

AGEs FLUORESCENTES EN PIEL ASOCIADOS A RIESGO CARDIOVASCULAR

Ramos-Hernández Karla Valeria (1), Luevano-Contreras Claudia (2)

1 [Departamento de Medicina y Nutrición, División de Ciencias de la Salud, Campus León, Universidad de Guanajuato]
|[e-mail: karlaramos1204@gmail.com]

2 [Departamento de Ciencias Médicas, División de Ciencias de la Salud, Campus León, Universidad de Guanajuato]
|[e-mail: claudialc11@gmail.com]

Resumen

Introducción: Los Productos Finales de Glicación Avanzada (AGEs) asociados con las complicaciones en la Diabetes Mellitus se pueden detectar en piel por Autofluorescencia (sAF). El objetivo del estudio fue evaluar la relación de sAF con el riesgo cardiovascular (RCV) en sujetos sanos. **Métodos:** Se reclutaron 30 adultos jóvenes (18-35 años), con peso normal, sin enfermedades crónicas, no fumadores y con bajo consumo de alcohol. Se evaluó su perfil metabólico (Glucosa, Perfil Lipídico), el RCV con el índice aterogénico y la Autofluorescencia en piel (sAF) con el dispositivo *AGE Reader*. **Resultados:** Los valores de sAF (1.64 ± 0.56 UA) clasificaron al 73.3% de los sujetos en los Grupo sin RCV, 20% en el Grupo con aumento de RCV y 6.6% en el Grupo con RCV definido. El índice aterogénico clasificó al 56.6% de nuestra población con RCV. Además, se encontró correlación significativa ($p < 0.05$) entre los valores de sAF con la edad ($r = 0.4$) y con los valores de colesterol ($r = 0.25$). **Conclusión:** Se encontró una relación entre el colesterol total y la edad con la medición de sAF, aunque no se encontró relación con el índice aterogénico. Se requieren más estudios que permitan demostrar los beneficios y limitaciones de sAF en población sana.

Abstract

Introduction: Advanced Glycation end-products are associated with complications in Diabetes Mellitus, and they can be detected by skin Autofluorescence (sAF). The aim of the study was to evaluate the relation of sAF to cardiovascular risk (CVR) in healthy subjects. **Methods:** 30 young adults (18-35 years old) were recruited, with normal weight, without chronic diseases, non-smoking and low alcohol consumption. Their metabolic profile (Glucose, Lipid Profile) was evaluated, CVR with the atherogenic index and skin Autofluorescence (sAF) with *AGE Reader* device. **Results:** The values of sAF (1.64 ± 0.56 AU) classified 73.3% of the subjects in the groups without CVR, 20% in the group with an increase in CVR and 6.6% in the group with a defined CVR. Atherogenic index classified 56.6% of our population with CVR. In addition, a significant correlation was found between sAF values with age ($r = 0.4$) and cholesterol values ($r = 0.25$). **Conclusion:** A relation between total cholesterol and age with sAF measurement was found, although no relation was found with atherogenic index. Further studies are needed to demonstrate benefits and limitations of sAF in healthy population.

Palabras Clave

Reacción de Maillard; Estrés Oxidativo; Autofluorescencia.

INTRODUCCIÓN

Los Productos Finales de Glicación Avanzada (AGEs) se definen como un amplio y heterogéneo grupo de compuestos resultado de la reacción no enzimática de azúcares reductores con grupos amino libres de moléculas tales como proteínas, lípidos y ácidos nucleicos; esta reacción es conocida como reacción de Maillard [1]. La acumulación de AGEs en el organismo influye tanto en el proceso de envejecimiento como en la progresión de enfermedades crónicas incluyendo Diabetes Mellitus y sus complicaciones, enfermedades cardiovasculares, Artritis Reumatoide, Osteoporosis y enfermedades neurodegenerativas que incluyen Alzheimer y Parkinson [1-2].

Formación de AGEs

La formación de AGEs ocurre tanto de manera endógena como exógena. La reacción de Maillard es la base de la formación de AGEs endógenos y presenta tres fases [3]. En la primera fase, el grupo carbonilo de un azúcar reductor interactúa de forma no enzimática con un aminoácido para formar un compuesto inestable llamado base de Schiff. Durante la segunda fase, esta base puede sufrir hidrolización y generar el azúcar y aminoácido originales o puede sufrir ciclación y reordenamientos adicionales que forman compuestos más estables denominados productos Amadori. En condiciones fisiológicas y no oxidativas, el 90% de estos productos pueden ser reversibles. Finalmente, en la tercera fase los productos Amadori pueden generar AGEs mediante la vía de escisión oxidativa en la cual se produce carboximetil-lisina (CML); o por la vía no oxidativa, donde se originan derivados de α -dicarbonilo los cuales pueden reaccionar con un aminoácido y formar CML u otros AGEs tales como pirralina, pentosidina o imidazolona [3].

Un pequeño porcentaje de AGEs se producen por la formación de compuestos de carbonilo reactivos, los cuales se forman rápidamente bajo estrés oxidativo [4].

La formación de AGEs exógenos encontrados en los alimentos involucra también la reacción de Maillard en la cual un aminoácido reacciona de

manera no enzimática con grupos carbonilo de azúcares reductores además de productos de degradación de carbohidratos, lípidos y ácido ascórbico [3]. Los alimentos ricos en grasa y proteína, cocinados a altas temperaturas y en seco aumentan fácilmente el contenido de AGEs *in vivo*. La CML es el compuesto que más se ha descrito tanto en los alimentos como *in vivo* [5].

La formación y acumulación de AGEs causan daño por dos vías. Ya sea formando enlaces cruzados con proteínas afectando la estructura tridimensional y su función; o por activación de receptores para AGEs que a su vez activan segundos mensajeros y factores de transcripción liberando citocinas [4].

Autofluorescencia en piel

La mayoría de los AGEs que son evaluados *in vivo* o *in situ* pueden detectarse en diferentes tipos de muestras y se han propuesto como biomarcadores de enfermedades crónicas. Varios ensayos bioquímicos e inmunohistoquímicos permiten determinar los niveles de AGEs circulantes, pero también se pueden identificar en piel. Actualmente se tienen identificados un grupo de AGEs en piel los cuales se distinguen en función de sus propiedades de fluorescencia [6]. La Pentosidina se encuentra en el grupo de AGEs fluorescentes mientras que carboximetil-lisina, carboxietil-lisina, dímero de metilgloxal-lisina y dímero de gloxal-lisina pertenecen al grupo de AGEs no fluorescentes. La identificación de estos productos en piel ha favorecido el desarrollo de una técnica que permite determinar en tiempo real la acumulación de AGEs en piel por Autofluorescencia [6].

El AGE Reader es el dispositivo que se utiliza para la Autofluorescencia en piel (sAF). Este dispositivo ilumina el antebrazo inferior del sujeto y emite luz UV con pico de intensidad de 370 nm. Esto excita a los AGEs en piel que tienen propiedades autofluorescentes características en un rango de frecuencia de 300-420 nm. La luz autofluorescente se mide con un espectrofotómetro en un rango de 300-600 nm. Normalmente, para cada valor de sAF, se realizan tres registros consecutivos en tres sitios diferentes del mismo antebrazo en un periodo de aproximadamente 2 minutos. sAF se expresa en unidades arbitrarias (AU) como la

relación entre la intensidad de luz de emisión en el rango de 420-600 nm y la intensidad de luz de excitación entre 300 y 420 nm multiplicada por 100 para compensar el efecto de pigmentación de la piel sobre la Autofluorescencia mediante la absorción de la luz. Los datos del espectrofotómetro proporcionan el valor de sAF junto a un valor de referencia corregido por la edad [6].

Se ha demostrado que los AGEs en piel son un predictor significativo de complicaciones diabéticas y mortalidad en un periodo de 5 a 10 años [4,6]. Ya que el AGE Reader permite estimaciones no invasivas de sAF, este método se pudiera utilizar en la práctica clínica futura como un biomarcador en pacientes con Diabetes Mellitus (DM) y predictor de Riesgo Cardiovascular. Debido a que la medición de AGEs fluorescentes está influenciada por el color de piel, el establecer valores de referencia en población sana mexicana permitirá que la evaluación del contenido de estos compuestos en pacientes con DM sea más confiable.

Por lo tanto, el propósito de esta investigación es evaluar la relación de sAF con el perfil metabólico (glucosa, perfil de lípidos) y el riesgo cardiovascular determinado por el índice aterogénico en sujetos clínicamente sanos, así como también se busca comparar los resultados de sAF de los sujetos sanos con pacientes con DM para ver si son diferentes en nuestra población.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se reclutaron 30 sujetos de ambos sexos con rango de edad de 18 a 35 años, clínicamente sanos, con IMC de 18 a 24.9 kg/m², sin presentar enfermedades crónicas, no fumadores y con bajo consumo de alcohol. Se acudió a Universidades en busca de sujetos que cumplieran los requisitos. Dichos sujetos fueron citados en el Departamento de Ciencias Médicas de la Universidad de Guanajuato donde se les realizó una Historia Clínica. Posteriormente se efectuó el cálculo de IMC el cual es un índice que representa la relación entre masa corporal (peso) y talla (estatura); se calcula con la fórmula = peso (kg) / (talla (m))².

Los sujetos seleccionados fueron citados para la realización de análisis bioquímicos: glucosa y perfil

de lípidos, por lo que se les solicitó presentarse en ayuno previo de 10 horas. Se les indicó evitar el uso de bloqueadores y cremas en el antebrazo izquierdo, así como lavar el mismo con jabón neutro 3 días previos a la lectura de sAF.

Los sujetos fueron citados nuevamente para la medición de sAF con el dispositivo AGE Reader. Después del valor de sAF en cada sujeto evaluado, AGE Reader grafica el valor de sAF corregido por la edad en cuatro grupos: Grupo sin riesgo cardiovascular, Grupo de Riesgo I sin aumento de riesgo cardiovascular, Grupo de Riesgo II con aumento de riesgo cardiovascular y Grupo de Riesgo III con riesgo cardiovascular definido.

Los puntos de corte utilizados fueron basados en los parámetros de referencia del laboratorio de análisis bioquímicos del Departamento de Ciencias Médicas de la Universidad de Guanajuato: glucosa 65 a 110 mg/dl, colesterol total 110 a 200 mg/dl, HDL 40 a 60 mg/dl, LDL 60 a 140 mg/dl, VLDL 5 a 40 mg/dl y triglicéridos 35 a 135 mg/dl. El punto de corte del índice aterogénico es 3.75, con base en un estudio que asocia a dicho índice como predictor de enfermedad coronaria [7]. Para el análisis estadístico, se calculó la media y desviación estándar de las variables de estudio, se realizó un análisis de correlación y una prueba t de student para comparar la diferencia de las medias.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de sAF de los 30 sujetos (1.64±0.56) indicó que el 30% de ellos se encuentran en el Grupo sin Riesgo Cardiovascular (RCV) (Imagen 1); el 43.3% se localizan en el Grupo I sin aumento de RCV; un 20% pertenece al Grupo II con aumento de RCV (Imagen 2) y 6.6% de ellos corresponden al Grupo III con RCV definido.

Las pruebas de laboratorio que se tomaron en cuenta para el análisis estadístico fueron las siguientes: glucosa (91.2±9.9), colesterol total (174.3±45.72), C-HDL (44 ±9.7), C-LDL (111±43), C-VLDL (18.8±9.29), triglicéridos (93.73±46.52) e índice aterogénico (4.14±1.70).

Los valores de glucosa resultaron normales en la mayoría de los sujetos, excepto en 1 sujetos el cual de acuerdo con los valores de sAF se clasificó en el Grupo III.

El colesterol total reflejó anormalidad en 6 sujetos cuyos valores de sAF fueron clasificados dentro de los Grupos I, II y III. La fracción HDL resultó alterada en 10 sujetos de los cuales 6 de ellos se localizan en los Grupos I y II. La fracción LDL reflejó alteración en 5 sujetos, encontrándose todos dentro de los grupos de Riesgo I, II y III. Los valores de VLDL mostraron alteración en 1 sujetos, el cual fue clasificados por sAF dentro del grupo II.

Los triglicéridos resultaron alterados en 7 sujetos cuya sAF clasificó a 4 dentro de los Grupos I y II. Los valores de índice aterogénico fueron anormales en 17 sujetos, lo que representa el 56.6% de nuestra población con RCV. Los valores de sAF clasificaron a 4 de ellos en el Grupo II con aumento de RCV y a 1 dentro del grupo III con RCV definido.

Al realizar análisis de correlación entre los valores de sAF y con las otras variables de interés se encontró que el sAF se correlacionó de forma positiva con la edad ($r=0.4$), y con los valores de colesterol ($r=0.25$) (Imagen 3). No se encontró asociación con el índice aterogénico.

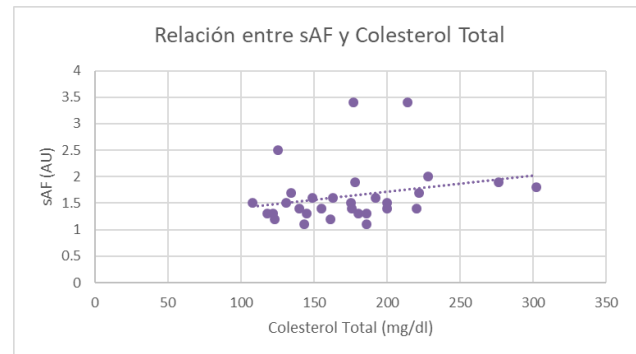


IMAGEN 3: Gráfica de correlación entre sAF (AU) y Colesterol total (mg/dl), $r=0.25$.

Measurement Results

AF 1.2 Measurement setting: Single Measurement Measured on: 03-07-17 10:29

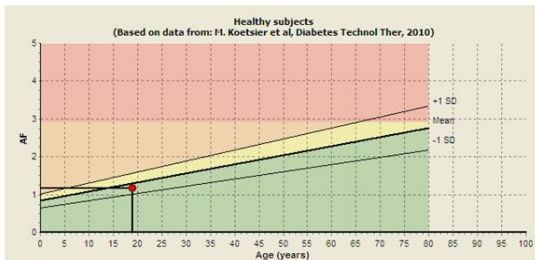


IMAGEN 1: Medición de sAF con AGE Reader, valor corregido con la edad que clasifica al sujeto en el Grupo sin Riesgo Cardiovascular.

Measurement Results

AF 1.9 Measurement setting: Single Measurement Measured on: 28-06-17 10:36

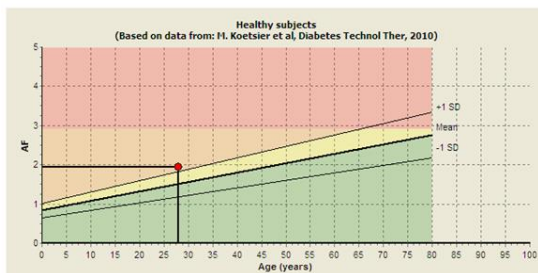


IMAGEN 2: Medición de sAF con AGE Reader, valor corregido con la edad que clasifica al sujeto en el Grupo de Riesgo II con aumento de Riesgo Cardiovascular.

Aunque la muestra de sujetos estudiada fue muy homogénea, estos resultados coinciden con otros estudios. Un estudio realizado en sujetos no diabéticos se encontró que los valores de sAF fueron mayores en quienes presentaban Síndrome Metabólico (2.07 ± 0.45) en comparación con los individuos que no lo presentaban (1.89 ± 0.42) siendo estadísticamente diferentes ($p<0,001$) [8]. Otro estudio realizado en pacientes con diabetes mellitus tipo 1 concluyó que los valores de sAF (2.07 ± 0.50) fueron significativamente mayores ($p=0.024$) en estos pacientes comparado con un grupo control (1.9 ± 0.26); además correlaciona sAF con el espesor carotídeo íntima-media ($r=0.446$, $p<0,001$) y con la velocidad de onda de pulso tobillo-braquial ($r=0.194$, $p=0.049$) por lo que asocia a sAF con la presencia y severidad de complicaciones de diabetes mellitus [9].

Un estudio realizado por el mismo grupo en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 encontró que los valores de sAF fueron mayores a los reportados por este estudio (2.5 ± 1.4) y fueron estadísticamente diferentes ($p=0.009$), también en estos pacientes se encontró una correlación entre sAF y la edad ($r=0.36$) pero no con otras variables bioquímicas [10].

Estos resultados indican que el sAF en nuestra población si es capaz de discriminar entre sujetos

sanos y pacientes con DM. Aunque estos resultados ya se han reportado en otros estudios, debido a la influencia que pudiera tener el color de piel en esta medición es importante establecer que la medición de sAF es capaz de discriminar pacientes sanos y con DM en población mexicana.

CONCLUSIONES

Resulta interesante que los resultados de sAF de este estudio en sujetos sanos fue significativamente diferente en pacientes con DM. También se encontró una relación entre el colesterol total y la edad con la medición de sAF, aunque no se encontró relación con el índice aterogénico. La medición de AGEs por fluorescencia en piel es una herramienta que ha demostrado ser un predictor significativo de complicaciones de Diabetes, ya que representa una memoria a largo plazo del estrés metabólico. Se espera que en un futuro las mediciones de sAF sean utilizadas en la práctica clínica ya que es un método práctico y no invasivo, por lo que se necesita un mayor enfoque de investigación en esta área que permita demostrar los beneficios y limitaciones de dicha medición.

AGRADECIMIENTOS

A Dra. Mónica Cardona y Dra. Etzabel Villegas, técnicos académicos del Departamento de Ciencias Médicas de la Universidad de Guanajuato.

A Rosalía Monserrat López y Jocelyn Ortiz, estudiantes de la Maestría en Ciencias Médicas; Andrea Susana Ramos López, pasante de la Licenciatura en Nutrición y Daniel Ulises Álvarez Cruz, estudiante de Preparatoria Oficial y participante del Verano de Investigación.

REFERENCIAS

[1] Uribarri, J. & cols. (2015). Dietary Advanced Glycation End Products and Their Role in Health and Disease. *Advances in Nutrition*, 6(4), pp. 461-473.

[2] Luevano-Contreras, C. Gomez-Ojeda, A. Macias-Cervantes, M. & Garay-Sevilla, M. (2017) Dietary Advanced Glycation End Products

and Cardiometabolic Risk. *Current Diabetes Reports*, 17(63), pp. 1-11.

[3] Garay-Sevilla, M. Luevano-Contreras, C. Chapman-Novakofski, K. (2016) Nutritional Modulation of Advanced Glycation End Products. En Malavolta, M. & Mocchengiani. (Ed.), *Molecular Basis of Nutrition and Aging* (pp 263-276) Elsevier.

[4] Aragno, M. & Mastrocola, R. (2017) Dietary Sugars and Endogenous Formation of Advanced Glycation End products: Emerging Mechanisms of Disease. *Nutrients*. 9(385), pp 1-16.

[5] Chapman-Novakofski, K. & Luevano-Contreras, C. (2010) Dietary Advanced Glycation End Products and Aging. *Nutrients*, 2(12), pp. 1247-1265.

[6] Da Moura-Semedo, C. Webb, M. Waller, H. Hhunti, K. & Davies, M. (2017) Skin autofluorescence, a non-invasive marker of advanced glycation end products: clinical relevance and limitations. *Postgraduate Medical Journal*. 93 (1099), pp. 289-294.

[7] Iruirita, M. & cols. (2007) Utilidad del índice aterogénico en la predicción de enfermedad coronaria prematura. *Clínica e Investigación en Aterosclerosis*. 19(3), pp 136-142.

[8] P.van-Waateringe, R. & cols. (2017) Skin autofluorescence, a non-invasive biomarker for advanced glycation end products, is associated with the metabolic syndrome and its individual components. *Diabetology & Metabolic Syndrome*. 9(42), pp 1-12.

[9] Osawa, S. & cols. (2017) Skin Autofluorescence is Associated with Early-stage Atherosclerosis in Patients with Type 1 Diabetes. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*. 24(3), pp 312-326.

[10] Luevano-Contreras, C., Guzman-Rosiles, I., Del Castillo, D., Gomez-Ojeda, A., Garay-Sevilla, M. E. (2017). Advanced glycation end products (AGEs) and sRAGE levels after benfotiamine treatment in diabetes mellitus type 2. *The FASEB Journal*, 31(1) pp 646.32-646.32.