



**UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO CAMPUS LEÓN
DIVISIÓN EN CIENCIAS DE LA SALUD
MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS**

TESIS DE MAESTRÍA

“Estudio de la expresión de RAGE y sus ligandos S100A8/9, S100A12, S100B y HMGB1 en subpoblaciones de monocitos y neutrófilos de pacientes con diabetes mellitus tipo 2”

**TESIS QUE PRESENTA PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN
CIENCIAS MÉDICAS:**

Lic. en Medicina Claudia María Calderón Paredes

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Nicté Guadalupe Figueroa Vega

CODIRECTOR DE TESIS:

Dr. Carlos Kornhauser Araujo

Enero 2020

León de los Aldama, Guanajuato

Agradecimientos:

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) le agradezco el apoyo recibido durante la maestría.

A la Dra. Nicté Guadalupe Figueroa Vega. Directora de tesis. Principal impulsora en la idea y realización de esta investigación. Por brindarme su dirección y conocimientos, ayuda, enseñanzas, paciencia y comprensión.

Al Dr. Carlos Kornhauser Araujo. Codirector de tesis. Por su fundamental ayuda en la evaluación y clasificación clínica de los participantes, así como su valioso conocimiento transmitido y aportaciones en la metodología y conceptos teóricos a este trabajo en todo momento.

Al Dr. Juan Manuel Malacara Hernández. Por sus enseñanzas y su valioso conocimiento transmitido en el amplio campo de la medicina, por sus valiosos consejos y sobre todo por su apoyo a la ciencia.

A la Dra. Elva Leticia Pérez Luque y Dra. Martha Eugenia Fajardo Araujo, pertenecientes a mi comité tutorial; les agradezco profundamente por su tiempo y dedicación además de sus múltiples aportaciones y correcciones a lo largo de la realización de este trabajo de investigación.

Al Dr. Maciste Habacuc Macías Cervantes. Por su valioso apoyo y orientación, así como su disposición en todo momento para brindarme su ayuda incondicional a lo largo de toda la maestría.

A la Dra. Mónica Cardona por su gran apoyo y enseñanzas, así como experiencia brindada en el proceso de captación y evaluación de los participantes y parte logística en este trabajo, por su valioso tiempo y dedicación e invaluable consejos.

A la T.S. Beatriz Pérez Mendiola por su gran apoyo, tiempo y disposición en el proceso de captación de los participantes en este trabajo, así como por su ayuda en la coordinación logística de este trabajo.

A las Tec. Acad. C. Angélica María Franco Zermeño y Luz María Frausto Morales por su valioso apoyo en la toma y procesamiento de muestras para esta investigación.

A todos mis catedráticos del Departamento de Ciencias Médicas de la Universidad de Guanajuato por sus valiosos conocimientos e invaluable apoyo en todo momento.

A mis padres, a mis amigos y en especial a mi esposo por su comprensión y apoyo en todo momento.

Gracias por todo.

ÍNDICE

RESUMEN	1
I.- ANTECEDENTES	2
1.1.- Diabetes mellitus y sus complicaciones	2
1.2.- RAGE (Receptor de productos finales de glicación avanzada).....	4
1.3.- RAGE en daño renal	6
1.4.- Alarminas o Calgranulinas	7
1.4.1.- HMGB1	7
1.4.2.- Proteínas de unión a calcio.	8
1.5.- Interacción RAGE-ligandos, participación en mecanismo de daño vascular.	10
1.6.- Prevención de la Diabetes Mellitus tipo 2.	11
II.- PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	15
III.- JUSTIFICACIÓN	15
IV.- HIPÓTESIS.....	15
V.- OBJETIVO GENERAL	15
5.1.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
VI.-MATERIAL Y MÉTODOS	16
6.1.-Tamaño de la muestra	18
6.2.- Definición de las variables y escalas de medición	18
6.2.1.- Tabla de variables	19
6.3.- Análisis Estadístico:	20
6.4.- Consideraciones Éticas:	20
VII.- RESULTADOS	21
VIII.- DISCUSIÓN.....	49
IX.- CONCLUSION	51
X.- REFERENCIAS	52
XI.- ANEXOS.....	56
11.1.- ANEXO 1. Hoja de recolección de datos.	56
11.2.- ANEXO 2. Consentimiento informado.....	58
11.3.- ANEXO 3. Carta de aprobación del CIBIUG.	59
11.4.- ANEXO 4. Cartas de aprobación de los sinodales.....	60

RESUMEN

Antecedentes: La hiperglucemia es un factor importante para el desarrollo de complicaciones vasculares de DM2, que tienen una alta mortalidad y morbilidad. Por lo tanto, es necesario analizar nuevos mecanismos moleculares para identificar el deterioro vascular temprano y los factores relacionados. Debido a la evidencia de su papel en muchas patologías, el receptor AGE (RAGE) y sus ligandos han surgido recientemente como importantes en la inflamación. **Objetivo:** Evaluar la expresión de RAGE y sus ligandos S100A8/9, S100A12, S100B y HMGB1 en monocitos y neutrófilos de sujetos sanos y pacientes con DM2 de ambos sexos con diferente control metabólico. **Diseño:** Estudio clínico transversal y comparativo. **Métodos:** Se incluyeron 43 voluntarios de entre 28 y 55 años, de ambos géneros. Clasificamos a los individuos en dos grupos de la siguiente manera: 1) Sujetos no diabéticos con un IMC 19 a 25 kg/m²; 2) Pacientes con DM2 con <5 años desde el diagnóstico con un IMC hasta 32 kg/m². Se cuantificó glucosa, HbA1c y perfil lipídico. Las células mononucleares (CMN) se aislaron con Ficoll-Hypaque y los neutrófilos con Dextran. El porcentaje de RAGE y la expresión de sus ligandos se realizó con citometría de flujo. **Resultados:** En monocitos proinflamatorios, la expresión de RAGE fue mayor en pacientes con DM2 con buen control glucémico (96.6±8.8 %) en comparación de los controles sanos (87.4±5.3 %; p=0.00002). S100B fue mayor en pacientes con DM2 con regular control glucémico (32332±10638 IMF) en comparación con los que tenían un buen control (25228±11894 IMF; p=0.04). Por otro lado, en presencia de daño renal, en monocitos proinflamatorios, la expresión de S100B fue mayor (13952±4354 IMF) en comparación de los pacientes con DM2 sin daño renal (4963±8707 IMF; p=0.03). En monocitos proinflamatorios, la expresión de RAGE fue mayor en los pacientes con DM2 sin riesgo cardiovascular (91.6±6.5 %) en comparación de los pacientes con DM2 con riesgo (85.7±7.6 %; p=0.01). La expresión de S100A12 también fue mayor en los pacientes con DM2 sin riesgo cardiovascular (8985±2154 IMF) en comparación con los pacientes que tenían riesgo cardiovascular (3269±2487 IMF; p=0.000001). En los neutrófilos, la expresión de S100A12 fue mayor en los pacientes con DM2 con riesgo cardiovascular (37311±15544 IMF) en comparación de los pacientes con DM2 sin riesgo cardiovascular (10039±19037 IMF; p=0.02), del mismo modo, S100B fue mayor en los pacientes con DM2 con riesgo cardiovascular (52412±19251 IMF) en comparación de los pacientes con DM2 sin riesgo cardiovascular (14738±8540 IMF; p=0.03). **Conclusiones:** Estos datos muestran que la inflamación crónica de bajo grado que acompaña a la DM2, favorece la sobreexpresión de RAGE y sus ligandos en monocitos y neutrófilos de pacientes que presentan daño renal y riesgo cardiovascular, revelando la posible participación de estas moléculas en el mecanismo de progresión en esta patología y sus posibles complicaciones.

I.- ANTECEDENTES

1.1.- Diabetes mellitus y sus complicaciones

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es una alteración metabólica que lleva a hiperglucemia, inflamación crónica de bajo grado, dislipidemia, resistencia a la insulina y otros cambios metabólicos que se asocian de manera directa con el inicio y progresión de daño micro y macrovascular, como la nefropatía diabética (ND) y la aterosclerosis [1,2].

Las complicaciones micro- y macrovasculares tienen alta mortalidad y morbilidad en nuestra población, lo que hace urgente la búsqueda e investigación de perspectivas novedosas para identificar precozmente el deterioro micro y macrovascular. Uno de los principales instrumentos es actualmente la hemoglobina glicada (HbA_{1c}), pero aún es insatisfactorio para este propósito [3,4].

El daño endotelial temprano se evalúa midiendo por ultrasonografía del engrosamiento de la íntima-media carotídea (IMT) [5], y con mayor precisión con la velocidad de pulso de la onda (PWV) que indica cambios estructurales en la pared vascular [6] pero no permiten conocer los factores implicados en el daño.

Existe un gran interés en el papel de la inflamación en las enfermedades cardiovasculares, y los marcadores de inflamación que servirían como predictores. Recientemente se ha encontrado que el receptor RAGE y varios de sus ligandos pueden actuar como perspectivas interesantes para evaluar el riesgo cardiovascular y diseñar estrategias de tratamiento preventivas [7].

Por otro lado, el descontrol hiperglucémico crónico en pacientes diabéticos también conduce al daño estructural sobre las nefronas, primeramente, a nivel mesangial para posteriormente tornarse en un daño más difuso que a través de los años llega a producir una enfermedad renal terminal. La ND se caracteriza por cambios funcionales y estructurales, algunos de estos cambios tempranos incluyen hiperfiltración caracterizada por un filtrado glomerular >130 ml/minuto, hipertrofia glomerular y renal, así como de las células mesangiales, y posteriormente, acumulación de la matriz, engrosamiento de la membrana basal y alteraciones de la barrera de filtrado glomerular [2,8].

La nefropatía diabética (ND) es la principal complicación microvascular de la DM2. La ND es causada por alteraciones en las estructuras capilares y tubulares. Los mecanismos que inducen las anomalías en la funcionalidad del riñón se desconocen en detalle debido a la complejidad de la diabetes [2-3].

Entre las vías involucradas se encuentran inflamación, transición mesénquimo-epitelial, apoptosis, daño en la mitocondria, interacción podocito-endotelio. La capa de células endoteliales fenestradas, la membrana basal y los podocitos forman una barrera fuerte de filtración impermeable a proteínas de alto

peso molecular. Por lo que una elevada tensión arterial, hiperglucemia entre otros, favorecen los cambios fenotípicos progresivos permitiendo la pérdida de los podocitos, engrosamiento de la membrana basal y fibrosis túbulo-intersticial. Estas modificaciones inician cambios patológicos en vías de activación de mediadores en diferentes estadios de la enfermedad. El daño al podocito induce proteinuria, daño al glomérulo y declive en la filtración glomerular [3-4].

En el desarrollo de la ND participan algunos factores conocidos como el grado de control metabólico, la edad, la hipertensión arterial, factores genéticos, pero ninguno tiene la sensibilidad para mostrarse como evidencia clínica [2-4,8].

La creatinina sérica y urinaria, la excreción urinaria de albúmina, la depuración de creatinina y la estimación de la filtración glomerular son frecuentemente empleadas en el laboratorio clínico de rutina para evaluar la función renal; sin embargo, es conocido que estas pruebas presentan desventajas que limitan su sensibilidad clínica en estadios tempranos, indicando la importancia de acciones preventivas y de diagnóstico oportuno para ofrecer mejor calidad de vida a los pacientes.

El receptor RAGE ha surgido recientemente como una proteína importante en el proceso inflamatorio generalizado, pues se une a moléculas como: HMGB1 (anfoterina) y las proteínas de unión a calcio, también llamadas calgranulinas o alarminas (S100A y S100B) que favorecen la inflamación y daño endotelial [8], e interactúan con transportadores claves en la regulación del transporte inverso del colesterol: ABCA1 y ABCG1 disminuyendo su expresión en los macrófagos [7,9].

Existe suficiente evidencia de la participación de RAGE y sus formas solubles (sRAGE y esRAGE) en el daño cardiovascular, pero no hay información contundente de su posible valor predictivo. Por otra parte, la unión de RAGE y sus ligandos tienen efecto en los transportadores tipo cassette de unión a ATP (ABC), que cuando se alteran; aceleran el daño cardiovascular induciendo inflamación y disfunción endotelial; lo que contrarresta el efecto de ABCA1/G1, alterando el transporte reverso del colesterol [9]. Esto sugiere que RAGE y sus ligandos participan perpetuando la inflamación, sin embargo, existe poca información sobre estos procesos en el humano [10].

Se cree que los RAGE solubles son receptor señuelo que regulan la actividad de RAGE, pero hay controversia de su valor predictivo para eventos cardiovasculares, ya que los niveles elevados sRAGE y esRAGE protegen contra la aterosclerosis, los niveles bajos se asocian a inflamación, aumento del IMT y riesgo cardiovascular en la prediabetes y DM2. En contraste también hay asociación positiva entre sRAGE y daño cardiovascular e infarto del miocardio [7,11]. El tema es controvertido, pero hay amplias perspectivas para el papel de RAGE y como biomarcador, por lo que es importante definir el papel de RAGE como predictor de daño cardiovascular en las complicaciones macrovasculares.

Los conocimientos sobre inflamación y deterioro vascular en la diabetes son incompletos. Un tema prioritario sería esclarecer el papel de la inflamación crónica de bajo grado en estos procesos y en la predicción de daño cardiovascular.

A este respecto, se han propuesto nuevos mecanismos de daño vascular durante la DM2 que no han sido abordados en profundidad, como la interacción RAGE-HMGB1-S100B que podrían ofrecer nuevas perspectivas con propósitos predictivos.

1.2.- RAGE (Receptor de productos finales de glicación avanzada).

El RAGE, es un receptor multiligando perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas que se sobre-expresa en hiperglucemia e inflamación. Este receptor se expresa de manera constitutiva en células como cardiomiocitos, neuronas, neutrófilos, monocitos/macrófagos, linfocitos, células dendríticas y células endoteliales vasculares, entre otras, y es considerado un receptor de reconocimiento de patrones por su capacidad para detectar estructuras tridimensionales en lugar de secuencias específicas de aminoácidos [10].

RAGE tiene 3 isoformas: la proteína transmembranal expresada en monocitos y células endoteliales y 2 solubles: *RAGE soluble* (sRAGE) producto del rompimiento de la proteína de membrana, y *RAGE secretor endógeno* (esRAGE) formado por *splicing* alternativo [12]. *RAGE de membrana* se une a alarminas como HMGB1 y a los péptidos antimicrobianos o calgranulinas de la familia de las proteínas de unión a calcio (S100) S100A8/9, S100A12, S100B, induciendo inflamación y disfunción en la placa aterosclerótica endotelial por acumulación de macrófagos M1 y células necróticas [13,14].

Observaciones previas indican que el eje RAGE/ligandos es un importante blanco terapéutico para la respuesta inflamatoria y el daño cardiovascular. En un estudio realizado en ratones donde se deseaba investigar el papel de RAGE en la adhesión de leucocitos (midiendo la expresión de ICAM-1 y RAGE en endotelio) después del infarto de miocardio y su efecto sobre la función miocárdica postisquémica, en donde la expresión de RAGE parecía restringida a las células endoteliales y peri-endoteliales, consistente con un papel en la modulación del reclutamiento de leucocitos durante la isquemia temprana [15].

Esta primera respuesta al estrés isquémico e inflamatorio da lugar a la regulación/liberación de una serie de marcadores de activación endotelial temprana, entre los que se encuentra HO-1, una enzima antioxidante y antiapoptótica intracelular, tiene un efecto similar sobre la afluencia de leucocitos y la disfunción miocárdica, afectando potencialmente la expresión de RAGE a través de niveles disminuidos de HMGB1 [15].

El receptor para los productos finales de glicación avanzada (RAGE) y sus ligandos se han considerado como desencadenantes patógenos importantes para

la progresión de las lesiones vasculares en la diabetes. El vínculo perjudicial entre RAGE y la angiopatía diabética se ha demostrado en estudios con animales. Las estrategias preventivas y terapéuticas que se centran en RAGE y su eje de ligando pueden ser de gran importancia para aliviar las complicaciones vasculares de la diabetes y reducir la carga de la enfermedad [16].

La forma clásica de RAGE, también denominada RAGE de longitud completa, se compone de un único dominio transmembrana, una porción citosólica y una región extracelular. La región extracelular consiste en 2 dominios de inmunoglobulina tipo C (C1 y C2) y un dominio tipo V, considerado como el lugar principal de unión a los ligandos; la eliminación de este dominio da como resultado la forma N-truncada. La porción citosólica es esencial para la señalización intracelular posterior a la unión del ligando en la región V (**Figura 1**) [17].

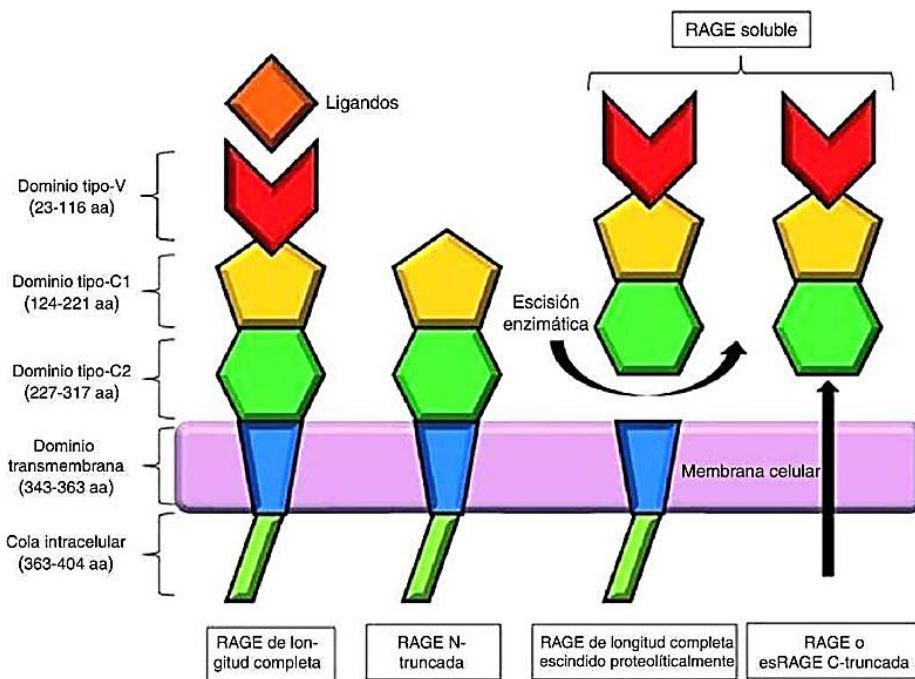


Figura 1. Representación esquemática de los receptores de los productos finales de glicación avanzada y sus isoformas. Modificada de Chuah et al. [17]

Además del RAGE de longitud completa, existen 19 variantes de empalme, las cuales, de acuerdo con el Comité de Nomenclatura de Genes Humanos, han sido resumidas y renombradas en RAGE v1 a RAGE v19. Se han identificado 2 formas solubles de RAGE en el plasma humano: RAGE v1 o esRAGE, que resultan de un splicing alternativo, y sRAGE (también conocido como cRAGE), una isoforma de escisión proteolítica en la porción extracelular del RAGE de longitud completa, mediada por la metaloproteína ADAM 10 [17,18].

Los ligandos que se han encontrado para ser reconocidos por RAGE son el péptido beta-amiloide, las proteínas de alta movilidad del grupo de caja 1 (HMGB1; llamada también anfoterina), proteínas del grupo S100, productos avanzados de oxidación de proteínas, C3a, integrinas- β 2 Mac/CD11b, lipopolisacáridos y fosfatidilserina en la superficie de células apoptóticas [19].

RAGE se involucra en etapas tempranas y tardías de la disfunción endotelial; su expresión aumenta al incrementar sus ligandos y dada la presencia de estos en la placa aterosclerótica es importante conocer la vía del aumento de estas moléculas y el resultado de su unión a los ligandos, ya que favorece la inflamación al activar vías de señalización para la migración de monocitos, activación de células endoteliales, sobreexpresión de moléculas de adhesión (VCAM) y síntesis de citocinas proinflamatorias [15].

Existen diversos estudios en donde cuantifican RAGE membranar mediante citometría de flujo, además de otras técnicas, entre los cuáles, uno de los más recientes fué en monocitos de niños sanos [20], en donde la expresión de RAGE en estas células se correlacionó positivamente con la edad. En otro trabajo se determinó la expresión de RAGE de membrana en células mononucleares de sangre periférica por citometría de flujo de jóvenes adultos sanos tras dieta rica en grasas con y sin ejercicio previo, encontrando en sus resultados que la expresión de RAGE de células mononucleares inducida por la comida rica en grasas probablemente es impulsada por la población de monocitos [21] (**Tabla 1**).

La interacción RAGE-S100B específicamente induce especies reactivas del oxígeno dependientes de la NADPH oxidasa y síntesis de TNF- α . En las células endoteliales activa NF- κ B y sobre expresa VCAM-1. En el músculo liso del endotelio, RAGE-S100B activa angiotensina II y sintetiza IL-6 y MCP-1 [22]. En monocitos de individuos sanos, la unión RAGE-S100B atenúa la expresión de ABCA1 y ABCG1 (transportadores tipo casete de unión a ATP, del inglés *ATP Binding Cassette Transporter*) que capturan el colesterol a través de LXR [23]. Esto sugiere que RAGE y sus ligandos participan en la acumulación de colesterol en la pared arterial del monocito, favoreciendo la formación de la placa y perpetuando la inflamación. La interacción RAGE-HMGB1 en células endoteliales favorece acumulación de leucocitos [24].

1.3.- RAGE en daño renal

La calcificación arterial es una característica de la aterosclerosis y comparte muchos factores de riesgo que incluyen diabetes, dislipidemia, enfermedad renal crónica, hipertensión y edad; y es fácilmente detectable por múltiples modalidades de imagen [25].

Existe evidencia en la literatura que RAGE endotelial tiene propiedades proinflamatorias propias, ya que se ha demostrado que la unión de DAMP puede

inducir la activación de NF- κ B a través de la vía de señalización RAGE / MAPK. Se sabe que la activación de NF- κ B actúa como un importante regulador inflamatorio en la aterosclerosis y la lesión I / R miocárdica en un modelo murino, resaltando el papel de RAGE no solo como una proteína de anclaje para los leucocitos, sino también como mediador, especialmente en la inducción temprana de un fenotipo pro-adhesivo del endotelio cardíaco [15].

RAGE con otros tipos de ligandos también modula varias respuestas fisiopatológicas, que incluyen reacciones inflamatorias e inmunes, crecimiento celular, migración, apoptosis y regeneración. La interacción de RAGE con HMGB-1, S100/calgranulinas, han demostrado tener efectos nocivos sobre la nefropatía hipertensiva, la glomerulopatía relacionada con la obesidad, la nefritis lúpica, la amiloidosis renal, la enfermedad renal poliquística autosómica dominante (PQRAD) y la lesión renal aguda séptica (AKI) al inducir la generación de ROS mediada por NADPH oxidasa y también la activación de NF- κ B [8].

La eliminación de RAGE de las células derivadas de la médula ósea mejora la nefropatía diabética inducida al inhibir la infiltración de macrófagos y el daño intersticial del túbulo renal. Estos hallazgos sugieren que RAGE podría desempeñar un papel central en la progresión de la lesión diabética glomerular e intersticial [8].

Varios estudios en animales han sugerido que RAGE tiene un papel crucial en el desarrollo y la progresión de la nefropatía diabética [8].

El tema es controvertido, pero hay amplias perspectivas para el papel de RAGE en la inflamación, por lo que es importante definir el papel de RAGE en la DM2 y sus complicaciones como daño renal y cardiovascular.

1.4.- Alarminas o Calgranulinas

1.4.1.- HMGB1

HMGB1 (high-motility group box 1) es una proteína nuclear no histona, mediador inflamatorio liberado de células necróticas y células inmunes como monocitos y macrófagos, favorece la secreción de citocinas proinflamatorias y moléculas de adhesión del endotelio [24]. Son proteínas cromosómicas muy básicas, de las cuales HMGB1 es el único miembro que ha demostrado activar RAGE. Se expresan en casi todos los tipos de células, son relativamente abundantes en el tejido embrionario y se unen al ADN de forma dependiente del contenido pero independiente de la secuencia, teniendo importantes funciones en la remodelación de la cromatina, además de muchas otras [23].

Es una proteína altamente conservada que consta de 215 aminoácidos. Se expresa en casi todas las células de mamíferos. Tiene dos cajas de unión a ADN

ricas en lisina (A y B) separadas por un conector corto. Las cajas están separadas de la cola ácida C-terminal por otra secuencia enlazadora que termina en cuatro lisinas consecutivas [24].

Se libera de forma pasiva de las células necróticas, pero no de la mayoría de las células apoptóticas. La razón de esto es desconocida, pero se ha planteado la hipótesis de que es el resultado de cambios redox o de una baja acetilación de histonas en células apoptóticas. Las células necróticas HMGB1 están severamente impedidas en su capacidad para inducir inflamación. La señalización HMGB1, en parte a través de RAGE, está asociada con ERK1, ERK2, Jun-NH2-quinasa (JNK) y la señalización p38 [24].

HMGB1 tiene la posibilidad de aumentar la inflamación y acumular aterogénesis, se ha estudiado en el mecanismo de daño renal en síndrome compartimental (o de aplastamiento): puede ser el desencadenante vital del daño renal, y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y la cinasa N-terminal c-Jun (JNK) están implicados en esta fisiopatología proceso, promoviendo la teoría de que HMGB1 desde el músculo puede ser el desencadenante. Aunque los mecanismos detallados del daño renal no están claros, los estudios clínicos y experimentales indican que los mediadores inflamatorios están asociados con daño renal avanzado [19,25].

En etapas avanzadas de la DM2 se favorece la retinopatía diabética promoviendo la inflamación y neovascularización en la retina. HMGB1 es parte del sistema inmune innato, activador de TLR y RAGE. Por ello la diabetes debe ser abordada como enfermedad metabólica e inmunológica. HMGB1, TLR y RAGE forman un trío molecular que activan NF- κ B. Por ello el bloqueo de HMGB1, es una atractiva posibilidad para el manejo de la DM2 [26].

1.4.2.- Proteínas de unión a calcio.

Son proteínas que se unen al calcio, y su función principal es el manejo del almacenamiento de calcio. Entre ellas se encuentran las proteínas S100, que son una familia de más de 20 proteínas expresadas exclusivamente en vertebrados. Algunos forman heterodímeros con otras proteínas S100; como el heterodímero S100A8/S100A9 es la forma en que se encuentra dentro de la célula [27].

El bucle N-terminal no es canónico y tiene una afinidad mucho menor por el calcio que el bucle C-terminal. Los miembros de esta familia difieren entre sí principalmente en la longitud y secuencia de sus regiones de bisagra y la región de extensión C-terminal después de los bucles de unión. La unión de Ca^{++} induce un gran cambio conformacional que expone un dominio de unión hidrofóbica, las proteínas S100 han sido llamadas "sensores de calcio" o "interruptores regulados por calcio" [27].

S100A8, S100A9 y S100A12 tienen un papel importante en la mediación de la inflamación y aumentan la aterosclerosis en modelos humanos y de roedores al interactuar con RAGE, que desempeña un papel importante en la disfunción endotelial y la inflamación [28]. Las proteínas S100A y S100B son marcadores de activación e inflamación [29]. Las proteínas S100 también participan en la patogénesis de la aterosclerosis. S100A8 y S100A9 existen en las placas y aumentan la aterogénesis al activar los neutrófilos y los monocitos en las lesiones arteriales [30-31].

S100A12, también conocido como enRAGE se expresa principalmente en granulocitos, pero también se encuentra en queratinocitos y lesiones psoriásicas y representa aproximadamente el 5% de la proteína citosólica total en neutrófilos en reposo. Se expresa en inflamación aguda, crónica y alérgica. Interactúa con RAGE de manera dependiente de calcio. Se une a los dominios RAGE C1 y C2 en lugar del dominio V. También puede unirse a RAGE expresado en células endoteliales, señalizando a través de las vías NF- κ B y MAPK [27].

S100A12 secretado se une a RAGE y aumenta la expresión de la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1), la molécula de adhesión de células vasculares-1 (VCAM-1), NF- κ B y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). S100A12 es un quimio atrayente para monocitos y mastocitos, aunque solo la región bisagra parece importante para este último. Dado que los mastocitos no expresan la proteína RAGE o el ARNm, su activación por S100A12 se produce de forma independiente de RAGE. S100A12 existe como homodímero en condiciones de calcio bajo, pero formará agregados de hexámeros (tres dímeros) en concentraciones milimolares de calcio [27].

S100A12 puede tener un papel como biomarcador de futuras enfermedades cardiovasculares, y puede incorporarse en la prevención primaria y la modificación del factor de riesgo [30].

S100A12 y RAGE son vías emergentes que vinculan la inflamación con la aterosclerosis y la calcificación vascular, como lo demuestra el aumento de la calcificación vascular en ratones transgénicos S100A12.

S100B es una proteína que desempeña un papel importante en la mediación de la inflamación y aumentan la aterosclerosis en modelos humanos y de roedores al interactuar con RAGE. Proliferación celular, la diferenciación, la migración y el metabolismo energético en condiciones fisiológicas, también actúan como DAMP al interactuar con TLR2, TLR4 y RAGE después de que se liberan de los fagocitos [19].

S100B se expresa principalmente en los astrocitos de la corteza humana y los melanocitos, así como en células del linaje mieloide. Se han encontrado

niveles elevados de S100B en pacientes después de un traumatismo cerebral, isquemia / infarto, enfermedad de Alzheimer y síndrome de Down [27].

Esta proteína se utiliza como marcador de la activación y muerte de las células gliales. Los dímeros covalentes de S100B pueden utilizarse como un marcador de estrés oxidativo [27].

S100B se une a las regiones variable (V) y constante (C1) de RAGE, y los oligómeros de S100B se unen a RAGE con mayor fuerza. En concentraciones equivalentes, S100B aumenta la supervivencia celular, dependiendo de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Al unirse a RAGE y activar la formación de ROS intracelular, S100B activa la ruta de PI3-cinasa/AKT y posteriormente la ruta de NF- κ B, lo que resulta en la proliferación celular [27].

S100B ejerce efectos tróficos en neuronas y astrocitos en concentraciones más bajas y causa apoptosis neuronal, activando astrocitos y microglia en concentraciones más altas. La activación de S100B de RAGE regula al alza la expresión de IL-1 β y TNF- α en microglia y estimula la actividad transcripcional de AP-1 a través de la señalización de JNK [27].

La regulación al alza de la expresión de COX-2, IL-1 β y TNF- α en microglía por S100B requiere la activación concurrente de NF- κ B y AP-1 [27].

S100B y HMGB1 se encuentran en la placa ateromatosa, y se detectan en monocitos circulantes y macrófagos M1 [32,9,24,26,28]. Para entender mejor la relación RAGE-ligandos-daño vascular, se requiere estudiarlos en grupos con alto y bajo riesgo y así definir su relación y posible aplicación en la evaluación de las complicaciones micro- y macrovasculares tempranas, es decir, en pacientes con daño vascular subclínico sin complicaciones clínicas.

1.5.- Interacción RAGE-ligandos, participación en mecanismo de daño vascular.

La interacción de RAGE con sus ligandos induce la activación del NF- κ B a través de múltiples vías de transducción de señales intracelulares, incluyendo proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), cinasas reguladas por signos extracelulares 1/2 (ERK 1/2), p38, la NADPH oxidasa, la cinasa terminal Jun-N, p21/RAS, GTPasas Cdc42 y Rac [33].

En condiciones fisiológicas, HMGB1 se encuentra en el núcleo celular, sin embargo; durante procesos inflamatorios migra al espacio extracelular, liberando macrófagos y células vasculares del músculo liso en las lesiones [19,25].

Tras su activación, el NF- κ B pasa al núcleo celular e inicia la transcripción de diversas proteínas que favorecen el desarrollo y la progresión de las complicaciones vasculares, tales como moléculas de adhesión celular vascular-1, factor de crecimiento transformante- β 1, factor de crecimiento de tejido conectivo, factor de crecimiento derivado de las plaquetas, factor de necrosis tumoral- α , IL-1

e IL-6. A su vez, el ADN también codifica para la expresión de RAGE, actuando como un mecanismo de retroalimentación positiva [32].

Existe evidencia sustancial de que RAGE es un mediador de la enfermedad vascular y, lo que es más importante, los ratones que carecen de RAGE han atenuado la aterosclerosis en ratones deficientes en apolipoproteína E [23].

1.6.- Prevención de la Diabetes Mellitus tipo 2.

Existen enfoques efectivos para prevenir la DM2, así como las complicaciones y la muerte prematura que pueden derivarse de todos los tipos de diabetes. Entre tales enfoques cabe citar las políticas y prácticas aplicables a todas las poblaciones y en entornos específicos (escuelas, hogar, lugar de trabajo) que contribuyen a la buena salud de todos, independientemente de si tienen o no diabetes, como practicar ejercicio físico con regularidad, mantener una alimentación sana, evitar fumar y controlar la tensión arterial y los lípidos [1,2].

Adoptar una perspectiva que contemple todo el curso de vida es fundamental para prevenir la DM2, como lo es para muchas afecciones de salud. Las primeras etapas de la vida, cuando se forman los hábitos alimentarios y de práctica de actividad física y puede programarse la regulación a largo plazo del equilibrio energético, ofrecen una oportunidad inmejorable de intervención para mitigar el riesgo de obesidad y de DM2 en etapas posteriores [1,2], esto es de suma importancia, ya que las personas con diabetes, independientemente de la duración de la enfermedad, tenían casi un 50% más de probabilidades de presentar fragilidad; entidad que engloba complicaciones son particularmente problemáticas entre nuestra población para quienes el bajo nivel socioeconómico puede conducir a una dieta deficiente, ejercicio limitado y falta de atención médica preventiva [34].

La sarcopenia es una entidad clínica, crónica y gradual que se asocia al proceso del envejecimiento y se caracteriza por la pérdida de masa, fuerza y función del músculo esquelético, favoreciendo el desarrollo de consecuencias adversas como pérdida de la independencia, discapacidad física, pobre calidad de vida, así como mayor riesgo de mortalidad. La prevalencia de sarcopenia varía ampliamente en función de los criterios diagnósticos y el método utilizado (definición operativa, población de referencia, técnica para estimar la masa muscular esquelética, puntos de corte, etc) [34].

Se ha demostrado en estudios previos, que, a pesar de controlar la población y origen demográfico en las muestras de estudio, así como los factores sociales y de salud, la realización de mediciones para detectar sarcopenia puede tener el potencial de detectar de manera precoz el proceso de fragilidad, sin embargo, es importante tomar en cuenta la controversia existente sobre los factores mencionados anteriormente que intervienen en la eficacia de esta medida [34].

Hasta el momento no se cuenta con ensayos clínicos controlados que demuestren la importancia de RAGE membranaral en personas; sin embargo, diversos estudios han señalado que niveles aumentados se asocian a una mayor incidencia de eventos cardiovasculares, así como de otros mecanismos de daño y diversas patologías (**Tabla 1**).

Es por esto, que es de suma importancia aplicar los conocimientos de investigación básica sobre el daño macrovascular a la clínica, y así fomentar la investigación traduccional y de frontera a fin de establecer procedimientos de diagnóstico más temprano del daño vascular en pacientes con DM2.

El valor del Grosor de la Intima Media aumentado se asocia a los principales factores de riesgo coronario y a un mayor riesgo de futuros eventos cerebrovasculares [35]. Su medición es utilizada para evaluar el estado aterosclerótico presente en el paciente en el momento en el que se le realiza dicha medición, además este resulta útil como predictor de riesgo de manifestaciones clínicas de enfermedad cardiovascular (eventos fatales y no fatales).

El aumento del Grosor de la Intima Media, como indicador de enfermedad subclínica, podría reflejar no sólo la posibilidad de la ocurrencia de estos eventos, sino también las consecuencias de la exposición previa a factores de riesgo [36-37].

Los valores normales del Grosor de la Intima Media están influenciados por la edad y el género [37]. El punto de corte para caracterizar el valor del Grosor de la Intima Media como normal suele ser arbitrario y en general se ubica por encima del percentil 75 de la población estudiada. El rango de valores normales del Grosor de la Intima Media en adultos, tanto el de la carótida común como el combinado de todos los segmentos carotídeos, oscila entre 0.4 y 1.0 mm, con una progresión anual de 0.01 a 0.02 mm [38].

Existe evidencia del aumento del Grosor de la Intima Media arterial (IMT) por la invasión de cristales del colesterol en el espacio sub-intimal, la reacción inflamatoria local subsecuente y la proliferación de células de músculo liso de la capa media, las que, en conjunto con los macrófagos, se transforman en células espumosas [39]. Por ende, se ha planteado que la medición del IMT permitirá pesquisar estados precoces de daño y/o de enfermedad [37].

La medición de las diversas formas moleculares de RAGE en conjunto con la expresión de sus ligandos permitirá establecer un perfil que indique el avance y la progresión del daño micro y macrovascular. Además, contribuirá para definir perfiles diferenciales de riesgo de daño en tejidos específicos como el cardiovascular, renal y vasculatura periférica. Con este fin se llevó a cabo un estudio clínico descriptivo, comparativo y transversal en una población adulta con y sin DM2 con la finalidad de conocer la interacción de RAGE de membrana en monocitos, con sus ligandos y su relación con los lípidos circulantes, glucosa, HbA_{1c}, marcadores de daño renal y el grosor de la íntima media.

Tabla 1. Estudios realizados para evaluar la expresión de RAGE de membrana.

Título	Molécula (s)	Población/técnica (s)	Hallazgos
<p>Polineuropatía amiloide familiar: receptor para la activación avanzada de productos finales de glicación dependiente de vías neuronales inflamatorias y apoptóticas.[40]</p>	<p>RAGE y agregados amorfos</p>	<p>Expresión de transcripciones de RAGE (RT-PCR) en neuronas, endotelio vascular y células de Schwann</p>	<p>Mayor expresión de RAGE y citocinas proinflamatorias en axones antes de detectar depósitos de amiloide.</p>
<p>Expresión de CD64, CD206 y RAGE en células adherentes de pacientes diabéticos infectados con <i>Mycobacterium tuberculosis</i>. [41]</p>	<p>RAGE membranar de PBMC.</p>	<p>15 pacientes con DM2, tuberculosis pulmonar (PTB), DM2 y tuberculosis pulmonar (DM2-PTB) y controles (CG). Células mononucleares (MNC) por citometría de flujo.</p>	<p>La expresión de RAGE aumenta en pacientes con Tuberculosis Pulmonar, así como en diabéticos. Sugiriendo que RAGE también podría comportarse como un receptor para <i>M. tuberculosis</i>.</p>
<p>Asociación entre los niveles séricos del receptor soluble (sRAGE) AGEs y su receptor (RAGE) en células mononucleares de sangre periférica de niños con DM1.[42]</p>	<p>Niveles de sRAGE y RAGE membranar</p>	<p>74 pacientes con diabetes mellitus tipo 1 (DM1) y 43 niños sanos.</p>	<p>El aumento de la concentración sérica en niños con DM1 puede proporcionar protección temporal contra el daño celular.</p>

<p>RAGE soluble y RAGE membranal de células mononucleares de sangre periférica en niños sanos.[20]</p>	<p>RAGE de membrana en monocitos</p> <p>RAGE soluble</p>	<p>Muestras de sangre de 43 niños sanos (1-17 años).</p> <p>RAGE membranal (citometría de flujo) sRAGE (ELISA tipo sandwich)</p>	<p>Niveles de sRAGE mostraron una correlación negativa con su forma membranal en PBMC (linfocitos).</p> <p>La expresión de RAGE en linfocitos se correlacionó positivamente con la edad.</p>
<p>Una sola comida rica en grasas altera los perfiles de RAGE solubles en humanos y la expresión de RAGE de PBMC sin efecto del ejercicio aeróbico previo.[21]</p>	<p>RAGE de membrana PBMC y sRAGE</p>	<p>12 hombres jóvenes sanos 18 - 35 años</p> <p>RAGE membranal (Citometría de Flujo) sRAGE (ELISA)</p>	<p>Una comida rica en grasas atenúa sRAGE posprandial, un importante inhibidor competitivo de RAGE membranal.</p> <p>La expresión de RAGE de PBMC inducida por la comida rica en grasas, probablemente es impulsada por la población de monocitos.</p>
<p>El receptor para productos finales de glicación avanzada se asocia con autofagia en el carcinoma renal de células claras. [43]</p>	<p>RAGE / HMGB1</p>	<p>Biopsias de 12 pacientes con ccRCC, que recibieron nefrectomía tumoral.</p> <p>Western blot, reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (qRT-PCR) e inmunofluorescencia.</p>	<p>RAGE participó en la autofagia de células tumorales en carcinoma renal de células claras.</p> <p>Eje RAGE / HMGB1 posible objetivo terapéutico novedoso para el tratamiento futuro de ccRCC.</p>

II.- PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿La expresión de RAGE y sus ligandos (S100A8/9, S100A12, S100B y HMGB1) podrá utilizarse para la evaluación temprana de las complicaciones en la diabetes mellitus tipo 2?

III.- JUSTIFICACIÓN

Las complicaciones micro- y macrovasculares de la Diabetes Mellitus tipo 2 son importantes causas de morbilidad y mortalidad en la población a nivel mundial, siendo México uno de los países con mayores tasas de incidencia para este tipo de complicaciones.

Los conocimientos sobre inflamación y deterioro vascular en la diabetes son incompletos. Es de vital importancia esclarecer el papel de la inflamación de bajo grado en estos procesos y en la predicción de daño renal y cardiovascular. A este respecto, se han propuesto nuevos mecanismos de daño vascular durante la Diabetes Mellitus tipo 2 que no han sido abordados en profundidad, como la interacción de RAGE y sus ligandos (S100A8/9, S100A12, S100B y HMGB1). Es por ello que se plantea la evaluación de estas moléculas como procedimientos innovadores y complementarios a los existentes, para identificar precozmente el deterioro vascular.

IV.- HIPÓTESIS

La expresión de RAGE y sus ligandos (S100A8/9, S100A12, S100B y HMGB1) está asociada a la progresión de la enfermedad renal y el daño cardiovascular.

V.- OBJETIVO GENERAL

Evaluar los cambios de las moléculas RAGE-ligandos bajo diverso grado de control metabólico y en distintas etapas de la historia natural de la DM2, para proponer nuevos procedimientos de diagnóstico temprano, del daño renal y cardiovascular.

5.1.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Medir niveles de glucosa en ayuno, HbA_{1c}, perfil de lípidos y creatinina en los grupos de estudio.
- 2) Determinar microalbuminuria y creatinina en orina recién emitida en los grupos de estudio.
- 3) Estimar la filtración glomerular (eFG) en los grupos de estudio.
- 4) Obtener datos sonográficos de daño vascular (grosor íntima media carotídea (IMT) en los grupos de estudio.
- 5) Detectar el porcentaje de RAGE membranar y la expresión de sus ligandos en monocitos y neutrófilos por citometría de flujo en los grupos de estudio.

- 6) Analizar la asociación de RAGE con datos clínicos, el grosor la íntima media carotídea, fuerza de prensión manual, HbA_{1c}, lípidos y microalbuminuria y eFG en los grupos de estudio.
- 7) Estratificar a los sujetos con diabetes mellitus conforme a su control glucémico (HbA_{1c}), presencia de daño renal (creatinina, estimación de filtrado glomerular, albuminuria), riesgo cardiovascular (IMT) y fuerza de prensión manual para comparar la expresión de estas moléculas en los grupos de estudio.

VI.-MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño: Estudio en sección transversal clínico y comparativo con enfoque traduccional.

Participantes: Se incluyeron 43 voluntarios de entre 28 y 55 años, de ambos géneros y se clasificó a todos los participantes en dos grupos de la siguiente manera: 1) Sujetos no diabéticos con un índice de Masa Corporal 19 a 25 kg/m²; 2) Pacientes con DM2 con <5 años desde el diagnóstico con un IMC hasta 32 kg/m².

Criterios de inclusión: Los participantes no tuvieron otra enfermedad crónica-degenerativa, neoplásica o infección, ni hipertensión. No se incluyeron personas con hábitos de fumar, consumo de alcohol o consumo de drogas. Los pacientes con DM2, se incluyeron solo los que estaban en tratamiento únicamente con metformina, no se consideraron con otros medicamentos ni con insulina.

Historia clínica y datos antropométricos: Se realizó historia clínica (**ANEXO 1**) y evaluación física a todos los participantes, incluido el peso (Báscula BC533 Tanita®), altura (Estadímetro portátil MEC®), el IMC se calculó dividiendo el peso entre la talla al cuadrado, se midió circunferencia de cintura, cadera, cuello, composición corporal mediante bioimpedancia eléctrica (Tanita®), presión arterial (esfingomanómetro Hergom®) y se evaluó la fuerza de prensión manual con un dinamómetro de mano para evaluar sarcopenia tomando como valores de referencia (Hombres de 25 a 55 años de edad 24±5 kg y mujeres de 25 a 55 años de edad 38±6 kg) de los cuáles se tomó como fuerza normal >20 kg y como fuerza disminuida >20 kg [44]. También se registró el tiempo de evolución desde el diagnóstico en los pacientes con DM2, así como el tipo de medicación y suplementos.

Medición del grosor íntima-media de la arteria carótida (IMT): La medición del grosor de la íntima media de la arteria carótida se llevó a cabo utilizando un ultrasonido Echo-Doppler (Acuson X150; Siemens®) con un transductor lineal VF10-5 de 7 MHz, que incluye Doppler pulsado y en color. El Doppler de color se usó para identificar la arteria carótida. El IMT se analizó en Modo B, obteniendo el promedio de tres mediciones, clasificándose los valores de los participantes conforme a las tablas de predicción del riesgo de la OMS/ISH y

conforme a la subregión epidemiológica de la OMS correspondiente, la región de las Américas (AMR B) para personas con y sin Diabetes Mellitus, las cuales presentan estimaciones aproximadas del riesgo de enfermedad cardiovascular en personas sin cardiopatía coronaria, ataque apoplético u otra enfermedad aterosclerótica establecidas y se tomó como referencia el rango de valores normales del Grosor de la Intima Media en adultos, tanto el de la carótida común como el combinado de todos los segmentos carotídeos, oscila entre 0.4 y 1.0 mm, con una progresión anual de 0.01 a 0.02 mm [45].

Muestras de sangre y orina: Se obtuvieron muestras de sangre periférica de todos los participantes, extraídas dentro del rango de 8 horas de ayuno. Posteriormente, el suero se separó y se almacenó a -80°C hasta su uso. Se recolectaron muestras de orina recién emitidas para medir microalbuminuria.

Parámetros bioquímicos: La glucosa, HbA_{1c}, perfil lipídico y creatinina se cuantificaron mediante colorimetría con equipo semi automatizado (SPINLAB®), así como sus respectivos Kits comerciales usando reactivos y muestras hidrosolubles. La albúmina se determinó con un equipo especializado (MultiCare® con U-Albumin Test Kit, SD BIOSENSOR®) y la creatinina horaria se evaluó en muestras de orina. Se calculó el índice de albúmina/creatinina [46]. La evaluación y clasificación de los participantes la realizó un Nefrólogo perteneciente al equipo de trabajo, tomando en cuenta la eFG (estimación de filtración glomerular) mediante la fórmula MDRD y el índice microalbúminuria/creatinina horaria. Respecto a la clasificación de control glucémico, se tomó el porcentaje de HbA_{1c}, considerándose como buen control <6.2%, control regular de 6.3 -7.5% y mal control >7.5%.

Aislamiento celular: Las células mononucleares (CMN) se aislaron usando Ficoll-Hypaque® (densidad 1,077 g/ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Los neutrófilos se separaron por sedimentación con Dextran (Dextran de Leuconostoc mesenteroides, Sigma D4876-100G). La viabilidad celular se determinó con exclusión de azul de tripano.

RAGE y expresión de ligandos por citometría de flujo: Las CMN se tiñeron con anticuerpos monoclonales anti-CD14-PerCPCy5.5 (clona: 61D3; Invitrogen Thermo Fisher Scientific®) y anti-CD16-PE (clona 3G8; BD Pharmingen™). Las tres subpoblaciones de monocitos se identificaron de acuerdo con el nivel de expresión para estos marcadores, mediante la selección de la población según tamaño y complejidad de acuerdo con la dispersión directa (FSC) y la dispersión lateral (SSC). A continuación, las células se incubaron con un anticuerpo anti-RAGE monoclonal (Abcam®); durante 1 hora. Posteriormente, se lavaron dos veces y se añadió un anticuerpo secundario anti-rata acoplado a V450 (clona M-L13; IgG2b; BD Horizon™). Enseguida, las células se fijaron, se permeabilizaron y se tiñeron de manera intracelular con los anticuerpos monoclonales dirigido contra HMGB1 (HMGB1-APC, clona: 115603; R&D Systems®), las proteínas S100A8/9 (Anti-S100A9 + Calprotectin (S100A8/A9 complex) FITC; clona MAC387; isotipo IgG1 Abcam®), S100A12 (Human EN-

RAGE/S100A12, FITC; IgG de cabra; R&D Systems®) y contra S100B (S100 beta Alexa Fluor-488®; clona: EP1576Y; isotipo IgG; abcam®). Se incubaron durante 20 minutos en hielo al abrigo de la luz.

Para neutrófilos, la fijación y permeabilización se realizó con un Kit de fijación/permeabilización Cytotfix/Cytoperm™ Plus con BD GolgiPlug (BD Biosciences®) y enseguida se añadieron los anticuerpos con los anticuerpos monoclonales dirigido contra HMGB1 (HMGB1-APC, clona: 115603; R&D Systems®), las proteínas S100A8/9 (Anti-S100A9 + Calprotectin (S100A8/A9 complex) FITC; clona MAC387; isotipo IgG1 Abcam®), S100A12 [Human EN-RAGE/S100A12, FITC; IgG de cabra; R&D Systems®), y contra S100B (S100 beta Alexa Fluor-488®; clona: EP1576Y; isotipo IgG; Abcam®). Se incubaron durante 20 minutos en hielo al abrigo de la luz.

Se adquirieron 50,000 eventos para cada muestra en el citómetro de flujo FACSCanto II (con una configuración de 8 colores y 3 láseres: azul 488 nm, rojo, 633, y violeta 405 nm) y el software FACS Diva versión 8.0.2 (BD Biosciences®). La expresión de estas moléculas se muestra como la intensidad de fluorescencia media (IMF) en cada subpoblación de monocitos y neutrófilos. Para RAGE se obtuvo el porcentaje en cada subpoblación de monocitos.

6.1.-Tamaño de la muestra

El cálculo del tamaño de muestra se determinó de acuerdo con la experiencia de estudios previos de García-Salido A *et al.* [20]. ya que no hay en la literatura información sobre la expresión de las moléculas en las poblaciones celulares de interés, teniendo un total de 20 voluntarios por cada grupo (n= 20).

6.2.- Definición de las variables y escalas de medición

Variables independientes: RAGE y sus ligandos (S100A8/9, S100A12, S100B y HMGB1).

Variables dependientes: Indicadores de daño renal y cardiovascular: creatinina, índice albúmina/creatinina, microalbuminuria, macroalbuminuria, grosor de la íntima media de la carótida y fuerza de presión manual.

Variables confusoras: Variables metabólicas (glucosa, hemoglobina glicada, perfil de lípidos), presión arterial, somatometría (composición corporal).

6.2.1.- Tabla de variables

VARIABLES	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDICIÓN	INDICADOR
VARIABLES INDEPENDIENTES			
RAGE	Cuantitativa	Continua	% de células positivas que expresan RAGE
Ligandos de RAGE (S100A8/9, S100A12, S100B y HMGB-1)	Cuantitativa	Continua	Intensidad Media de Fluorescencia (IMF)
VARIABLES DEPENDIENTES: Indicadores de daño renal y cardiovascular			
Creatinina	Cuantitativa	Continua	mg/dl
Índice Albúmina/Creatinina	Cuantitativa	Continua	-
Microalbuminuria	Cuantitativa	Continua	30-200 mg/L
Macroalbuminuria	Cuantitativa	Continua	>200 mg/L
Grosor de íntima media carotídea	Cuantitativa	Continua	Milímetros
Fuerza de presión manual	Cuantitativa	Continua	kilogramos (kg)
VARIABLES CONFUSORAS			
Edad	Cuantitativa	Continua	Años
Tensión Arterial	Cuantitativa	Continua	mmHg
Glucosa	Cuantitativa	Continua	mg/dl
Hemoglobina Glicada	Cuantitativa	Continua	% porcentaje
Triglicéridos	Cuantitativa	Continua	mg/dL
Colesterol Total	Cuantitativa	Continua	mg/dL
Colesterol HDL	Cuantitativa	Continua	mg/dL
Colesterol LDL	Cuantitativa	Continua	mg/dL

6.3.- Análisis Estadístico:

Se analizaron las características de los individuos con estadística descriptiva. La comparación entre controles sanos y pacientes con DM2 se realizó mediante pruebas de U de Mann Whitney o T de Student para grupos independientes, según corresponda. Se empleó un ANOVA de una vía no paramétrico (Kruskal Wallis) y la prueba post hoc LSD, para comparar de acuerdo a las clasificaciones según el control glucémico, daño renal, riesgo cardiovascular y fuerza de presión manual. Las correlaciones se analizaron empleando la correlación de Pearson. Se utilizaron los softwares Statistica de StatSoft, Inc (v5.5), GraphPad Prism para Windows (v8.0.2) y software de análisis de citometría de flujo Kaluza Analysis (Beckman Coulter Life Sciences v2.1) para los análisis. $p < 0.05$ considerada como significativo.

6.4.- Consideraciones Éticas:

El protocolo cumple con la Ley General de Salud, en su Título Quinto de Investigación para la Salud, Capítulo Único en: Artículos 96 en sus fracciones I, II, III y V; artículo 98 fracciones I, II, III, IV, V, VI; artículo 103 y del Título Segundo, Capítulo I, Artículo 16. Así como con las normativas establecidas en el Código de Helsinki de la Investigación Científica en Humanos, de la Asamblea de la Asociación Médica Mundial.

Los resultados de esta investigación se presentarán en publicaciones científicas y/o en congresos científicos, sin que la identidad de cada participante sea revelada. El estudio no representó riesgo superior al mínimo, se garantizará la confidencialidad de los datos (**ANEXO 2**).

El Proyecto de Investigación cuenta con la aprobación del Comité de Bioética Institucional (**CIBIUG-P04-2016 ANEXO 3**) y es parte de un estudio principal el cual pertenece a la Línea de Investigación: Procesos inflamatorios en las enfermedades metabólicas y que forma parte de la Líneas de Generación y/o aplicación del conocimiento: Biología Molecular y Celular en las Enfermedades Crónico Degenerativas y la Reproducción, Enfermedades Metabólicas y Degenerativas (diabetes e hipertensión) pertenecientes al Cuerpo Académico Consolidado de Metabolismo y Reproducción.

VII.- RESULTADOS

Un total de 43 participantes (19 sujetos sanos, 12 mujeres y 7 hombres, y 24 pacientes con DM2, 20 mujeres y 4 hombres) fueron incluidos en el estudio. Se muestra que los pacientes con DM2 mostraron diferencias significativas, se observa mayor edad ($p= 0.001$), peso ($p= 0.001$), índice de masa corporal ($p= 0.001$), grasa corporal ($p= 0.001$), circunferencia de cintura ($p= 0.001$), circunferencia de cadera ($p= 0.001$), circunferencia de cuello ($p= 0.05$), IMT ($p= 0.05$), así como en las concentraciones de séricas de glucosa ($p= 0.001$), HbA_{1c} ($p= 0.001$) y triglicéridos ($p= 0.005$), así como en el índice albúmina/creatinina ($p= 0.01$). Por el contrario, la fuerza de presión manual ($p= 0.01$) y la creatinina sérica ($p= 0.005$) fueron bajos en comparación con los controles sanos ($p= 0.05$) (**Tabla 1**).

Tabla 1. Características clínicas de los grupos de estudio.

Variable	Control (n=19)	DM2 (n=24)	T	p
Género (%)				
Mujer	12 (63 %)	20 (83 %)		
Hombre	7 (17 %)	4 (17 %)		
Edad (años)	35±8.6	45.9±6.6	-4.70	2.9E-05
Grasa corporal (%)	23.3±9.6	37.6±6.6	-5.75	9.7E-07
Músculo (%)	44.6±7.7	43.1±5.1	0.76	N/S
Cintura (cm)	77.6±7.4	97.2±10.6	-6.80	3.1E-08
Cadera (cm)	95.9±5.7	105.4±8.9	-4.00	<0.0002
Cuello (cm)	35±2.7	37±3.1	-2.25	<0.02
Presión Arterial (mm/Hg)	83.1±5.3	86.1±5.5	-1.77	N/S
Fuerza manual (Kg)	36±28	19±16	2.55	<0.01
IMT (mm)	0.48±0.06	0.53±0.08	-2.20	<0.03
Glucosa (mg/dl)	88±7	160±70	-4.45	6.2E-05
HbA _{1c} (%)	5.7±0.6	7.8±1.7	-3.65	<0.0003
Colesterol (mg/dl)	180±35	190±41	-0.90	N/S
HDL (mg/dl)	42±11	38±9	1.28	N/S
No-HDL (mg/dl)	138±32	153±37	-1.34	N/S
Triglicéridos (mg/dl)	100±85	199±133	-2.83	<0.007
Creatinina (mg/dl)	0.90±0.14	0.79±0.11	2.72	<0.009
eFG (ml/min)	87.4±11.8	87.4±12.4	-0.01	N/S
Microalbuminuria (mg/L)	24.1±6.1	28.7±15.2	-1.17	N/S
Índice Alb/Creat	14.9±11.4	29.7±21.4	-2.58	<0.01

Prueba T de Student. $p<0.05$. eFG: Estimación de la Filtración Glomerular, IMT: Grosor de íntima media carotídea.

Tabla 2. Valores de Intensidad media de fluorescencia en RAGE y ligandos de monocitos y neutrófilos de los grupos de estudio.

	Control (n=19)	DM2 (n=24)	T	p
Monocitos Proinflamatorios (CD14⁺CD16⁺⁺)				
RAGE (%)	81.2±24	88.5±18.5	1.08	N/S
S100A8/9 (IMF)	5930±2052	7967±8886	0.97	N/S
S100A12 (IMF)	3747±3450	5121±6988	0.75	N/S
S100B (IMF)	10606±7355	12548±7782	0.80	N/S
HMGB1 (IMF)	2511±1292	2492±918	-0.05	N/S
Monocitos Intermedios (CD14⁺CD16⁺)				
RAGE (%)	92.5±13	87.8±18.3	-0.92	N/S
S100A8/9 (IMF)	14020±10914	20572±22288	1.16	N/S
S100A12 (IMF)	7273±4471	9251±7282	1.00	N/S
S100B (IMF)	8291±4723	11821±5622	2.15	<0.03
HMGB1 (IMF)	2554±1164	2826±1077	0.76	N/S
Monocitos Antiinflamatorios (CD14⁺CD16⁻)				
RAGE (%)	75.7±38.8	78.6±28.5	0.27	N/S
S100A8/9 (IMF)	11297±4920	19730±20644	1.73	N/S
S100A12 (IMF)	7769±4709	10457±7221	1.32	N/S
S100B (IMF)	7187±3603	9474±4024	1.90	N/S
HMGB1 (IMF)	3113±1249	3033±1113	-0.18	N/S
Neutrófilos (PMN)				
S100A8/9 (IMF)	9917±11943	10240±12857	0.08	N/S
S100A12 (IMF)	5602±3146	12682±18566	1.59	N/S
S100B (IMF)	10487±16193	15059±21660	0.76	N/S
HMGB1 (IMF)	1434±668	1481±719	0.20	N/S

Prueba T de Student. p<0.05. IMF: Intensidad Media de Fluorescencia

Niveles de S100B (IMF) fueron mayores en monocitos intermedios de pacientes con DM2.

La expresión de S100B en monocitos intermedios (CD14⁻CD16⁺) fue mayor en pacientes con DM2 (11821±5622 IMF) en comparación con los controles sanos (8291±4723 IMF; p=0.03) (**Fig. 1**). En los monocitos proinflamatorios (CD14⁻CD16⁺⁺) y antiinflamatorios (CD14⁺CD16⁻), así como en neutrófilos (PMN); no encontramos diferencias significativas.

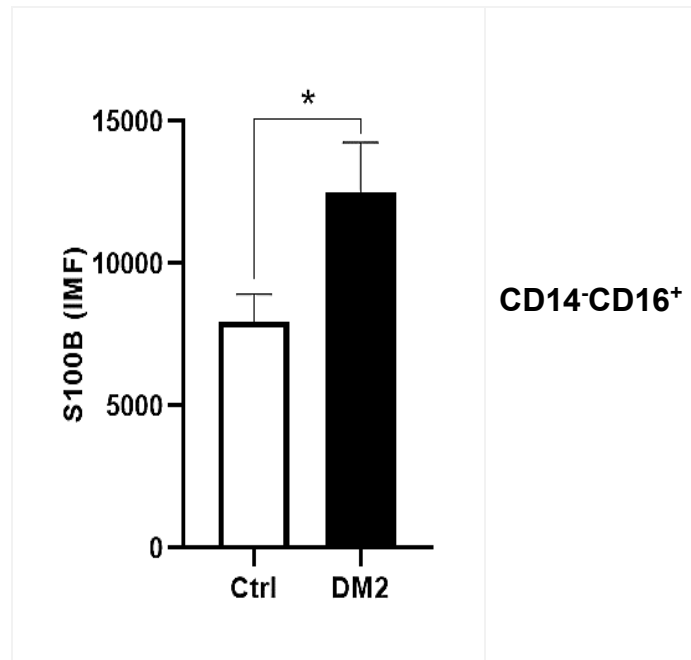


Figura 1. Expresión de S100B en monocitos de controles sanos y pacientes con DM2. Las barras muestran la intensidad media de fluorescencia (IMF) de S100B en Monocitos Intermedios (IM): CD14⁻CD16⁺. Medias comparadas con Kruskal-Wallis y *post hoc* LSD. p<0.05*. Barras blancas: Controles sanos (n=19), Barras negras: DM2 (n=24).

Características clínicas de los subgrupos de estudio clasificados de acuerdo con el control glucémico.

Se estratificaron a los pacientes con DM2 en 3 subgrupos según su control glucémico. Encontramos diferencias significativas en la edad siendo mayor en el grupo con DM2 de buen control en comparación del grupo control ($p= 0.009$), así como en el grupo con DM2 con control regular ($p= 0.008$) y en el grupo con DM2 con mal control ($p= 0.001$); como se esperaba, el peso fue mayor en el grupo con DM2 de control regular ($p= 0.01$) y mal control ($p= 0.002$) con respecto al grupo control; así como el IMC en el grupo de DM2 con buen control ($p= 0.0008$), regular control ($p= 1.1E-05$) y mal control glucémico ($p= 2.7E-09$) en comparación con el grupo control. El porcentaje de grasa corporal fue mayor en el grupo con DM2 de buen control ($p= 0.004$), control regular ($p= 0.0001$) y mal control ($p= 3.8E-05$) en comparación con el grupo control (**Tabla 3**).

La circunferencia de cintura se observó mayor en el grupo de DM2 con buen control ($p=0.008$), control regular ($p= 1.5E-05$) y mal control ($p= 4.2E-08$) en comparación con el grupo control, además; en el grupo de pacientes con DM2, ésta se observó mayor en los pacientes que tenían un mal control glucémico ($p=0.03$) en comparación con los que tenían un buen control. La circunferencia de cadera fue mayor en el grupo con DM2 con regular control ($p=0.01$) y mal control ($p= 0.003$) en comparación con el grupo control. Encontramos también una mayor circunferencia de cuello en los pacientes con DM2 de mal control glucémico respecto al grupo control ($p=0.005$); así como una mayor circunferencia entre los pacientes con DM2 con mal control en comparación con los que tenían mal control ($p= 0.03$) (**Tabla 3**).

Para las concentraciones séricas de glucosa se observó mayor en el grupo de DM2 con mal control en comparación con el grupo de buen control ($p= 1.2E-05$) y los de control regular ($p= 8.2E-06$). El porcentaje de HbA_{1c} se observó mayor en el grupo de DM2 con mal control en comparación con los de buen control ($p= 4.7E-12$) y los de control regular ($p= 2.3E-06$). En los triglicéridos también observamos mayores concentraciones en los pacientes con DM2 con mal control

glucémico en comparación con el grupo control ($p= 0.005$). El índice albúmina/creatinina se observó mayor en los pacientes con DM2 de mal control glucémico respecto al grupo control ($p= 0.0009$) así mismo, en los pacientes con DM2, fue mayor en los que tenían mal control en comparación con los de buen control ($p= 0.03$) (**Tabla 3**).

Tabla 3. Características clínicas de los participantes según su control glucémico.

Variables	Control (n=19)	DM2 Buen control (n=5)	DM2 Regular control (n=8)	DM2 Mal control (n=11)	F	p
Edad (años)	35±8.6	45.6±7.4*	46.8±4.2*	45.4±8.0 ^ε	7.09	<0.0006
Grasa corporal (%)	23.3±9.6	36.0±6.7*	38.2±5.6*	37.8±7.8 ^ε	10.6	3.01E-05
Músculo (%)	44.6±7.7	40.7±3.8	42.1±5.8	44.9±4.8	0.78	N/S
Cintura (cm)	77.6±7.4	90.2±9.7*	96.5±13.2*	100.9±7.6 ^{εβ}	18.1	1.5E-07
Cadera (cm)	95.9±5.7	103±11.6	103.9±7.0*	107.5±9.3 ^ε	5.82	<0.002
Cuello (cm)	35±2.7	34.8±1.9	36.8±3.2	38.2±3.0 ^{εβ}	3.42	<0.02
Presión Arterial (mm/Hg)	83.1±5.3	84.6±5.0	86.6±7.4	86.4±4.3	1.15	N/S
Fuerza manual (Kg)	36±28	23±17.2	12.2±6.8	21±19.2	2.45	N/S
IMT (mm)	0.48±0.06	0.51±0.04	0.51±0.05	0.56±0.11	2.51	N/S
Tiempo diagnóstico (meses)	-	2.2±2.2	1.4±0.9	2.1±3.4	3.69	0.05
Glucosa (mg/dl)	88±7	108±10	120±27	212±71 ^{εβ¶}	24.9	3.4E-09
HbA _{1c} (%)	5.7±0.6	5.9±0.08	6.7±0.3*	8.9±1.3 ^{εβ¶}	33.6	6.5E-11
Colesterol (mg/dl)	180±35	209±51	175±34	193±40	1.15	N/S
HDL (mg/dl)	42±11	39±14	38±7	38±9	0.54	N/S
No-HDL (mg/dl)	138±32	170±38	137±34	156±38	1.64	N/S
Triglicéridos (mg/dl)	100±85	189±129	164±39	229±175 ^ε	3.15	<0.03
Creatinina (mg/dl)	0.90±0.14	0.78±0.14	0.8±0.11	0.8±0.10	2.39	N/S
Microalbuminuria (mg/L)	87.4±11.8	22.7±4.4	28.7±17.3	31.5±17	1.03	N/S
Índice Albúm/Creatinina	14.9±11.4	19.0±9.6	23.8±14.2	38.8±26.4 ^{εβ}	4.44	<0.009
eFG (ml/min)	87.4±11.8	87.4±16.9	86±11.2	88.5±12.2	0.06	N/S

Prueba ANOVA de una vía no paramétrica (Kruskal-Wallis) y *post hoc* LSD, $p<0.05$

* Diferencias significativas entre DM2 con buen control glucémico respecto a grupo control.

• Diferencias significativas entre DM2 con regular control glucémico respecto a grupo control.

^ε Diferencias significativas entre DM2 con mal control glucémico respecto a grupo control.

^β Diferencias significativas entre DM2 con buen control glucémico respecto a DM2 con mal control glucémico.

[¶] Diferencias significativas entre DM2 con regular control glucémico respecto a DM2 con mal control glucémico.

eFG: Estimación de la Filtración Glomerular, IMT: Grosor de Íntima Media carotídea.

Buen control: <6.2%; control regular: 6.3-7.5%; mal control: >7.5%

Niveles de RAGE (%), S100A8/9 y S100A12 (IMF) fueron mayores en monocitos y de pacientes con DM2 con buen control glucémico.

En monocitos proinflamatorios (CD14⁻CD16⁺⁺), la expresión de RAGE fue mayor en pacientes con DM2 con buen control glucémico (96.6±8.8 %) en comparación de los controles sanos (87.4±5.3%; p=0.00002) (**Fig. 2A**), en S100A8/9 fue mayor en pacientes con DM2 con buen control glucémico (18337±3539 IMF) en comparación de los controles sanos (6480±2134 IMF; p=0.0002) (**Fig. 2B**).

La expresión de S100A12 también fue mayor en pacientes con DM2 con buen control glucémico (12096±2997 IMF) en comparación de los controles sanos (3703±1807 IMF; p=0.02) (**Fig. 2C**). En la expresión de S100B y HMGB1 no encontramos diferencias significativas.

En monocitos intermedios (CD14⁺CD16⁺) la expresión de S100A8/9 fue mayor en los pacientes con DM2 con buen control glucémico (29162±9245 IMF) en comparación de los controles sanos (15616±5575 IMF; p=0.001) (**Fig. 2D**), mientras que para RAGE y los otros ligandos no encontramos diferencias significativas.

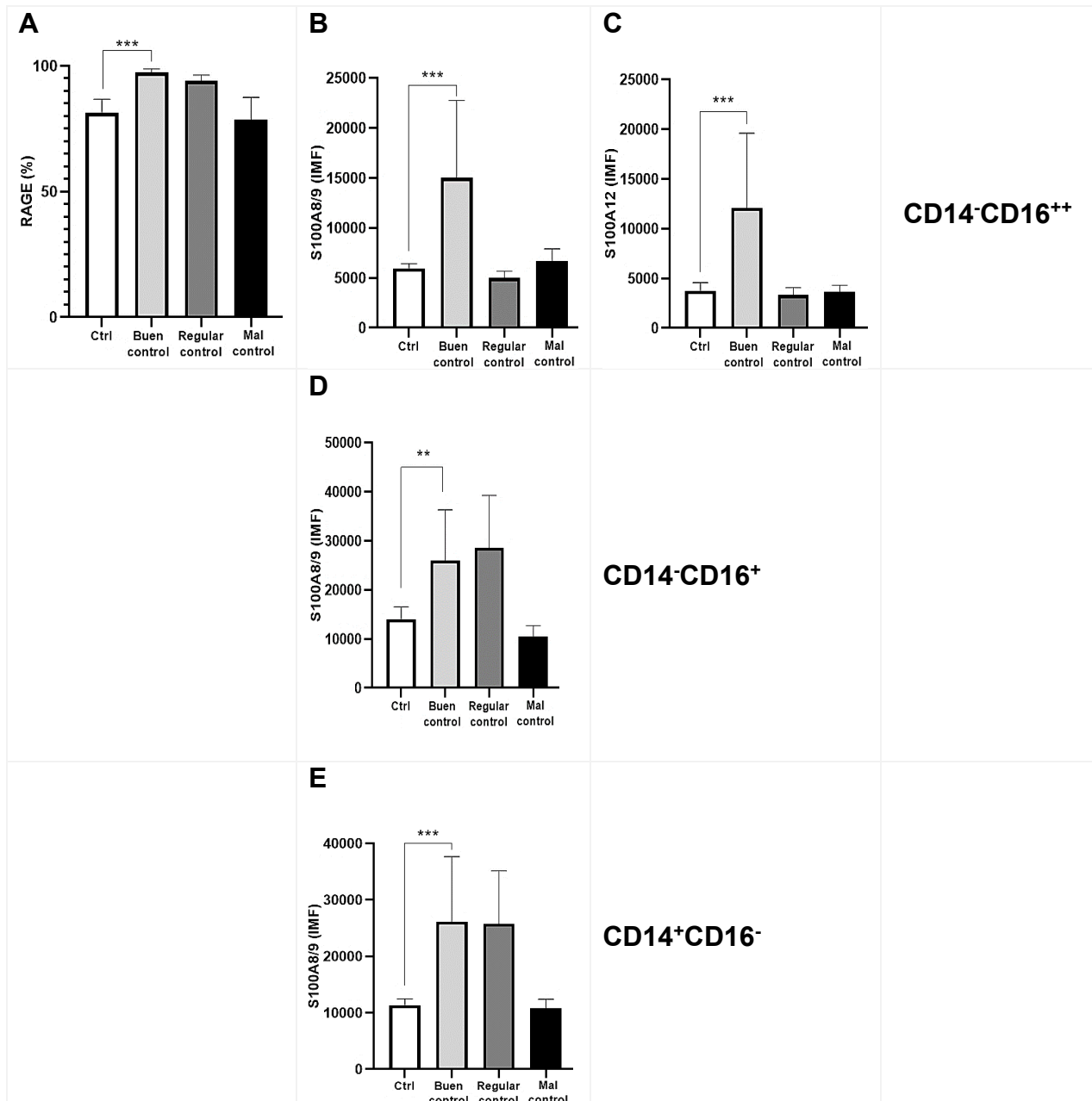
En monocitos antiinflamatorios (CD14⁺CD16⁻) la expresión de S100A8/9 fue mayor en pacientes con DM2 con buen control glucémico (29715±8347 IMF) en comparación de los controles sanos (12291±5033 IMF; p=0.00006) (**Fig. 2E**), mientras que para RAGE y los otros ligandos no encontramos diferencias significativas.

Niveles de S100A8/9, S100A12 y S100B (IMF) fueron mayores en neutrófilos de pacientes con DM2 con buen y regular control glucémico.

La expresión de S100A8/9 en neutrófilos (PMN) fue mayor en los pacientes que tenían un control regular (25716±6499 IMF; p=0.02) en comparación con los que tenían un mal control glucémico (5002±6499 IMF) en comparación con (**Fig. 2F**).

S100A12 fue mayor en pacientes con DM2 con buen control glucémico (14535±8193 IMF) en comparación de los controles sanos (6785±4940 IMF; p=0.03) (**Fig. 2G**).

La expresión de S100B fue mayor en pacientes con DM2 con regular control glucémico (32332±10638 IMF) en comparación con los que tenían un buen control (25228±11894 IMF; p=0.04) (**Fig. 2H**). En la expresión de HMGB1 no encontramos diferencias significativas.



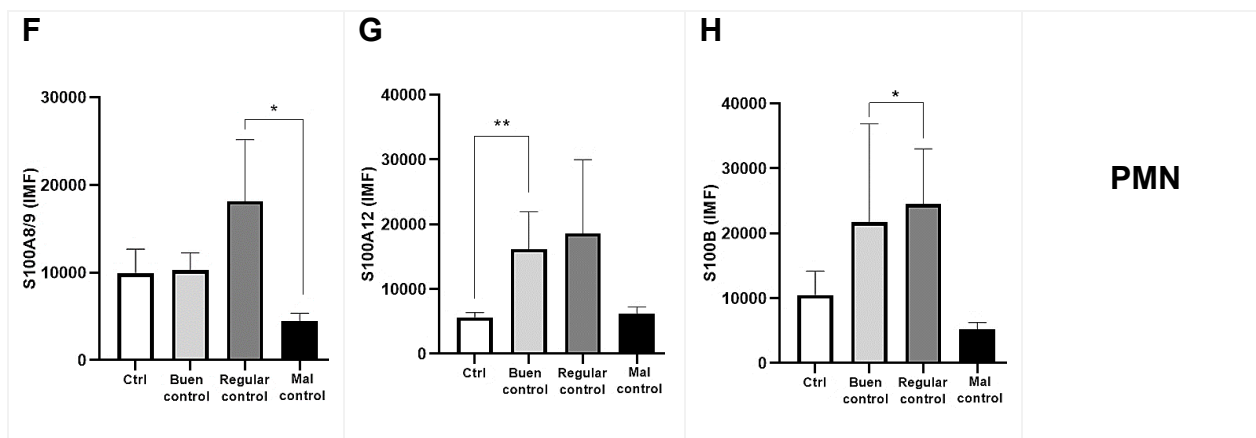


Figura 2. Expresión de RAGE y ligandos en monocitos de controles sanos y pacientes con DM2 estratificados conforme su control glucémico. Las barras muestran el porcentaje de RAGE y la intensidad media de fluorescencia (IMF) de los ligandos en subpoblaciones de monocitos y en neutrófilos. Medias comparadas con Kruskal-Wallis y *post hoc* LSD. $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$, $p < 0.001^{***}$. Barras Blancas: Controles sanos (n=19), Barras Gris claro: DM2 buen control (n=5), Barras Gris oscuro: DM2 control regular (n=8), Barras Negras: DM2 mal control (n=11). Monocitos proinflamatorios: CD14⁺CD16⁺⁺, Monocitos Intermedios: CD14⁺CD16⁺, Monocitos antiinflamatorios: CD14⁺CD16⁻, Neutrófilos: PMN.

Características clínicas de los subgrupos de estudio según daño renal de pacientes con DM2.

Se estratificó a los pacientes con DM2 de acuerdo con la presencia de daño renal, observamos mayor edad en los pacientes con DM2 sin daño renal ($p=0.002$) y en los de DM2 con daño en comparación con el grupo control ($p= 2.3E-05$) (**Tabla 4**).

El peso también fue mayor en los pacientes con DM2 sin daño renal ($p=0.002$) y en los pacientes con DM2 con daño renal ($p=0.01$) comparados con el grupo control, al igual que el IMC, observándose mayor en los pacientes con DM2 sin daño renal ($p= 6.7E-07$) y DM2 con daño renal ($p= 1.3E-05$) comparados con el grupo control (**Tabla 4**).

El porcentaje de grasa se observó mayor en los pacientes con DM2 sin daño renal ($p= 7.5E-06$) y en los pacientes con DM2 con daño renal ($p=0.0001$) comparados con el grupo control, al igual que en la circunferencia de cintura, se observó mayor en los pacientes con DM2 sin daño renal ($p= 1.3E-05$) y DM2 con daño renal ($p= 5.2E-05$) comparados con el grupo control (**Tabla 4**).

La circunferencia de cadera también fue mayor en los pacientes con DM2 sin daño renal ($p=0.0002$) y con daño renal ($p=0.02$) comparados con el grupo control (**Tabla 4**).

Las concentraciones séricas de glucosa fueron mayores en el grupo de DM2 sin daño renal ($p=0.004$) y con daño renal ($p=0.0008$) en comparación del grupo control. El porcentaje de HbA_{1c} se observó mayor en el grupo de DM2 sin daño renal ($p=0.005$) y DM2 con daño renal ($p=0.0004$) comparados con el grupo control (**Tabla 4**).

Los triglicéridos fueron mayores en el grupo con DM2 con daño renal en comparación con el grupo control ($p=0.01$). La microalbuminuria se observó menor en los pacientes con DM2 sin daño renal en comparación del grupo control ($p=0.04$), mientras que fue mayor en los pacientes con DM2 con daño renal comparados con el grupo control ($p=0.001$); mientras que entre los pacientes con DM2, esta fue mayor en los pacientes con daño, en comparación con los que no tenían daño renal ($p=7.9E-06$) (**Tabla 4**).

El índice albúmina/creatinina se observó mayor en los pacientes con DM2 sin daño renal, comparados con el grupo control ($p=0.001$) y; en los pacientes con DM2, fue mayor en los pacientes que tenían daño renal, en comparación con los que no tenían daño ($p=0.01$) (**Tabla 4**).

Por el contrario, se observó menor fuerza de presión manual en los pacientes con DM2 sin daño renal ($p=0.03$) y DM2 con daño renal ($p=0.03$) comparados con el grupo control, así como en la creatinina sérica, que fue menor en los pacientes con DM2 sin daño renal, comparados con el grupo control ($p=0.007$) (**Tabla 4**).

Tabla 4. Características clínicas de sujetos sanos y pacientes con DM2 clasificados de acuerdo con el daño renal.

Variable	Control (n=19)	DM2 Sin daño renal (n=9)	DM2 Con daño renal (n=15)	F	P
Edad (años)	35±8.6	43.9±7.6*	47.1±5.5•	12.4	6.7E-05
Grasa corporal (%)	23.3±9.6	40.0±5.3*	35.3±7.2•	15.8	9.4E-06
Músculo (%)	44.6±7.7	42.5±3.3	43.2±6.1	0.36	N/S
Cintura (cm)	77.6±7.4	98.4±11.2*	94.7±11.9•	16.1	7.9E-06
Cadera (cm)	95.9±5.7	108.6±9.7*	102.6±8.0•	8.65	<0.0007
Cuello (cm)	35±2.7	36.5±2.6	37.0±3.6	1.57	N/S
Presión Arterial (mm/Hg)	83.1±5.3	88.4±6.3*	84.8±4.4	3.77	<0.03
Fuerza manual (Kg)	36±28	17±14*	19±16•	3.41	<0.04
IMT (mm)	0.48±0.06	0.52±0.07	0.53±0.10	1.53	N/S
Años de diagnóstico	-	2.5±3.7	1.38±1.17	5.56	-
Glucosa (mg/dl)	88±7	154±78*	158±66•	7.96	<0.001
HbA _{1c} (%)	5.7±0.6	7.3±1.7*	7.6±1.5•	8.49	<0.0008
Colesterol (mg/dl)	180±35	192±52	189±32	0.67	N/S
HDL (mg/dl)	42±11	40±11	37±7	0.91	N/S
No-HDL (mg/dl)	138±32	152±43	152±33	1.18	N/S
Triglicéridos (mg/dl)	100±85	174±110	208±147•	3.53	<0.03
Creatinina (mg/dl)	0.90±0.14	0.82±0.09	0.78±0.12•	4.17	<0.02
eFG (ml/min)	87.4±11.8	82.0±11.0	90.7±12	1.62	0.20
Índice Alb/creat	14.9±11.4	17.7±14.4	36.1±22.5* ^ε	6.49	<0.003
Microalbuminuria (mg/L)	24.1±6.1	16.3±7.8*	36.6±13.0* ^ε	14.2	2.3E-05

Prueba ANOVA de una vía no paramétrica (Kruskal-Wallis) y *post hoc* LSD, p<0.05

* Diferencias significativas entre DM2 sin daño renal respecto a grupo control.

• Diferencias significativas entre DM2 con daño renal respecto a grupo control.

^ε Diferencias significativas entre DM2 sin daño renal respecto a DM2 con daño renal.

Alb/Creat: índice albúmina/creatinina, eFG: Estimación de la Filtración Glomerular, IMT: Grosor de íntima Media carotídea.

Tabla 5. Valores de intensidad media de fluorescencia de RAGE y ligandos en monocitos y neutrófilos de acuerdo con el daño renal en los grupos de estudio.

	Control (n=19)	DM2 Sin daño renal (n=9)	DM2 Con daño renal (n=15)	F	P
Monocitos Proinflamatorios (CD14-CD16++)					
RAGE (%)	82.5±15.3	88.2±26.6	82.2±13.3	1.11	0.39
S100A8/9 (IMF)	5960±8551	2205±14811	15841±7405	3.46	0.11
S100A12 (IMF)	1793±7149	1943±12382	10605±6191*	3.07	0.13
S100B (IMF)	10963±5027	4963±8707	13952±4354	6.63	<0.03
HMGB1 (IMF)	3508±833	2409±1443	3468±722	3.59	0.10
Monocitos Intermedios (CD14-CD16+)					
RAGE (%)	90.4±5.7	100±9.9	79.1±4.9	1.29	0.35
S100A8/9 (IMF)	13380±12705	2558±22006	47908±11003	1.99	0.23
S100A12 (IMF)	4212±5162	2537±8940	11624±4470*	65.1	<0.0002
S100B (IMF)	5799±2189	7669±3791	13072±1896	0.73	0.52
HMGB1 (IMF)	4059±898	2970±1556	3491±778	1.60	0.28
Monocitos Antiinflamatorios (CD14+CD16-)					
RAGE (%)	64±22.8	98.9±39.6	73.8±19.8	3.18	0.12
S100A8/9 (IMF)	12210±12742	2518±22070	44373±11035	4.56	0.07
S100A12 (IMF)	3789±4846	2279±8394	10589±4197*	31.1	<0.001
S100B (IMF)	4824±2202	6464±3814	12927±1907	0.87	0.47
HMGB1 (IMF)	3693±756	2207±1310	3370±655	1.81	0.25
Neutrófilos (PMN)					
S100A8/9 (IMF)	29172±13561	27882±23489	26972±11744	3.81	0.09
S100A12 (IMF)	5171±17235	19409±29851	28150±14926	3.39	0.11
S100B (IMF)	31313±19193	42596±33243	52049±16621	1.12	0.39
HMGB1 (IMF)	2196±490	33243±3690	16621±2105	1.21	0.37

Prueba ANOVA de una vía no paramétrica (Kruskal-Wallis) y *post hoc* LSD, $p < 0.05$. IMF: Intensidad Media de Fluorescencia

* Diferencias significativas entre DM2 sin daño renal respecto a DM2 con daño renal.

Niveles de S100A12 y S100B (IMF) fueron mayores en monocitos de pacientes con DM2 con daño renal.

En monocitos proinflamatorios (CD14⁻CD16⁺⁺), la expresión de S100B fue mayor en los pacientes con DM2 con daño renal (13952±4354 IMF) en comparación de los pacientes con DM2 que no tenían daño (4963±8707 IMF; p=0.03) (**Fig. 3A**). En la expresión de RAGE y los demás ligandos no encontramos diferencias significativas.

En monocitos intermedios (CD14⁺CD16⁺) la expresión de S100A12 fue mayor en los pacientes con DM2 con daño renal (11623±4470 IMF) en comparación con los pacientes con DM2 sin daño (2537±8940 IMF; p=0.0002) (**Fig. 3B**), mientras que para RAGE y los otros ligandos no encontramos diferencias significativas.

En monocitos antiinflamatorios (CD14⁺CD16⁻) la expresión de S100A12 fue mayor en pacientes con DM2 con daño renal (10589±4197 IMF) en comparación con los pacientes con DM2 sin daño (2279±8394 IMF; p=0.001) (**Fig. 3C**), mientras que para RAGE y los otros ligandos no encontramos diferencias significativas.

Respecto a los neutrófilos no encontramos diferencias significativas en la expresión de ninguno de los ligandos.

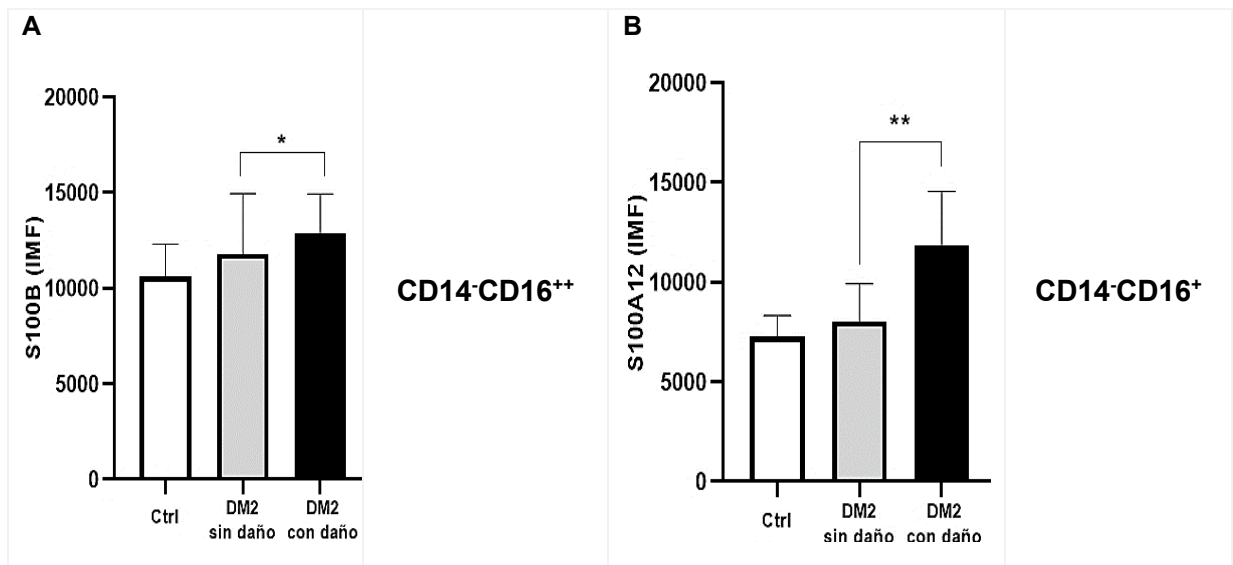




Figura 3. Expresión de RAGE y ligandos en monocitos de controles sanos y pacientes con DM2 estratificados conforme la presencia de daño renal. Las barras muestran el porcentaje de RAGE y la intensidad media de fluorescencia (IMF) de los ligandos en subpoblaciones de monocitos y en neutrófilos. Medias comparadas con Kruskal-Wallis y *post hoc* LSD. $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$, $p < 0.001^{***}$. Barras Blancas: Controles sanos (n=19), Barras Grises: DM2 sin daño renal (n=9), Barras Negras: DM2 con daño renal (n=15). Monocitos proinflamatorios: CD14-CD16⁺⁺, Monocitos Intermedios: CD14⁺CD16⁺, Monocitos antiinflamatorios: CD14⁺CD16⁻.

Características clínicas de los pacientes con DM2 en subgrupos clasificados de acuerdo con el daño renal y control glucémico.

Se sub-estratificaron a los pacientes con DM2 de acuerdo con daño renal y control glucémico, en donde se observó un mayor IMC en el grupo sin daño renal y con mal control glucémico en comparación con el de daño renal y buen control glucémico ($p=0.006$).

La microalbuminuria se observó mayor en los pacientes con daño renal y mal control glucémico, comparados con los que no tenían daño y un buen control glucémico ($p=0.02$), así como en los pacientes con daño renal y mal control glucémico, comparados con los que no tenían daño y mal control glucémico ($p=0.0003$) (**Tabla 6**).

Tabla 6. Características clínicas de pacientes con DM2 sub-estratificados de acuerdo con daño renal y control glucémico.

Variables	DM2 sin daño renal (n=15)		DM2 con daño renal (n=9)		F	p
	Buen Control Glucémico (n=3)	Mal Control Glucémico (n=6)	Buen Control Glucémico (n=2)	Mal Control Glucémico (n=13)		
Edad (años)	43.6±9.5	44.1±8.2	48.5±3.5	46.9±5.8	0.42	N/S
Grasa corporal (%)	39.8±5.3	42.1±2.5	30.2±3.8	36.1±7.3	2.41	N/S
Músculo (%)	42.2±4.6	43.4±2.8	38.6±0.9	43.9±6.2	0.62	N/S
Cintura (cm)	96.4±7.0	103.8±5.3	81±0	96.8±11.4	2.92	0.05
Cadera (cm)	108.5±12.5	110.9±7.9	94.8±0.4	103.8±7.9	2.23	N/S
Cuello (cm)	35.9±1.2	37.6±2.4	33.3±1.8	37.6±3.5	1.41	N/S
Presión Arterial (mm/Hg)	83.3±5.7	90.7±5.9	86.6±4.7	84.5±4.5	2.43	N/S
Fuerza manual (Kg)	27.6±22.5	11.5±8.2	16±2.8	20±17.6	0.76	N/S
IMT (mm)	0.52±0.05	0.54±0.07	0.5±0	0.54±0.10	0.16	N/S
Años de diagnóstico	2.6±3.0	2.8±4.5	1.5±0.70	1.3±1.2	0.54	N/S
Glucosa (mg/dl)	112±6	187±88	103±13	167±67	1.31	N/S
HbA _{1c} (%)	5.9±0.05	8.3±1.58	6.05±0.70	7.94±1.53	2.97	0.05
Colesterol (mg/dl)	221±68	178±48	191±5	191±41	0.62	N/S
HDL (mg/dl)	40±19	39±8	37±2	36±8	0.18	N/S
No-HDL (mg/dl)	181±49	138±41	154±7	155±42	0.71	N/S
Triglicéridos (mg/dl)	189±154	182±102	190±136	211±153	0.06	N/S
Creatinina (mg/dl)	0.86±0.11	0.8±0.08	0.65±0.70	0.79±0.13	1.36	N/S
eFG (ml/min)	75.8±12.5	84.3±12.4	102.7±12.5	90.4±13.3	2.02	N/S
Microalbuminuria (mg/L)	19.6±2.0	13.7±9.3	27.4±0.5	38.0±13.4* ^ε	6.95	<0.002
Índice Alb/creat	18.0±13.3	19.3±16.7	20.5±2.8	38.5±23.3	1.79	N/S

Prueba ANOVA de una vía no paramétrica (Kruskal-Wallis) y *post hoc* LSD, p<0.05

*Diferencias significativas entre DM2 con daño renal y buen control glucémico respecto a DM2 sin daño renal y mal control glucémico.

• Diferencias significativas entre DM2 sin daño renal y buen control glucémico respecto a DM2 con daño renal y mal control glucémico.

^ε Diferencias significativas entre DM2 sin daño renal y mal control glucémico respecto a DM2 con daño renal y mal control glucémico.

Alb/Creat: índice albúmina/creatinina, eFG: Estimación de la Filtración Glomerular, IMT: Grosor de íntima Media carotídea.

Niveles de HMGB1 (IMF) fueron mayores en neutrófilos de pacientes con DM2 daño renal y mal control glucémico.

En los neutrófilos, la expresión de HMGB1 fue mayor en los pacientes con DM2 con daño renal y buen control glucémico (2853 ± 456 IMF) en comparación de los pacientes con DM2 que no tenían daño y tenían buen control glucémico (1423 ± 372 IMF; $p=0.009$) (**Fig. 4**). En la expresión de las proteínas S100 no encontramos diferencias significativas, al igual que en monocitos.

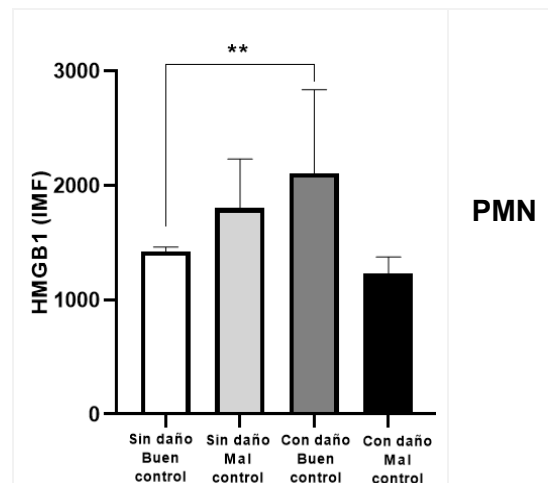


Figura 4. Expresión de HMGB1 en neutrófilos de controles sanos y pacientes con DM2 estratificados conforme a la presencia de daño renal y control glucémico. Las barras muestran la intensidad media de fluorescencia (IMF) de neutrófilos. Medias comparadas con Kruskal-Wallis y *post hoc* LSD. $p < 0.01^{**}$. Barras blancas: DM2 sin daño renal y buen control glucémico ($n=3$), Barras gris claro: DM2 sin daño renal y mal control glucémico ($n=6$), Barras gris oscuro: DM2 con daño renal y buen control glucémico ($n=2$), Barras negras: DM2 con daño renal y mal control glucémico ($n=13$). Neutrófilos: PMN

Características clínicas de los subgrupos de estudio según el riesgo cardiovascular en pacientes con DM2.

Los pacientes con DM2 se estratificaron en 2 subgrupos según el grosor de la íntima media carotídea (IMT) como factor de riesgo predictivo de riesgo cardiovascular. Los pacientes con DM2 y con elevado grosor de la IMT presentaron mayor edad comparados con el grupo control ($p=0.005$), así como los pacientes con DM2 sin riesgo también su edad fue mayor en comparación con el

grupo control ($p= 7.1E-06$). El peso fue mayor en los pacientes con DM2 sin riesgo CV ($p=0.0007$) y en los pacientes con DM2 con riesgo CV ($p=0.03$) comparados con el grupo control (**Tabla 7**).

El IMC se observó mayor en los pacientes con DM2 sin riesgo CV ($p= 5.8E-06$) y en los pacientes con DM2 con riesgo CV ($p= 6.7E-05$); ambos comparados con el grupo control. El porcentaje de grasa siguió el mismo patrón, observándose mayor en los pacientes con DM2 sin riesgo CV ($p= 2.4E-05$) y pacientes con DM2 con riesgo CV ($p=0.001$) comparados con el grupo control (**Tabla 7**).

La circunferencia de cintura fue mayor en los pacientes con DM2 sin riesgo CV ($p= 4.3E-05$) y en los pacientes con DM2 con riesgo CV ($p= 1.2E-05$) respecto al grupo control; observándose el mismo comportamiento en la circunferencia de cadera; la cuál fue mayor en los pacientes con DM2 sin riesgo CV ($p=0.0002$) y los pacientes con DM2 con riesgo CV ($p=0.007$) comparados con el grupo control (**Tabla 7**).

El IMT fue mayor en los pacientes con DM2 con riesgo CV ($p= 1.1E-06$) en comparación con los pacientes con DM2 sin riesgo CV. Las concentraciones séricas de glucosa se observaron mayores en los pacientes con DM2 sin riesgo CV ($p=0.01$) y en los pacientes con DM2 con riesgo CV ($p=0.006$) comparados con el grupo control; al igual que el porcentaje de HbA_{1c} fue mayor en los pacientes con DM2 sin riesgo CV ($p=0.01$) y en los pacientes con DM2 con riesgo CV ($p=0.0005$) respecto al grupo control (**Tabla 7**).

El colesterol se observó mayor en el grupo de DM2 sin riesgo CV en comparación con el grupo control ($p=0.02$); y fue menor en los pacientes con DM2 con riesgo CV comparados con los pacientes con DM2 sin riesgo CV ($p=0.003$). El colesterol No-HDL también fue mayor en los pacientes con DM2 sin riesgo CV comparados con el grupo control ($p=0.01$); y se observó menor en los pacientes con DM2 sin riesgo CV, comparados con los que si presentaban riesgo CV ($p=0.005$). El índice albúmina/creatinina fue mayor en los pacientes con DM2 sin riesgo CV comparados con el grupo control ($p=0.01$) (**Tabla 7**).

Tabla 7. Características clínicas de los controles sanos y pacientes con DM2 clasificados de acuerdo con el riesgo cardiovascular.

Variable	Control (n=19)	DM2 sin Riesgo CV (n=14)	DM2 con riesgo CV (n=10)	F	P
Edad (años)	35±8.6	48.5±6*	43.5±6.1•	14.0	2.4E-05
Grasa corporal (%)	23.3±9.6	38.8±5.3*	35.5±8.1•	12.9	4.4E-05
Músculo (%)	44.6±7.7	43.4±4.7	43±6	0.18	N/S
Cintura (cm)	77.6±7.4	95.6±10.1*	98.6±11.8•	16.8	4.9E-06
Cadera (cm)	95.9±5.7	107±8.7*	104.2±9.5•	9.36	<0.0004
Cuello (cm)	35±2.7	36.5±3.3	37.5±2.9	2.16	N/S
Presión Arterial (mm/Hg)	83.1±5.3	86.2±4.6	86.2±6.9	1.67	N/S
Fuerza manual (Kg)	36±28	17±13	22±20	2.64	N/S
IMT (mm)	0.47±0.06	0.48±0.02	0.61±0.08* ^ε	20.9	5.9E-07
Glucosa (mg/dl)	88±7	147±62*	163±71•	5.10	<0.01
HbA _{1c} (%)	5.7±0.6	7.1±1.4*	7.9±1.7•	7.99	<0.001
Colesterol (mg/dl)	180±35	210±40*	164±28 ^ε	5.42	<0.008
HDL (mg/dl)	42±11	41±10	34±7	1.98	N/S
No-HDL (mg/dl)	138±32	169±35*	130±31 ^ε	5.14	<0.01
Triglicéridos (mg/dl)	100±85	169±82	220±175	2.85	N/S
Creatinina (mg/dl)	0.90±0.14	0.8±0.12	0.8±0.10	2.64	N/S
Microalbuminuria (mg/L)	24.1±6.1	27.8±12.8	30.9±18.9	1.10	N/S
Índice Alb/creat	14.9±11.4	21.7±23.2*	33.6±20	4.66	<0.01
eFG (ml/min)	87.4±11.8	85.0±9.7	88.7±13.7	0.42	N/S

Prueba ANOVA de una vía no paramétrica (Kruskal-Wallis) y *post hoc* LSD, p<0.05

* Diferencias significativas entre DM2 sin riesgo CV respecto a grupo control.

• Diferencias significativas entre DM2 con riesgo CV respecto a grupo control.

^ε Diferencias significativas entre DM2 sin riesgo CV respecto a DM2 con riesgo CV.

CV: Cardiovascular, Alb/Creat: índice albúmina/creatinina, eFG: Estimación de Filtración Glomerular, IMT: Grosor de íntima Media carotídea.

Tabla 8. Valores de intensidad media de fluorescencia en RAGE y ligandos de monocitos y neutrófilos acuerdo con el riesgo cardiovascular en los grupos de estudio.

	Control (n=19)	DM2 sin Riesgo CV (n=14)	DM2 con Riesgo CV (n=10)	F	P
Monocitos Proinflamatorios (CD14⁺CD16⁺⁺)					
RAGE (%)	82.5±14.1	70.1±17.2	92.3±14.1*	10.2	<0.01
S100A8/9 (IMF)	5960±7090	25258±8683	5017±7090*	538.5	<0.000001
S100A12 (IMF)	1793±6011	18113±7362	2712±6011*	786.3	<0.000001
S100B (IMF)	10963±5231	15314±6407	10048±5231	4.97	0.06
HMGB1 (IMF)	3508±868	3317±1063	3216±868	3.24	0.12
Monocitos Intermedios (CD14⁺CD16⁺)					
RAGE (%)	90.4±6.9	77.3±8.5	87.3±6.9	3.67	0.10
S100A8/9 (IMF)	13380±16432	36625±20125	40313±16432	5.36	0.05
S100A12 (IMF)	4212±5495	11761±6730	8503±5495*	10.1	<0.01
S100B (IMF)	5799±2436	10625±2983	12902±2436	0.28	0.76
HMGB1 (IMF)	4059±888	3007±1088	3640±888	1.05	0.41
Monocitos Antiinflamatorios (CD14⁺CD16⁻)					
RAGE (%)	64±21.6	58.8±26.5	92.2±21.6	5.74	0.05
S100A8/9 (IMF)	12210±15987	36964±19580	35360±15987	4.26	0.08
S100A12 (IMF)	3789±5129	10892±6282	7617±5129*	7.43	<0.03
S100B (IMF)	4824±2632	10820±3224	12178±2632	0.32	0.73
HMGB1 (IMF)	3693±800	3010±980	3222±800	0.74	0.52
Neutrófilos (PMN)					
S100A8/9 (IMF)	29172±9595	6819±11751	40711±9595	2.96	0.14
S100A12 (IMF)	5171±15544	10039±19037	37311±15544*	9.17	<0.02
S100B (IMF)	31313±19251	46778±23577	52412±19251*	6.90	<0.03
HMGB1 (IMF)	2196±579	2003±710	2701±579	0.14	0.87

Prueba ANOVA de una vía no paramétrica (Kruskal-Wallis) y *post hoc* LSD, p<0.05. IMF: Intensidad Media de Fluorescencia

* Diferencias significativas entre DM2 sin riesgo CV respecto a DM2 con riesgo CV.

Niveles de RAGE (%), S100A8/9 y S100A12 (IMF) fueron mayores en monocitos de pacientes con DM2 sin riesgo cardiovascular.

En monocitos proinflamatorios (CD14⁻CD16⁺⁺), la expresión de RAGE (**Fig. 5A**) fue mayor en los pacientes con DM2 sin riesgo cardiovascular (91.6 ± 6.5 %) en comparación de los pacientes con DM2 con riesgo (85.7 ± 7.6 %; $p=0.01$). La expresión de S100A8/9 (**Fig. 5B**) fue mayor en los pacientes con DM2 sin riesgo cardiovascular (11324 ± 2867 IMF) en comparación de los pacientes con DM2 con riesgo (7221 ± 3311 IMF; $p=0.000001$). La expresión de S100A12 (**Fig. 5C**) también fue mayor en los pacientes con DM2 sin riesgo cardiovascular (8985 ± 2154 IMF) en comparación de los pacientes con DM2 que si tenían riesgo (3269 ± 2487 IMF; $p=0.000001$).

En monocitos intermedios (CD14⁺CD16⁺) la expresión de S100A12 fue mayor en los pacientes con DM2 sin riesgo cardiovascular (11761 ± 6730 IMF) en comparación con los pacientes con DM2 con riesgo cardiovascular (8503 ± 5495 IMF; $p=0.01$) (**Fig. 5D**), mientras que para RAGE y los otros ligandos no encontramos diferencias significativas.

En monocitos antiinflamatorios (CD14⁺CD16⁻) la expresión de S100A12 fue mayor en pacientes con DM2 sin riesgo cardiovascular (10892 ± 6282 IMF) en comparación con los pacientes con DM2 con riesgo (7617 ± 5129 IMF; $p=0.03$) (**Fig. 5E**). En la expresión de RAGE y los demás ligandos no encontramos diferencias significativas.

Niveles de S100A12 y S100B fueron mayores en neutrófilos de pacientes con DM2 con riesgo cardiovascular.

En los neutrófilos, la expresión de S100A12 fue mayor en los pacientes con DM2 con riesgo cardiovascular (37311 ± 15544 IMF) en comparación de los pacientes con DM2 sin riesgo cardiovascular (10039 ± 19037 IMF; $p=0.02$) (**Fig. 5F**). S100B fue mayor en los pacientes con DM2 con riesgo cardiovascular (29752 ± 9861 IMF) en comparación de los pacientes con DM2 sin riesgo cardiovascular (14738 ± 8540 IMF; $p=0.03$) (**Fig. 5G**).

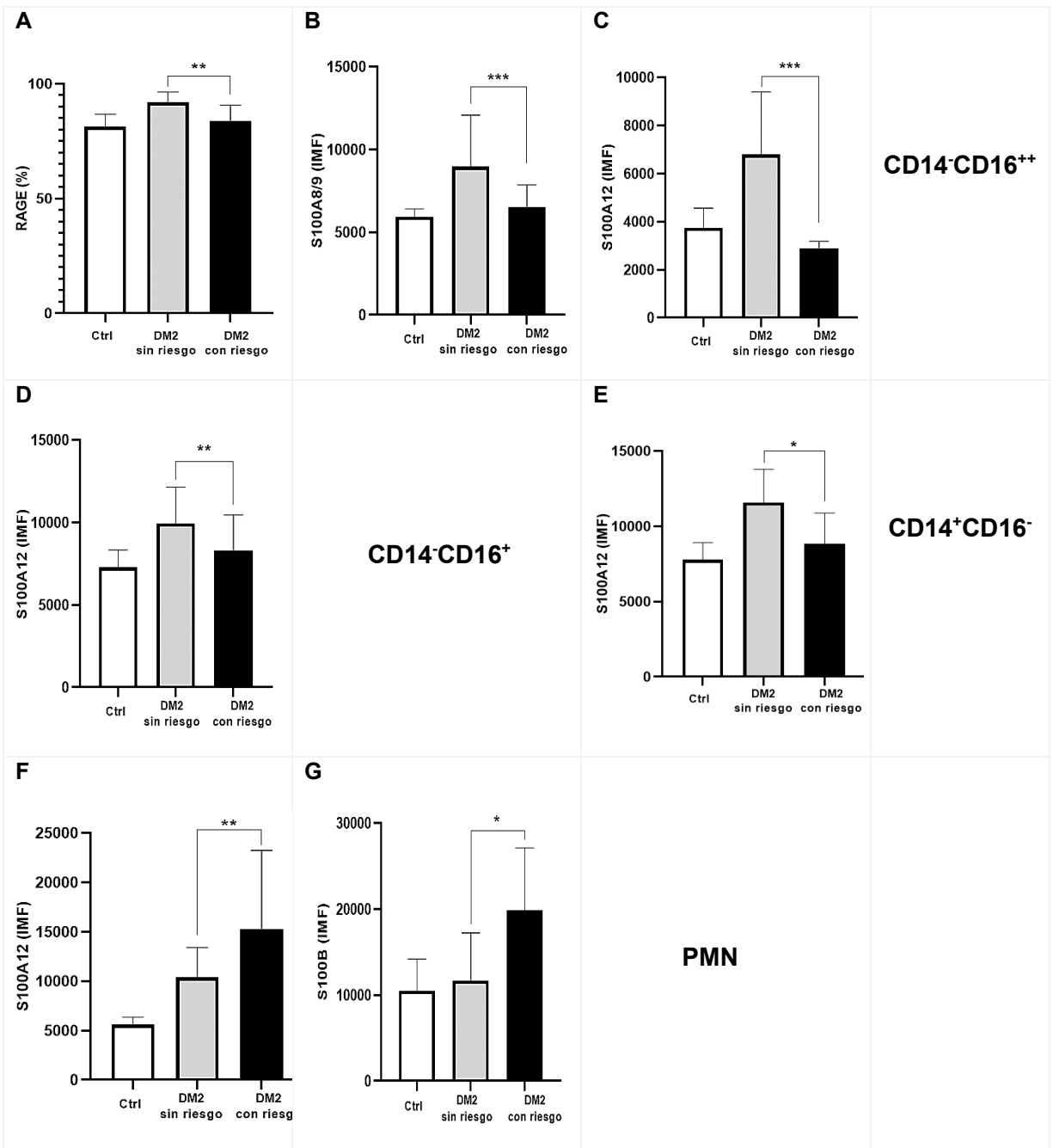


Figura 5. Expresión de RAGE y ligandos en monocitos y neutrófilos de controles sanos y pacientes con DM2 estratificados conforme a la presencia de riesgo cardiovascular. Las barras muestran el porcentaje de RAGE y la intensidad media de fluorescencia (IMF) de los ligandos en subpoblaciones de monocitos. Medias comparadas con Kruskal-Wallis y *post hoc* LSD. $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$, $p < 0.001^{***}$. Barras blancas: Controles sanos (n=19), Barras grises: DM2 sin riesgo cardiovascular (n=14), Barras negras: DM2 con riesgo cardiovascular (n=10). Monocitos proinflamatorios: CD14⁺CD16⁺⁺, Monocitos Intermedios: CD14⁺CD16⁺, Monocitos antiinflamatorios: CD14⁺CD16⁻, Neutrófilos: PMN

Características clínicas de los subgrupos de estudio según la fuerza de prensión manual de pacientes con DM2.

Se estratificó a los pacientes con DM2 de acuerdo con la fuerza de prensión manual, observamos mayor edad en los pacientes con DM2 con fuerza normal ($p=0.002$) y con fuerza disminuida en comparación con el grupo control ($p= 9.2E-05$). El peso también fue mayor en los pacientes con DM2 con fuerza normal ($p=0.0001$) y en los pacientes con DM2 con fuerza disminuida ($p=0.008$) comparados con el grupo control (**Tabla 9**).

El IMC fue mayor en los pacientes con DM2 de fuerza normal ($p= 4.3E-07$) y en los pacientes con DM2 con fuerza disminuida ($p= 6.8E-07$) comparados con el grupo control. En el porcentaje de grasa se observó el mismo patrón, ya que ésta fue mayor en los pacientes con DM2 con fuerza normal ($p=0.0003$) y en los pacientes con DM2 con fuerza disminuida ($p= 5.0E-06$) en comparación con el grupo control (**Tabla 9**).

La circunferencia de cintura fue mayor en los pacientes con DM2 con fuerza normal ($p= 8.3E-08$) y en los pacientes con DM2 con fuerza disminuida ($p= 2.1E-06$) comparados con el grupo control, además; en los pacientes con DM2, se observó mayor en los pacientes con DM2 de fuerza normal ($p=0.04$) comparados con los que la tenían disminuida (**Tabla 9**).

La circunferencia de cadera fue mayor en los pacientes con DM2 de fuerza normal ($p=0.0006$) y en los pacientes con DM2 con fuerza disminuida ($p=0.002$), comparados con el grupo control. En la circunferencia de cuello, se observó mayor en los pacientes con DM2 de fuerza normal comparados con el grupo control ($p=0.001$); mientras que en los pacientes con DM2 de fuerza normal, ésta fue mayor que en los pacientes con DM2 de fuerza disminuida ($p=0.02$) (**Tabla 9**).

El IMT fue mayor en los pacientes con DM2 con fuerza normal en comparación con el grupo control ($p=0.0008$) y fue menor en los pacientes con DM2 de fuerza disminuida, en comparación con los pacientes con DM2 de fuerza normal ($p=0.009$) (**Tabla 9**).

Las concentraciones séricas de glucosa fueron mayores en los pacientes con DM2 con fuerza normal ($p=0.009$) y en los pacientes con DM2 de fuerza disminuida ($p=0.0009.7$) comparados con el grupo control (**Tabla 9**).

El porcentaje de HbA_{1c} fue mayor en los pacientes con DM2 de fuerza normal ($p=0.0002$) y de los pacientes con DM2 de fuerza disminuida ($p=0.0004$) comparados con el grupo control. Respecto a los triglicéridos, estos fueron mayores en los pacientes con DM2 de fuerza normal, comparados con el grupo control ($p=0.002$) (**Tabla 9**).

El índice albúmina/creatinina fue mayor en los pacientes con DM2 de fuerza disminuida comparados con el grupo control ($p=0.004$). Por el contrario; la creatinina sérica se observó menor en los pacientes con DM2 con fuerza disminuida en comparación del grupo control ($p=0.001$), del mismo modo; se observó menor en los pacientes con DM2 de fuerza disminuida, en comparación con los pacientes con DM2 de fuerza normal ($p=0.03$) (**Tabla 9**).

Tabla 9. Características clínicas de los controles sanos y pacientes con DM2 clasificados de acuerdo con la fuerza de presión manual.

Variables	Control (n=19)	DM2 Fuerza Normal (n=8)	DM2 Fuerza Disminuida (n=16)	F	p
Edad (años)	35±8.6	45.2±8.2*	46.3±5.8*	10.8	<0.0001
Grasa corporal (%)	23.3±9.6	36.9±7.6*	37.9±6.4*	16.2	6.9E-06
Músculo (%)	44.6±7.7	47.2±5.6	41.1±3.4	3.06	0.05
Cintura (cm)	77.6±7.4	102.5±8.2*	94.5±10.9* ^ε	26.9	3.8E-08
Cadera (cm)	95.9±5.7	107.9±8.2*	104.1±9.3*	8.68	<0.0007
Cuello (cm)	35±2.7	39.0±3.1*	36.1±2.7 ^ε	5.72	<0.006
Presión Arterial (mm/Hg)	83.1±5.3	87.4±4.4	85.4±5.9	1.91	N/S
IMT (mm)	0.48±0.06	0.59±0.10*	0.50±0.06 ^ε	6.51	<0.003
Glucosa (mg/dl)	88±7	148±71*	165±71*	10.1	<0.0002
HbA _{1c} (%)	5.7±0.6	7.9±1.9*	7.4±1.4*	11.1	<0.0001
Colesterol (mg/dl)	180±35	179±29	196±45	0.91	N/S
HDL (mg/dl)	42±11	33.2±8.2	40±8.5	2.21	N/S
No-HDL (mg/dl)	138±32	146±32	156±40	1.10	N/S
Triglicéridos (mg/dl)	100±85	252±204*	173±73	5.52	<0.007
Creatinina (mg/dl)	0.90±0.14	0.87±0.11	0.75±0.09* ^ε	6.48	<0.003
Microalbuminuria (mg/L)	24.1±6.1	32.0±12.9	27.1±16.4	1.11	N/S
Índice Alb/creat	14.9±11.4	21.7±23.2	33.6±20.0*	4.66	<0.015
eFG (ml/min)	87.4±11.8	85.0±9.7	88.7±13.7	0.24	N/S

Prueba ANOVA de una vía no paramétrica (Kruskal-Wallis) y *post hoc* LSD, p<0.05

* Diferencias significativas entre DM2 con Fuerza Normal respecto a grupo control.

• Diferencias significativas entre DM2 con Fuerza Disminuida respecto a grupo control.

^ε Diferencias significativas entre DM2 con Fuerza Normal respecto a DM2 con Fuerza Disminuida.

Alb/Creat: índice albúmina/creatinina, eFG: Estimación de Filtración Glomerular, IMT: Grosor de Íntima Media carotídea.

Tabla 10. Valores de intensidad media de fluorescencia de RAGE y ligandos en monocitos y neutrófilos acuerdo con la fuerza de presión manual en los grupos de estudio.

	Control (n=19)	DM2 Fuerza Normal (n=8)	DM2 Fuerza Disminuida (n=16)	F	p
Monocitos Proinflamatorios (CD14⁺CD16⁺⁺)					
RAGE (%)	87.4±5.3	79.8±7.2	96±6.2*	13.1	<0.0001
S100A8/9 (IMF)	6480±2464	7740±3337	10935±2889	3.14	0.06
S100A12 (IMF)	3703±1873	3790±2536	8594±2196	3.30	0.05
S100B (IMF)	13239±2624	17718±3552	11412±3077	0.18	0.83
HMGB1 (IMF)	2803±376	2747±509	2980±441	1.91	0.17
Monocitos Intermedios (CD14⁺CD16⁺)					
RAGE (%)	95.9±3.9	86.7±5.2	91.5±4.5*	4.25	<0.02
S100A8/9 (IMF)	15616±5763	22984±7803	20840±6757	2.39	0.11
S100A12 (IMF)	7573±1617	7349±2190	12626±1897*	3.86	<0.03
S100B (IMF)	9788±1710	14218±2316	11139±2006	0.73	0.49
HMGB1 (IMF)	2763±338	3063±458	3297±397	0.20	0.81
Monocitos Antiinflamatorios (CD14⁺CD16⁻)					
RAGE (%)	79.9±9.4	75.8±12.8	87.5±11.1	2.92	0.07
S100A8/9 (IMF)	12291±5256	22923±7116	18769±6163*	5.88	<0.008
S100A12 (IMF)*	8118±1789	8323±2423*	13848±2098	5.61	<0.01
S100B (IMF)	8466±1257	10568±1702	8844±1474	0.31	0.73
HMGB1 (IMF)	3074±388	3029±525	3276±455	1.40	0.26
Neutrófilos (PMN)					
S100A8/9 (IMF)	12224±4795	14745±6493	13489±5623	0.10	0.89
S100A12 (IMF)	6785±5054	10512±6843	18514±5926	3.33	0.05
S100B (IMF)	14194±7454	17250±10093	24115±8741	2.35	0.11
HMGB1 (IMF)	1513±221	1438±299	1869±259	3.39	0.05

Prueba ANOVA de una vía no paramétrica (Kruskal-Wallis) y *post hoc* LSD, p<0.05. IMF: Intensidad Media de Fluorescencia

* Diferencias significativas entre DM2 con Fuerza Normal respecto a grupo control.

• Diferencias significativas entre DM2 con Fuerza Normal respecto a DM2 con Fuerza Disminuida.

Niveles de RAGE (%), S100A8/9 y S100A12 (IMF) fueron mayores en monocitos de pacientes con DM2 con fuerza de prensión manual disminuida.

En monocitos proinflamatorios (CD14⁺CD16⁺⁺), la expresión de RAGE (**Fig. 6A**) fue mayor en los pacientes con DM2 con fuerza de prensión disminuida (96±6.2 %) en comparación de los pacientes con DM2 con fuerza normal (79.8±7.2 %; p=0.0001). Respecto a la expresión de los ligandos, no encontramos diferencias significativas.

En monocitos intermedios (CD14⁺CD16⁺) la expresión de RAGE (**Fig. 6B**) fue mayor en los pacientes con DM2 con fuerza de prensión disminuida (91.5±4.5 %) en comparación con los pacientes con DM2 con fuerza normal (86.7±4.5 %; p=0.02).

La expresión de S100A12 (**Fig. 6C**), también fue mayor en los pacientes con DM2 con fuerza de prensión disminuida (12626±1897 IMF) en comparación con los pacientes con DM2 con fuerza normal (7349±2190 IMF; p=0.03).

Respecto a la expresión de S100A8/9, S100B y HMGB1 no encontramos diferencias significativas.

En monocitos antiinflamatorios (CD14⁺CD16⁻) la expresión de S100A8/9 fue menor en pacientes con DM2 con fuerza de prensión disminuida (18769±6163 IMF) en comparación con los pacientes con DM2 que tenían fuerza normal (22923±7116 IMF; p=0.008) (**Fig. 6D**).

Por el contrario, la expresión de S100A12 (**Fig. 6E**), fue mayor en pacientes con DM2 con fuerza de prensión disminuida (13848±2098 IMF) en comparación con los pacientes con DM2 que tenían fuerza normal (8323±2423 IMF; p=0.008).

En la expresión de RAGE, S100B y HMGB1 no encontramos diferencias significativas, al igual que en los neutrófilos.

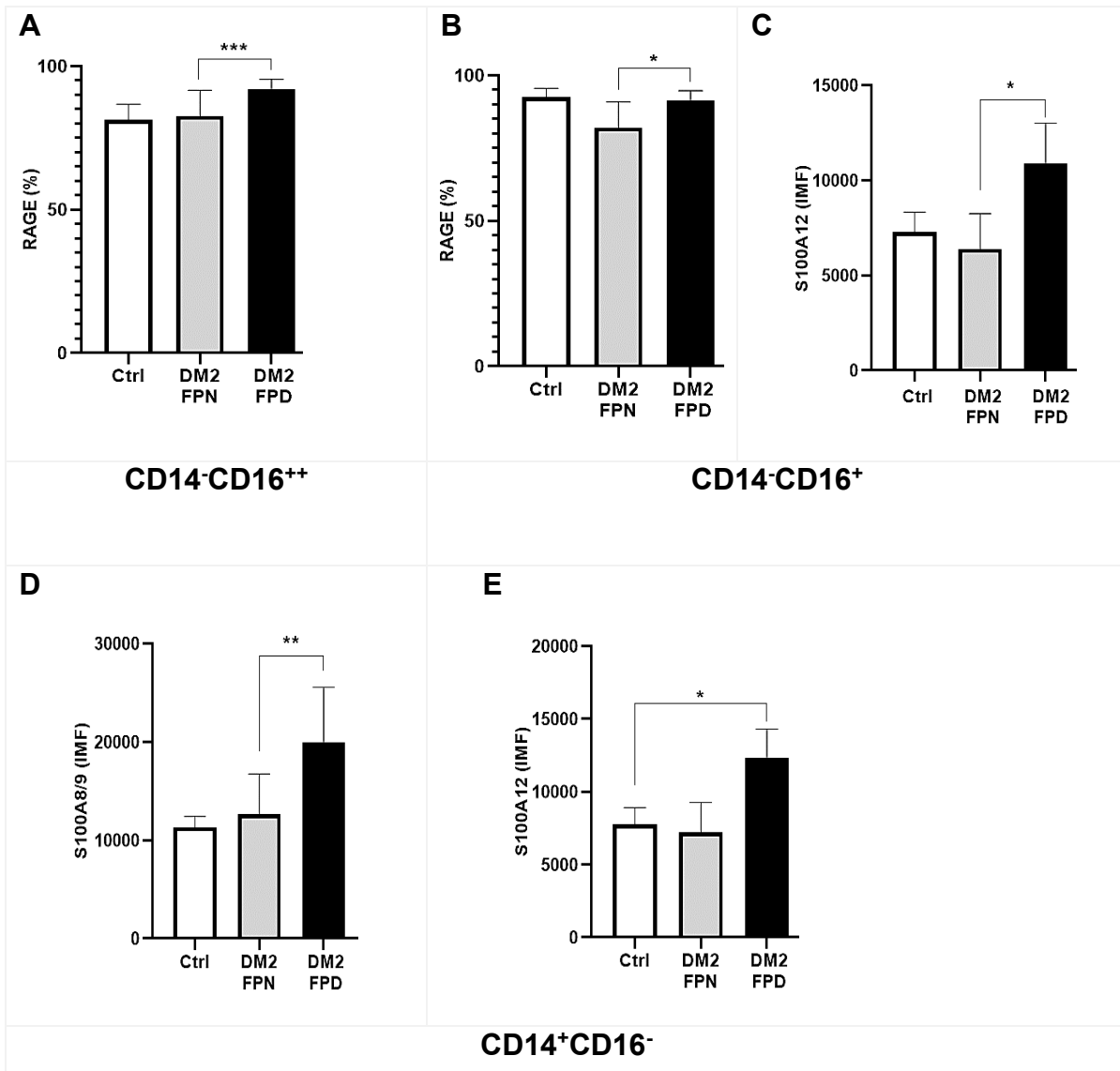


Figura 6. Expresión de RAGE y ligandos en monocitos de controles sanos y pacientes con DM2 estratificados conforme a la fuerza de presión manual. Las barras muestran el porcentaje de RAGE y la intensidad media de fluorescencia (IMF) de los ligandos en subpoblaciones de monocitos. Medias comparadas con Kruskal-Wallis y *post hoc* LSD. $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$, $p < 0.001^{***}$. Barras blancas: Controles sanos (n=19), Barras grises: DM2 con fuerza normal (n=8), Barras negras: DM2 con fuerza disminuida (n=16). Monocitos proinflamatorios: CD14⁻CD16⁺⁺, Monocitos Intermedios: CD14⁺CD16⁺, Monocitos antiinflamatorios: CD14⁺CD16⁻. FPN: Fuerza de presión manual normal >20 kg, FPD: Fuerza de presión manual disminuida <20 k.

Factores asociados al porcentaje de RAGE y a la expresión de sus ligandos.

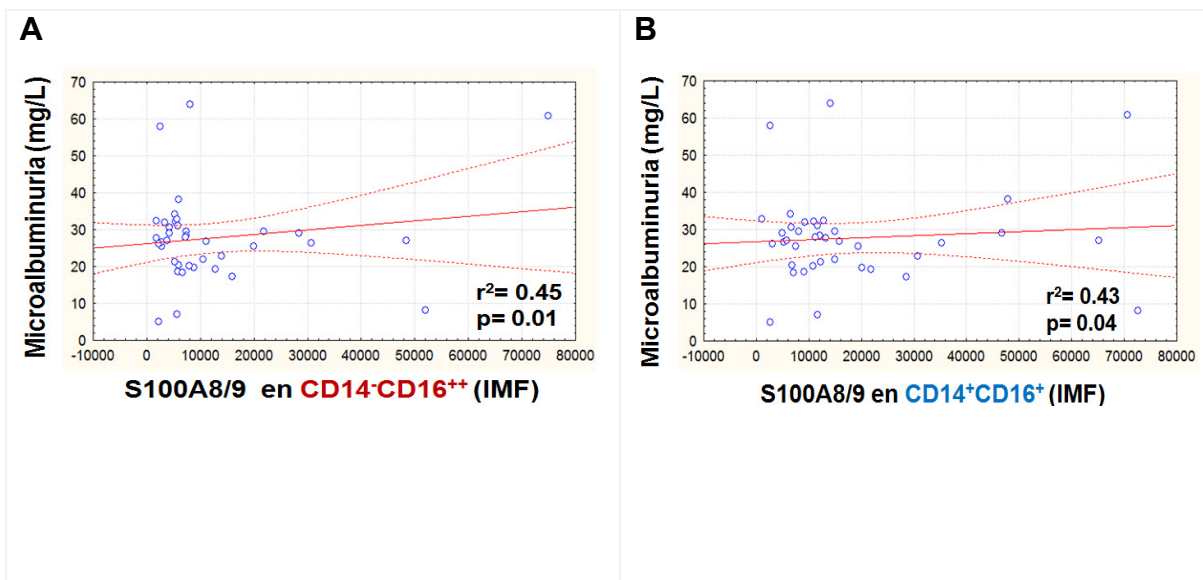
Se realizaron correlaciones bivariadas para examinar las asociaciones del porcentaje de RAGE y la expresión de sus ligandos con las variables antropométricas, metabólicas y bioquímicas en el grupo completo de sujetos sanos y pacientes con DM2.

La expresión de S100A8/9 en monocitos proinflamatorios (CD14⁻CD16⁺⁺) (**Fig. 7A**) e intermedios (CD14⁺CD16⁺) (**Fig. 7B**) se correlacionaron de forma positiva con la Albuminuria ($r=0.45$, $p=0.01$; $r=0.43$, $p=0.04$, respectivamente).

Hubo una relación entre la expresión de S100B en los monocitos proinflamatorios (CD14⁻CD16⁺⁺) con la estimación de la estimación de Filtración Glomerular ($r=0.42$, $p=0.04$) (**Fig. 7D**), al igual que en los monocitos intermedios (CD14⁺CD16⁺) ($r=0.43$, $p=0.03$) (**Fig. 7E**).

La expresión de HMGB1 en monocitos proinflamatorios (CD14⁻CD16⁺⁺) se correlacionó positivamente con HbA_{1c} ($r=0.50$, $p=0.01$) (**Fig. 7F**).

Finalmente, la expresión de S100A8/9 en neutrófilos se asoció positivamente con el grosor de la íntima Media Carotídea ($r=0.42$, $p=0.04$) (**Fig. 7C**).



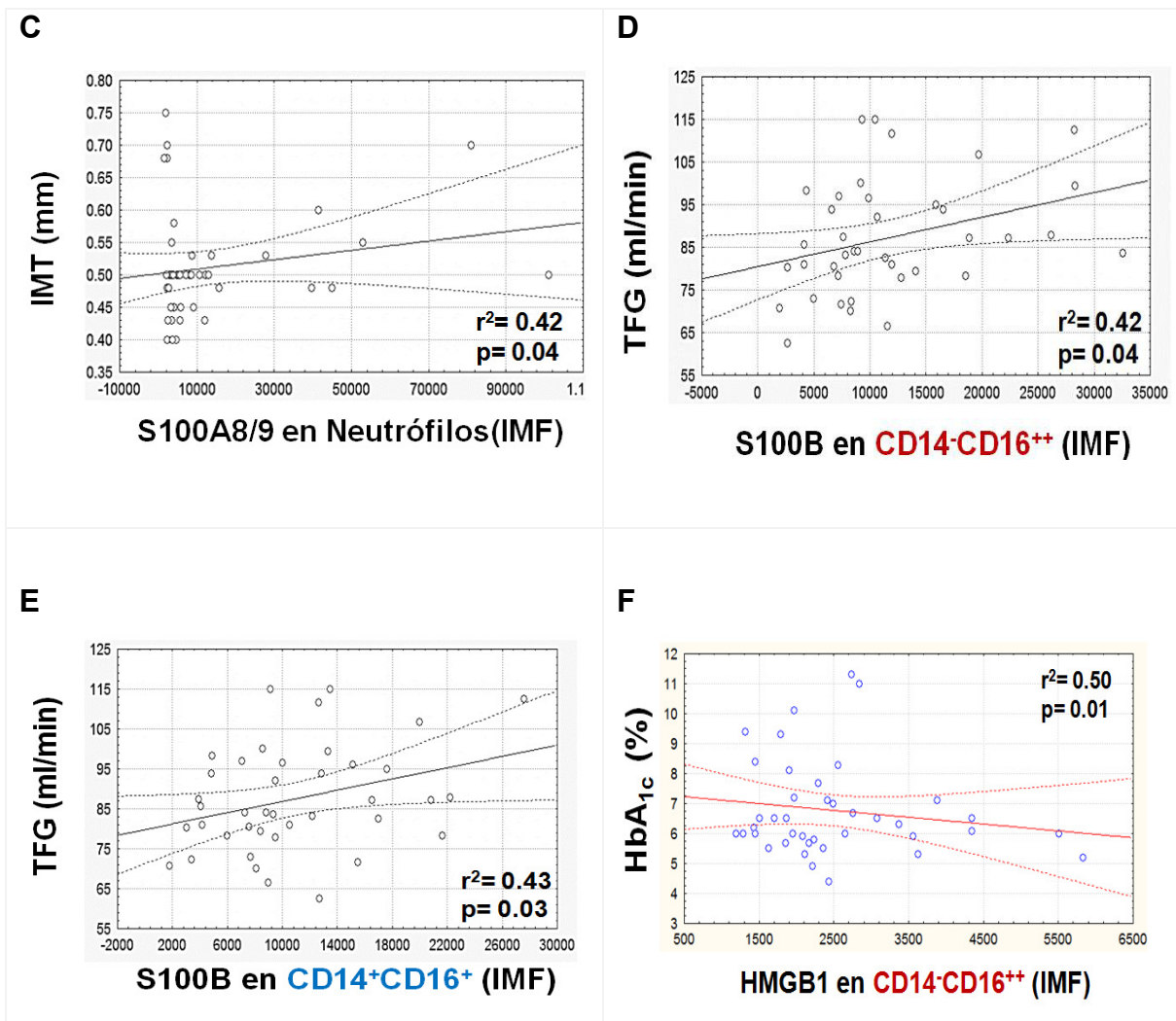


Figura 7. Correlaciones de los ligandos de RAGE con variables antropométricas y bioquímicas. Se observó una correlación positiva de **A)** S100A8/9 en monocitos proinflamatorios (CD14-CD16⁺⁺) con microalbuminuria, **B)** S100A8/9 en monocitos intermedios (CD14⁺CD16⁺) con microalbuminuria, **C)** S100A8/9 en neutrófilos con el grosor de íntima media carotídea (IMT), **D)** S100B en monocitos proinflamatorios (CD14-CD16⁺⁺), **E)** S100B en monocitos intermedios (CD14⁺CD16⁺) con la estimación de filtrado glomerular, **F)** HMGB1 en monocitos proinflamatorios (CD14-CD16⁺⁺) con Hemoglobina glicada.

IMF: Intensidad Media de Fluorescencia

VIII.- DISCUSIÓN

RAGE es un receptor de membrana con funciones clave en diversas vías de señalización y procesos a nivel molecular y celular. Se ha demostrado que participa tanto en funciones fisiológicas, como procesos inflamatorios y patológicos, entre las que destacan las de origen renal, endocrino, neurodegenerativo, neoplásico e infeccioso [8,19,32,39,41].

En este estudio podemos sugerir que RAGE desempeña un papel pro-inflamatorio en la DM2, ya que este receptor, junto con sus ligandos aumentaron su expresión en los pacientes con DM2 y con riesgo cardiovascular; esto concuerda con diversos estudios que sugieren el posible valor predictivo del incremento de este receptor con sus ligandos, y su posible valor predictivo en etapas tempranas, así como en el inicio y progresión de las complicaciones micro- y macrovasculares que se presentan en la DM2.

Un estudio multicéntrico en Finlandia [48] sugiere que RAGE membranal es un marcador prometedor, ya que puede participar en la patogénesis de la nefropatía diabética debido a su capacidad para activar diversas vías intracelulares inflamatorias, además; esta isoforma membranal o de longitud completa, ha sido poco estudiada hasta el momento, siendo uno de los objetivos principales de este estudio.

Es importante mencionar que RAGE membranal se ha estudiado muy poco por citometría de flujo [20,21,41], además de que ésta es una técnica a la que muy pocos lugares en el país se puede tener acceso a ella. RAGE se ha cuantificado además mediante diversas técnicas, en las que se incluye Western blot, reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR) e inmunofluorescencia en donde también ha mostrado un incremento de su expresión en procesos infecciosos [41], inflamatorios [40] y neoplásicos [42], además de mostrar correlaciones positivas con uno de sus ligandos HMGB1, y dicha interacción es propuesta en ese estudio como posible objetivo terapéutico para el tratamiento del carcinoma renal de células claras [43], ya que participó en la autofagia de células tumorales, sugiriendo que su participación es beneficiosa ante entornos inflamatorios, teniendo su cuantificación un posible valor predictivo de procesos patológicos.

Respecto a las calgranulinas, en estudios previos, estas proteínas (S100A8/9 y S100A12), también se ha observado incremento en su expresión en patologías neurodegenerativas y autoinmunes [20], además se ha detectado en lesiones arteriales en placas de ateroma promoviendo el reclutamiento y la activación de neutrófilos y monocitos [29,32].

En esta investigación, se observó una mayor expresión en pacientes con DM2 con un buen control glucémico, del mismo modo encontramos una correlación positiva entre un mayor IMT con la expresión de estos ligandos; del mismo modo, observamos una menor expresión conforme incrementaba la HbA_{1c}

en los pacientes con DM2, esto posiblemente pueda explicarse, ya que, al encontrarse en bajas concentraciones, una de las funciones de estas proteínas, es la regeneración y el desarrollo celular, sugiriendo un posible papel protector.

No existe información concreta sobre la expresión de RAGE y sus ligandos en células inmunes de pacientes con DM2; y debido que, hasta la fecha, estas proteínas no se han cuantificado en ensayos clínicos prospectivos [19], nuestros resultados apoyan a su posible función propuesta anteriormente.

S100B es una proteína que desempeña un papel importante en la mediación de la inflamación y aumentan la aterosclerosis y se ha encontrado incrementada su expresión en pacientes después de un traumatismo cerebral, isquemia / infarto, enfermedad de Alzheimer y síndrome de Down. Esta proteína se utiliza como marcador de la activación y muerte de las células gliales y existe abundante evidencia de que funciona como marcador de estrés oxidativo [32].

En nuestros resultados, se observó mayor expresión de esta proteína en pacientes con DM2 con riesgo cardiovascular y daño renal, en monocitos y neutrófilos, en comparación con los de controles sanos; además de correlacionarse positivamente con una mayor estimación de filtrado glomerular en monocitos pro inflamatorios e intermedios.

Es importante mencionar, que en los parámetros bioquímicos de los participantes, encontramos datos sugerentes de daño renal, ya que se observaron menores niveles de creatinina en los pacientes con DM2 que no presentaron daño renal, en comparación con los controles sanos, aunque también se observaron valores menores en los que ya tenían daño renal, pero no fueron significativos, estos datos coinciden con evidencias previas en la literatura, ya que, en un estudio realizado en Japón [49], con el objetivo de investigar si la creatinina sérica es un posible marcador sustituto de la masa del músculo esquelético, realizaron un período de seguimiento de 4 años en 877 hombres, en donde, los que desarrollaron DM2 mostraron niveles bajos de creatinina sérica y esto se asoció positivamente con un mayor riesgo de DM2, coincidiendo también con nuestros resultados, ya que también se observaron menores porcentajes en la masa muscular de los pacientes con DM2 sin daño renal en comparación con los controles sanos.

HMGB1 ha mostrado evidencia de potenciar efectos de citocinas proinflamatorias como IL-1 β + IFN- γ están mediados por una regulación positiva y/o secreción con el receptor de su receptor RAGE, estando involucrados en mecanismos neuro inflamatorios y degenerativos de origen muscular, en donde se observó que HMGB1 fue igualmente potente en la inducción de muerte celular, particularmente en células positivas para RAGE [47]. Estas evidencias concuerdan con los resultados obtenidos en este estudio, ya que en la expresión de HMGB1 tuvo un comportamiento parecido a S100A8/9 y S100A12, ya su expresión fue mayor en los pacientes con DM2 que tenían un adecuado control glucémico respecto a los controles sanos, y disminuyó conforme incrementaba su HbA_{1c},

sugiriendo también un posible papel predictor de daño en etapas tempranas de la enfermedad, es decir, en un entorno de inflamación crónica de bajo grado en donde aún no se presentan manifestaciones clínicas [26].

Es por eso la importancia de proporcionar evidencia y perspectivas para la posible implicación de RAGE y sus ligandos en el inicio y la progresión de las complicaciones vasculares que se presentan en la DM2, ya que la señalización de las vías en las que participa este receptor y sus ligandos también parecen presentar nuevas e innovadoras estrategias para la modulación de las respuestas inflamatorias y así servir como posibles objetivos terapéuticos, sin embargo, algunos estudios tienen resultados contradictorios y es necesaria más investigación y con una mayor precisión.

Este estudio tuvo como limitante una muestra pequeña, por lo que es importante incluir en futuras investigaciones un mayor número de participantes, incluyendo el uso de técnicas sensibles y con alta especificidad, como la citometría de flujo, de la cuál, actualmente existen pocos estudios y en consecuencia; pocos datos sobre las unidades de medición y rangos de estas para esta técnica y específicamente en las poblaciones celulares que se evaluaron en este estudio.

IX.- CONCLUSION

Tomados en conjunto, estos datos muestran que la inflamación crónica de bajo grado que acompaña a DM2 aumenta la expresión de RAGE y sus ligandos, S100A8/9, S100A12 y HMGB1 en monocitos de pacientes que presentan daño renal y riesgo cardiovascular, mientras que S100B intensifica su expresión en neutrófilos de pacientes diabéticos con daño renal; y en monocitos de pacientes diabéticos con riesgo cardiovascular; revelando que estas moléculas pueden participar en la progresión de la enfermedad y sus posibles complicaciones.

X.- REFERENCIAS

- 1.- Organización Mundial de la Salud. Informe Mundial Sobre la Diabetes. Resumen de Orientación sobre la Diabetes. 2016;16.3:1-3.
- 2.- Fierro C. Juan A. Diabetic nephropathy: physiopathology, diagnosis, clinical progressing and epidemiology. Rev. Med. Clin. Condes. 2009;5:639-650.
- 3.- Zoungas S, Woodward M, Li Q, et al. Impact of age, age at diagnosis and duration of diabetes on the risk of macrovascular and microvascular complications and death in type 2 diabetes. Diabetologia. 2014;57:2465–2474.
- 4.- Zoungas S, Chalmers J, Ninomiya T, et al. Association of HbA1c levels with vascular complications and death in patients with type 2 diabetes: Evidence of glycaemic thresholds. Diabetologia. 2012;55:636–643.
- 5.- Mackenzie IS, Wilkinson IB, Cockcroft JR. Assessment of arterial stiffness in clinical practice. Q J Med. 2002;95:67-74.
- 6.- Massmann A, Stemler J, Fries P et al. Automated oscillometric blood pressure and pulse-wave acquisition for evaluation of vascular stiffness in atherosclerosis. Clin Res Cardiol. 2017;106:514-524.
- 7.- Vazzana N, Santilli F, Cuccurullo C, et al. Soluble forms of RAGE in internal medicine. Intern Emerg Med. 2009;4:389-401.
- 8.- American Diabetes Association. Glycemic Targets: Standards of Medical Care in Diabetes. 2018;41:55-64.
- 9.- Kumar P, Raghavan S, Shanmugam G, et al. Ligation of RAGE with ligand S100B attenuates ABCA1 expression in monocytes. Metabolism. 2013;62:1149-1158.
- 10.- L. Díaz-Casasola and D. Luna-Pichardo. Productos finales de glicación avanzada. Medicina e Investigación. 2016;4:52-57.
- 11.- Di Pino A, Urbano F, Zagami RM, et al. Low Endogenous Secretory Receptor for Advanced Glycation End-Products Levels Are Associated With Inflammation and Carotid Atherosclerosis in Prediabetes. J Clin Endocrinol Metab. 2016;101:1701–1709.
- 12.- Raucci A, Cugusi S, Antonelli A, et al. A soluble form of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is produced by proteolytic cleavage of the membrane-bound form by the sheddase a disintegrin and metalloprotease 10 (ADAM10). FASEB J. 2008;22:3716-3727.
- 13.- C.Schlueter,S.Hauke,A.M.Flohr,P. et al.“Tissue-specific expression patterns of the RAGE receptor and its soluble forms - a result of regulated alternative splicing?” Gene Struct Expr. 2003;1:1-6.
- 14.- Burke AP, Kolodgie FD, Zieske A, et al. Morphologic findings of coronary atherosclerotic plaques in diabetics: A postmortem study. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004;24:1266-1271.

- 15.- Ziegler T, Horstkotte M, Lange P, et al. Endothelial RAGE exacerbates acute postischaemic cardiac inflammation. *Thromb Haemost.* 2016;116:300–308.
- 16.- Thu M, Win T, Yamamoto Y, et al. Regulation of RAGE for Attenuating Progression of Diabetic Vascular Complications. *Experimental Diabetes Research.* 2012;2012:1-8.
- 17.- Chuah YK, Basir R, Talib H et al. Receptor for Advanced Glycation End Products and Its Involvement in Inflammatory Diseases. *Int J Inflam.* 2013;2013:1-15.
- 18.- Grossin N, Wautier MS, Picot J et al. Differential effect of plasma or erythrocyte AGE-ligands of RAGE on expression of transcripts for receptor isoforms. *Diabetes Metab.* 2009;35:410-417.
- 19.- Ana A, Cardoso L, Fernandes A, et al. Towards frailty biomarkers: Candidates from genes and pathways regulated in aging and age-related diseases. *Ageing Res Rev.* 2018;47:214-277.
- 20.- García-Salido A, Melen G, Gómez-piña V et al. Circulating soluble RAGE and cell surface RAGE on peripheral blood mononuclear cells in healthy children. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2018;31:649-654.
- 21.- Fuller KNZ, Valentine RJ, Miranda ER et al. A single high-fat meal alters human soluble RAGE profiles and PBMC RAGE expression with no effect of prior aerobic exercise. *Physiol Rep.* 2018;6:1-11.
- 22.- Hofmann MA, Drury S, Fu C, et al. RAGE Mediates a Novel Proinflammatory Axis: A Central Cell Surface Receptor for S100/Calgranulin Polypeptides. *Cell Press.* 1999;97:889-901.
- 23.- Chellan B, Sutton NR, Bowman MAH. S100 / RAGE-Mediated Inflammation and Modified Cholesterol Lipoproteins as Mediators of Osteoblastic Differentiation of Vascular Smooth Muscle Cells. *Front Cardiovasc Med.* 2018;5:1-14.
- 24.- Harris HE and Andersson U. Mini-review : The nuclear protein HMGB1 as a proinflammatory mediator. *Eur J Immunol.* 2004;34:1503-1512.
- 25.- Roh JS and Sohn DH. Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases. *Immune Netw.* 2018;18:1-14.
- 26.- Yu Y, Yang L, Lv J, et al. The role of high mobility group box 1 (HMGB-1) in the diabetic retinopathy inflammation and apoptosis. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8:6807-6813.
- 27.- Sparvero LJ, Asafu-adjei D, Kang R, et al. RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts), RAGE Ligands and their role in Cancer and Inflammation. *J. Transl. Med.* 2009;7:1-21.
- 28.- Boteanu RM, Suica VI, Uyy E, et al. Alarmins in chronic noncommunicable diseases: Atherosclerosis, diabetes and cancer. *J Proteomics.* 2016;153:21-29.
- 29.- McCormick MM, Rahimi F, Bobryshev Y, et al. S100A8 and S100A9 in Human Arterial Wall: Implications for atherogenesis. *J. Biol.Chem.* 2005;280:41521-41529.

- 30.- Schiopu A, Cotoi OS et al. S100A8 and S100A9: DAMPs at the Crossroads between Innate Immunity, Traditional Risk Factors, and Cardiovascular Disease. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:1-10.
- 31.- Croce K, Gao H, Wang Y, et al. Myeloid-Related Protein-8 /14. Is Critical for the Biological response to vascular injury. *Journal Circulation.* 2009; 120:427-436.
- 32.- Marie A, Du S, Fang S et al. The biology of the receptor for advanced glycation end products and its ligands. *Mol. Cell Research.* 2000;1498:99-111.
- 33.- Barlovic DP, Soro-paavonen A, Jandeleit-dahm KAM et al. RAGE biology, atherosclerosis and diabetes. *Clin Sci.* 2011;121:43-55.
- 34.- Howrey BT, Al Snih S, Markides KS et al. Frailty and diabetes among Mexican American older adults. *Ann Epidemiol.* 2018;28:421-426.
- 35.- Schnall PL, Dobson M, Landsbergis P, et al. Globalization, Work, and Cardiovascular Disease. *Int J Health Serv.* 2016;46:656-692.
- 36.- Provost EB, Madhloum N, Panis LI et al. Carotid Intima-Media Thickness, a Marker of Subclinical Atherosclerosis, and Particulate Air Pollution Exposure: The Meta-Analytical Evidence. *PloS ONE.* 2015;10:1-12.
- 37.- Quezada P, Margarita DA et al. Grosor de íntima media carotideo y su relación con factores de riesgo cardiovascular en la población del municipio Plaza de la Revolución. *Revista Cubana de Cardiología y Cirugía.* 2019;22:1-20
- 38.- Castellon X and V. Bogdanova. Screening for subclinical atherosclerosis by noninvasive methods in asymptomatic patients with risk factors. *Clinical Interventions in Aging.* 2013;8:573-580.
- 39.- Wang M, Jin W, Guo AM et al. Cardiovascular Inflammation. *Int J Food Sci Nutr.* 2013;41:94-100.
- 40.- Sousa MM, Du Yan S, Fernandes R, et al. Familial amyloid polyneuropathy: receptor for advanced glycation end products-dependent triggering of neuronal inflammatory and apoptotic pathways. *J Neurosci.* 2001;19:7576-7586.
- 41.- Arce-Mendoza A, Rodriguez-de Ita J, Salinas-Carmona MC. et al. Expression of CD64, CD206, and RAGE in adherent cells of diabetic patients infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch Med Res.* 2008;3:306-11.
- 42.- Dettoraki A, Gil AP, Spiliotis BE, et al. Association between serum levels of the soluble receptor (sRAGE) for advanced glycation endproducts (AGEs) and their receptor (RAGE) in peripheral blood mononuclear cells of children with type 1 diabetes mellitus. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2009;10:895-904.
- 43.- Guo Y, Zhan HC, Xue S, et al. Receptors for advanced glycation end products is associated with autophagy in the clear cell renal cell carcinoma. *J Cancer Res Ther.* 2019;2:317-323.
- 44.- Gonzalez Correa, Clara Helena; Sepúlveda Gallego, et al. Different reference values for hand dynamometry: a conflicting issue. *Nutr. Clin. Diet. Hosp.* 2017; 37:104-110.

- 45.- Jorge M. Cors. Ultrasonido Carotídeo. Sociedad Argentina de Cardiología PROSAC. 2014; 10:1–10.
- 46.- Bryan Kestenbaum and Ian H. de Boer. Urine Albumin-to-Creatinine Ratio: What's in a Number? J Am Soc Nephrol. 2019;2010:1243-1244.
- 47.- Muth IE, Zschüntzsch J, Kleinschnitz K, et al. HMGB1 and RAGE in skeletal muscle inflammation: Implications for protein accumulation in inclusion body myositis. Exp Neurol. 2015;271:189-197.
- 48.- Jenny M. Waldén, Emma H. Dahlstrom, Nina Eloen et al. Soluble receptor for AGE in diabetic nephropathy and its progression in Finnish individuals with type 1 diabetes. Diabetology. 2019;62:1268-1274.
- 49.- Nobuko Harita, Tomoshige Hayashi, Kyoko Kogawa et al. Lower Serum Creatinine Is a New Risk Factor of Type 2 Diabetes. Diabetes Care. 2009;3:424-426.

XI.- ANEXOS

11.1.- ANEXO 1. Hoja de recolección de datos.

**UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICAS**

“Estudio de la expresión de RAGE y sus ligandos S100A8/9, S100A12, S100B y HMGB1 en subpoblaciones de monocitos y neutrófilos de pacientes con diabetes mellitus tipo 2”

FOLIO: _____ CODIFICACION: _____ FECHA: _____

DATOS PERSONALES DEL PACIENTE

NOMBRE: _____	EDAD: _____
OCUPACIÓN: _____	DIRECCIÓN: _____
TELÉFONO: _____	CELULAR: _____
FECHA DE NACIMIENTO: _____	TIEMPO DE DIAGNÓSTICO: _____

ANTECEDENTES HEREDOFAMILIARES

	NO	SI	PARENTESCO		NO	SI	PARENTESCO
HTA				IAM			
ENFERMEDAD CARDIACA				ENFERMEDAD TIROIDEA			
INSUFICIENCIA RENAL				ENFERMEDAD HEPÁTICA			
CÁNCER				DIABETES			
OBESIDAD				OTRAS			

ANTECEDENTES PERSONALES PATOLOGICOS

	NO	SI		NO	SI
HTA			IAM		
ENFERMEDAD CARDIACA			ENFERMEDAD TIROIDEA		
INSUFICIENCIA RENAL			ENFERMEDAD HEPÁTICA		
CÁNCER			DIABETES		
OBESIDAD			OTRAS		

ANTECEDENTES PERSONALES NO PATOLOGICOS

ACTUAL	NO	SI	FRECUENCIA/CANTIDAD
FUMAR			
CONSUMO DE ALCOHOL			
ANTERIOR	NO	SI	FRECUENCIA/CANTIDAD/TIPO/TIEMPO DE REALIZACION
FUMAR			
CONSUMO DE ALCOHOL			

PADECIMIENTO ACTUAL

--

MEDICAMENTOS (ACTUAL)

MEDICAMENTO	DOSIS	FRECUENCIA(VECES/DÍA)	TIEMPO DE MEDICACIÓN

CONSUMO DE SUPLEMENTOS ALIMENTICIOS

SUPLEMENTO	DOSIS	FRECUENCIA(VECES/DÍA)	TIEMPO DE MEDICACIÓN

ACTIVIDAD FISICA

	NO	SI	TIPO		TIEMPO SESIÓN
REALIZA			# SESIONES/SEMANA		

ANTROPOMETRÍA

PESO (Kg)	ESTATURA (cm)	C. CINTURA (cm)	C. CADERA (cm)	C. CUELLO (cm)	TA (Hg/mm)
% GRASA	% MASA MUSCULAR	TBW (%)	T. METAB	MASA OSEA (%)	

MEDICION DE LA MAXIMA FUERZA DE PRENSION MANUAL

11.2.- ANEXO 2. Consentimiento informado.

HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN PROYECTO DE INVESTIGACIÓN: “Estudio de la expresión de RAGE y sus ligandos S100A8/9, S100A12, S100B y HMGB1 en subpoblaciones de monocitos y neutrófilos de pacientes con diabetes mellitus tipo 2”

Le proponemos participar en un Proyecto de Investigación cuyo objetivo es evaluar la expresión de varias moléculas responsables del daño en las arterias y su interacción con los niveles de grasas y glucosa en la circulación. Para lo cual le solicitamos permiso para extraer muestra de sangre venosa periférica y la realización de un ultrasonido de la íntima media carótida.

Riesgos: Para la obtención de este tipo de muestras no se corre ningún riesgo o molestia adicional a la práctica habitual ya que se utilizará venopunción para la obtención de la muestra de sangre.

Beneficios: Se ofrecerá la realización de los siguientes estudios clínicos: Glucosa, colesterol total, HDL, colesterol no-HDL, triglicéridos, examen general de orina, y perfil hormonal sin costo alguno.

Confidencialidad: De acuerdo con la Ley de Protección de Datos, el origen de estas muestras no será divulgado, y en caso de ser utilizadas para publicaciones científicas será de forma anónima, sin que se pueda identificar a ninguna persona en particular. Las muestras y datos obtenidos serán utilizados solamente para este Proyecto de Investigación.

Voluntariedad: La participación en el estudio es voluntaria. Asimismo, usted puede revocar su consentimiento en el momento que lo desee y en ese caso sus muestras y los datos obtenidos hasta ese momento serán destruidos.

Este protocolo de investigación ha sido aceptado por el CIBIUG (Comité Institucional de Bioética en la Investigación de la Universidad de Guanajuato) con el No. **CIBIUG-P04-2016**).

Los investigadores se hacen responsables de los daños que pudieran ser causados por la venopunción y el estudio de ultrasonido. Investigador que informa y con el que se puede contactar para conseguir más información:

Investigador principal: Dra. Nicté Figueroa Vega

Lugar de realización: Departamento de Ciencias Médicas, División de Ciencias de la Salud, Universidad de Guanajuato.

Firma: _____ Fecha: _____

Yo: _____ acepto participar en este Proyecto de Investigación.

Firma del participante: _____ Firma Testigo: _____

11.3.- ANEXO 3. Carta de aprobación del CIBIUG.



UNIVERSIDAD
DE GUANAJUATO

Comité Institucional de Bioética en la Investigación de la Universidad de Guanajuato

OFICIO: 010/2016
ASUNTO: Constancia
Guanajuato, Gto., 03 de junio de 2016

Dra. Nicté Figueroa Vega
Departamento de Ciencias Médicas
División Ciencias de la Salud
Campus León
Presente

En relación al protocolo de investigación en seres humanos enviado por usted denominado: **“Estudio del papel del eje RAGE – ligandos-transportadores ABC en los monocitos M1 y su aplicación en la clínica como biomarcadores de riesgo predictivo en la aterosclerosis”**, del cual es usted responsable, el Comité Institucional de Bioética en la Investigación de la Universidad de Guanajuato (CIBIUG) se reunió el 29 de abril y se revisaron en el mismo los requisitos éticos y normativos nacionales e internacionales aplicables al proyecto.

El pleno del CIBIUG, considera que el protocolo, el consentimiento informado y los anexos, cumplen los requisitos bioéticos y por el presente dictamen informa a usted que el proyecto ha sido **aprobado**.

Dicho dictamen quedó asentado en el acta número **CIBIUG-A14-2016**. El código asignado por el CIBIUG al proyecto es: **CIBIUG-P04-2016**, para que en lo sucesivo sea citado en los formatos de consentimiento informado o cartas de privacidad, así como en los informes y publicaciones.

Asimismo, se le informa que el presente dictamen tiene validez durante el periodo de realización del proyecto específico analizado y autoriza el inicio del mismo. Al término de cada año de vigencia, debe enviar un breve informe del avance/finalización del proyecto, indicando si se presentaron efectos adversos o problemas o cambios durante su realización, así como los medios por los cuales se dio información de los resultados a los participantes y a la comunidad científica.

El CIBIUG se reserva el derecho de revisar el desarrollo del proyecto con el objeto de proteger los derechos y la dignidad de los participantes.

Atentamente
“La verdad os hará libres”

Dr. Luis Fernando Anaya Velázquez
Presidente del CIBIUG



UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO
Comité Institucional de
Bioética en la Investigación

C.c.p. DR. LUIS FELIPE GUERRERO AGRIPINO - Rector General. U.G.
DR. HÉCTOR EFRAÍN RODRÍGUEZ DE LA ROSA - Secretario General. U.G.
DR. JOSÉ LUIS LUCIO MARTÍNEZ - Secretario Académico. U.G.
DR. MAURO NAPSUCIALE MENDÍVIL - Director de Apoyo a la Investigación y al Posgrado. U.G.
Expediente

11.4.- ANEXO 4. Cartas de aprobación de los sinodales.



Dra. Elva Leticia Pérez Luque
Presente

Por acuerdo con el Director de la División de Ciencias de la Salud del Campus León se le ha designado como **Presidente** del examen para obtener el grado del Maestría en Ciencias Médicas que sustentará la **C. Claudia María Calderón Paredes**

La modalidad de la titulación será por medio de la presentación de tesis que con el título de **"Estudio de la expresión de RAGE y sus ligandos S100A8/9, S100A12, S100B y HMGB1 en subpoblaciones de monocitos y neutrófilos de pacientes con diabetes mellitus tipo 2"** ha completado y es satisfactorio de acuerdo al Director de trabajo.

Por lo anterior le solicito revise la tesis de la alumna que acompaña al presente y nos informe mediante su voto si procede la realización del examen de titulación.

Su participación en este proceso es de la mayor importancia para la Misión de la Universidad por lo que deseo expresarle mi agradecimiento por su valiosa colaboración en la evaluación del trabajo y la realización del examen de titulación.

Sin otro particular me es grato reiterarle la seguridad de mi más alta consideración.

"LA VERDAD OS HARA LIBRES"

17 de enero de 2020

Secretaría Académica

División Ciencias de la Salud

UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO
Campus León
Mtra. Cipriana Caudillo Cisneros

Para los sinodales:

Mi voto en relación al trabajo de Titulación es:

Aprobatorio

Firma

Elva Leticia Pérez Luque

SECRETARÍA ACADÉMICA DE LA DIVISIÓN CIENCIAS DE LA SALUD CAMPUS LEÓN

Blvd. Puente Milenio No. 1001 Fracción Predio San Carlos C.P. 3767 Tel. (477) 267 49 00 Ext. 3657



Dr. Carlos Kornhauser Araujo
Presente

Por acuerdo con el Director de la División de Ciencias de la Salud del Campus León se le ha designado como **Secretario** del examen para obtener el grado del Maestría en Ciencias Médicas que sustentará la **C. Claudia María Calderón Paredes**

La modalidad de la titulación será por medio de la presentación de tesis que con el título de **"Estudio de la expresión de RAGE y sus ligandos S100A8/9, S100A12, S100B y HMGB1 en subpoblaciones de monocitos y neutrófilos de pacientes con diabetes mellitus tipo 2"** ha completado y es satisfactorio de acuerdo al Director de trabajo.

Por lo anterior le solicito revise la tesis de la alumna que acompaña al presente y nos informe mediante su voto si procede la realización del examen de titulación.

Su participación en este proceso es de la mayor importancia para la Misión de la Universidad por lo que deseo expresarle mi agradecimiento por su valiosa colaboración en la evaluación del trabajo y la realización del examen de titulación.

Sin otro particular me es grato reiterarle la seguridad de mi más alta consideración.

"LA VERDAD OS HARA LIBRES"

17 de enero de 2020

Secretaria Académica

División Ciencias de la Salud

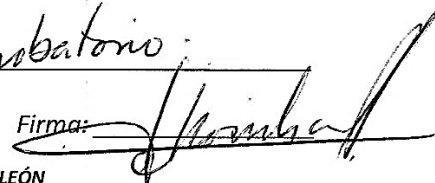

UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO
Mtra. Cipriana Caudillo Cisneros

Para los sinodales:

Mi voto en relación al trabajo de Titulación es:

Aprobatorio

Firma:



SECRETARÍA ACADÉMICA DE LA DIVISIÓN CIENCIAS DE LA SALUD CAMPUS LEÓN

Bldv. Puente Milenio No. 1001 Fracción Predio San Carlos C.P. 3767 Tel. (477) 267 49 00 Ext. 3657



Dr. Juan Manuel Malacara Hernández
Presente

Por acuerdo con el Director de la División de Ciencias de la Salud del Campus León se le ha designado como **Vocal** del examen para obtener el grado del Maestría en Ciencias Médicas que sustentará la **C. Claudia María Calderón Paredes**

La modalidad de la titulación será por medio de la presentación de tesis que con el título de **"Estudio de la expresión de RAGE y sus ligandos S100A8/9, S100A12, S100B y HMGB1 en subpoblaciones de monocitos y neutrófilos de pacientes con diabetes mellitus tipo 2"** ha completado y es satisfactorio de acuerdo al Director de trabajo.

Por lo anterior le solicito revise la tesis de la alumna que acompaña al presente y nos informe mediante su voto si procede la realización del examen de titulación.

Su participación en este proceso es de la mayor importancia para la Misión de la Universidad por lo que deseo expresarle mi agradecimiento por su valiosa colaboración en la evaluación del trabajo y la realización del examen de titulación.

Sin otro particular me es grato reiterarle la seguridad de mi más alta consideración.

"LA VERDAD OS HARA LIBRES"

17 de enero de 2020

Secretaría Académica

División Ciencias de la Salud

UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO
Campus León

Mtra. Cipriana Caudillo Cisneros

Para los sinodales:

Mi voto en relación al trabajo de Titulación es: APROBATORIO

Firma: 

SECRETARÍA ACADÉMICA DE LA DIVISIÓN CIENCIAS DE LA SALUD CAMPUS LEÓN
Blvd. Puente Milenio No. 1001 Fracción Predio San Carlos C.P. 3767 Tel. (477) 267 49 00 Ext. 3657



Universidad Guanajuato

Dra. Nicté Guadalupe Figueroa Vega
Presente

Por acuerdo con el Director de la División de Ciencias de la Salud del Campus León se le ha designado como **Vocal Suplente** del examen para obtener el grado del Maestría en Ciencias Médicas que sustentará la **C. Claudia María Calderón Paredes**

La modalidad de la titulación será por medio de la presentación de tesis que con el título de "Estudio de la expresión de RAGE y sus ligandos S100A8/9, S100A12, S100B y HMGB1 en subpoblaciones de monocitos y neutrófilos de pacientes con diabetes mellitus tipo 2" ha completado y es satisfactorio de acuerdo al Director de trabajo.

Por lo anterior le solicito revise la tesis de la alumna que acompaña al presente y nos informe mediante su voto si procede la realización del examen de titulación.

Su participación en este proceso es de la mayor importancia para la Misión de la Universidad por lo que deseo expresarle mi agradecimiento por su valiosa colaboración en la evaluación del trabajo y la realización del examen de titulación.

Sin otro particular me es grato reiterarle la seguridad de mi más alta consideración.

"LA VERDAD OS HARA LIBRES"

17 de enero de 2020

Secretaría Académica

División Ciencias de la Salud

UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO

Campus León

[Handwritten signature]
DIVISIÓN DE CIENCIAS DE LA SALUD
Mtra. Cipriana Caudillo Cisneros

Para los sinodales:

Mi voto en relación al trabajo de Titulación es: APROBATORIO

Firma: *[Handwritten signature]*

SECRETARÍA ACADÉMICA DE LA DIVISIÓN CIENCIAS DE LA SALUD CAMPUS LEÓN
Blvd. Puente Milenio No. 1001 Fracción Predio San Carlos C.P. 3767 Tel. (477) 267 49 00 Ext. 3657