control II: 5000 μ U/mL

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

Material requerido

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

Procedimiento

1er Día

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

2do Día

8. Agitar manualmente el reactivo de precipitación.
9. Pipetear 200 μ L del reactivo de precipitación a todos los tubos excepto los totales (1-2).
10. Agitar bien todos los tubos en vortex, excepto los totales (1-2).
11. Incubar a temperatura ambiente durante 1 hora.
12. Centrifugar todos los tubos excepto los totales (1-2) durante 30 minutos a 3000 rpm, a 4 °C en centrifuga refrigerada.

13. Decantar el sobrenadante, dejar volteados los tubos sobre papel absorbente durante 5 minutos.
14. Secar los tubos hasta la mitad con hisopos de papel absorbente.
15. Contar todos los tubos durante 1 minutos en un contador de radiaciones gamma.

Calculo de resultados

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

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

5. Grafique y linealice el %UE contra la concentración de cada estándar para construir la curva estándar.
6. Determine la concentración de AGEs en las muestras problema y los controles por interpolación en la curva estándar (sustituyendo de la señal medida para las muestras problemas, en la ecuación de la curva dosis-respuesta de los estándares).

Variante A. RIA de AGEs para la determinación de título de antisuero.

Esta variante es empleada para realizar el seguimiento de la respuesta inmune en animales inmunizados contra AGE-BSA y para el seguimiento de los procesos de purificación de los anticuerpos anti-AGEs. Debido a que aquí lo que interesa es analizar la actividad de los anticuerpos presentes en los sueros inmunes y no la presencia de AGEs, las diluciones de los sueros inmunes a analizar se montan como si fueran uniones máximas y no es necesaria la comparación con una curva estándar. Solo se estiman las uniones específicas máximas.

Reactivos

- No se requiere del anticuerpo primario, los estándares, ni los controles internos de calidad.
- El buffer de ensayo y la marca se preparan igual que para la cuantificación de AGEs, con la excepción de que la **BSA al 1% se sustituye por gelatina al 0.1%**.

Material requerido

- El mismo que para la cuantificación de AGEs.

1er Día

1. Pipetear 200 μ L de buffer de ensayo a los tubos de las uniones no específicas (UNE) (3-4). Pipetear 100 μ L de buffer de ensayo a los tubos de las muestras (5-n...).
2. Pipetear 100 μ L de cada muestra (diluciones seriadas del suero hiperimmune) (5-n...).
3. Pipetear 100 μ L del marcador radiactivo a todos los tubos (1-n...).
4. Agitar bien todos los tubos excepto los totales (1-2) en un vortex.
5. Incubar a 4 °C de 18-24 horas (toda la noche).

2do Día

Se realiza igual que lo mencionado anteriormente para la cuantificación de AGEs.

Calculo de resultados

Calcular el % UE como ya se menciona anteriormente.

10. REFERENCIAS

1. Norma Oficial Mexicana NOM-015-SSA2-2010, Para la prevención, tratamiento y control de la Diabetes Mellitus. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el Martes 23 de Noviembre del 2010.
2. Bishop M, Fody E, Schoeff L. Clinical chemistry: techniques, principles, correlations. 6th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2010. pp. 309-327.
3. Fox S. Human physiology. 12th ed. New York: McGraw-Hill; 2011. p. 669-678.
4. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care 2010; 33 (suppl 1): S62 – S69.
5. Kumar V, Abbas A, Fausto N. Robbins y Cotran: Patología estructural y funcional. 7^a ed. España: Elsevier; 2005. pp. 1197-1210.
6. Rozman C. Farreras-Rozman: Medicina Interna. 13^a ed. Versión en CD-ROM. Elsevier. pp. 1933-1969.
7. Tébar F, Escobar F. La Diabetes Mellitus en la práctica clínica. Buenos Aires: Médica Panamericana, 2009. pp. 1-9.
8. Méndez J. Productos finales de glicación avanzada y complicaciones crónicas de la diabetes Mellitus. Gac Méd Mex 2003; 139 (1): 49-55.
9. Díaz M, Baiza L, Ibáñez M, et al. Aspectos moleculares del daño tisular inducido por la hiperglucemia crónica. Gac Méd Mex 2004; 140 (4): 437- 447.
10. Gugliucci A. Glycation as the glucose link to diabetic complications. JAOA 2000; 100 (10): 621-631.
11. Rodríguez J. Estudio de diferentes marcadores de glicación en las complicaciones crónicas de la Diabetes Mellitus (Tesis Doctoral). Santiago de Compostela: Universidad de Santiago de Compostela; 2009.
12. Cárdenas M, Díaz E, Sánchez P, et al. Glicación y entrecruzamiento de proteínas en la patogénesis de la diabetes y el envejecimiento. Revista de investigación clínica 2009; 61 (6): 505-520.
13. Sinhg R, Barden A, Mori T, Beilin L. Advanced glycation end products: a review. Diabetologia 2001; 44: 129-146.
14. Goldin A, Beckman J, Schmidt A, Creager M. Advanced Glycation End Products sparking the development of diabetic vascular injury. Circulation 2006; 114: 597-605.
15. Actis S, Rebolledo O. La glicación y glicoxidación de las lipoproteínas su importancia en la diabetes mellitus. MEDICINA (Buenos Aires) 2000; 60: 645-656.
16. Chard T. An introduction to radioimmunoassay and related techniques. 5th ed. Amsterdam: ELSEVIER; 1995.
17. Zambrano F, Díaz V. El radioinmunoanálisis y su control de calidad. México: Centro Nuclear de México “Nabor Carillo”; 1996.

18. Hernández C, Cure C y Hernández J. Fundamentos prácticos de la dosificación hormonal. Salud Uninorte 1988; 4-5 (3): 151-170.
19. Law B. Immunoassay a practical guide. UK: Taylor and Francis; 2005.
20. Kindt T, Goldsby R, y Osborne B. Inmunología de Kuby. 6ta ed. USA: McGraw-Hill Interamericana; 2007. pp. 154-158.
21. Margni R. Inmunología e inmunoquímica. 5ta ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 1996. pp. 799 -813.
22. Tijssen P. Practice and theory of enzyme immunoassays. Amsterdam: ELSEVIER; 1985.
23. Crowther J. The ELISA guidebook. 2nd ed. Humana Press; 2009.
24. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C. Guía de Validación de Métodos analíticos. México: El Instituto, 2002.
25. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for human Use. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). ICH, 2005.
26. Ochoa R. Técnicas inmonoenzimáticas para ensayos clínicos de vacunas y estudios inmunoepidemiológicos. La Habana: Finlay ediciones, 2012.
27. Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation. FDA, CDER, CVM, 2001.
28. International Diabetes Federation. Diabetes atlas. 5th ed. World Diabetes Foundation. 2011.
29. Secretaría de Salud México, subsecretaría de prevención y promoción de la salud. Programa de acción específico 2007-2012, diabetes mellitus. México DF: Secretaria de salud, 2008.
30. Secretaría de Salud México, Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Panorama epidemiológico y estadístico de la mortalidad en México 2009. México DF: Secretaría de Salud México, Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2011.
31. Ibarra E. Años de vida productiva perdidos por complicaciones crónicas de Diabetes mellitus en población económicamente activa (Tesis de Maestría). Nuevo león: Universidad Autónoma de Nuevo León Facultad de Salud Pública y Nutrición Subdirección de Estudios de Postgrado Maestría en Salud Pública, 2002.
32. Goh S, Cooper M. The role of Advanced Glycation End Products in progression and complications of diabetes. J Clin Endocrinol Metab 2008; 93 (4):1143–1152.
33. BIORAD. Affi Gel ® Blue Gel Instruction Manual. Catalog Number 153-7301. Bio-Rad Laboratories, 2000 Alfred Nobel Dr., Hercules, CA 94547
34. BIORAD. Immobilization Procedure for Affi-Gel® 102. Catalog Number 153-2401. Bio-Rad Laboratories, 2000 Alfred Nobel Dr., Hercules, CA 94547
35. Labeling antibodies. Periodate coupling. Antibodies a Laboratory Manual. Stockholm: Cold Spring Harbor Laboratory; 1988. p. 348.