



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
DPTO. DE BIOLOGÍA
LABORATORIO DE BIOLOGÍA Y MEDICINA EXPERIMENTAL



**NIVELES DE AMINOÁCIDOS EN ORINA MEDIANTE ELECTROFORESIS
CAPILAR EN ZONA CON DETECCIÓN DE FLUORESCENCIA INDUCIDA
POR LÁSER EN ADULTOS DIABÉTICOS CON ALBUMINURIA
DETECTABLE Y NO DETECTABLE.**

www.bdigital.ula.ve

Autor(s):

Ercilia Patricia Novoa M.

C.I. V-27.147.683

Rusmary Quintero González.

C.I. V-27.668.098

Tutor:

Prof. Luis Betancourt.

Mérida, diciembre 2023



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
DPTO. DE BIOLOGÍA
LABORATORIO DE BIOLOGÍA Y MEDICINA EXPERIMENTAL



**NIVELES DE AMINOÁCIDOS EN ORINA MEDIANTE ELECTROFORESIS
CAPILAR EN ZONA CON DETECCIÓN DE FLUORESCENCIA INDUCIDA
POR LÁSER EN ADULTOS DIABÉTICOS CON ALBUMINURIA
DETECTABLE Y NO DETECTABLE.**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de
Licenciada en Bioanálisis**

Autor(s):

Ercilia Patricia Novoa M.

C.I. V-27.147.683

Rusmary Quintero González.

C.I. V-27.668.098

Tutor:

Prof. Luis Betancourt.

Mérida, diciembre 2023

DEDICATORIA

Dedico este trabajo principalmente a **Dios**, por haberme dado la vida y permitirme el haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional, dándome las herramientas necesarias para culminar con éxito mi trabajo de investigación y hacerme entender que los sueños se hacen realidad cuando los deseas con todo el corazón. Asimismo, por haberme guiado desde siempre y ser mi fortaleza en los momentos más difíciles.

A mi madre, Yumana Maldonado por ser el pilar más importante, por creer en mí en todo momento y por demostrarme siempre su apoyo ilimitado e incondicional. **A mi padre, Navonazar Novoa** por enseñarme a ser una persona fuerte con la capacidad de superarme y desear lo mejor en cada paso por este camino arduo de la vida.

A mi abuela, Esperanza Maldonado la cual es otra madre para mí. Por cuidarme siempre desde niña y estar pendiente, gracias por el amor que me has dado. **A la memoria de mi abuela, Ercilia Novoa** que siempre me llevo en sus oraciones, sé que desde el cielo me proteges y bendices en cada uno de mis pasos.

A mis hermanos, Camila y Salomón, por ofrecerme cariño y apoyo sincero, mis logros también son suyos y hoy por hoy los comparto con mucha satisfacción. Al resto de mis seres queridos que de una u otra manera han estado presentes apoyándome en este camino.

A mis compañeros y amigos presentes, Rusmary, Nelvis, Nailyn, Elisa, Maite, Joeika, Froilana y aquellos que también formaron parte por un tiempo, Karla, Yessica, Fernanda, gracias por hacer de cada día de mis días una trayectoria inolvidable durante la universidad, por siempre saber arrancar una sonrisa en mí, quienes sin esperar nada a cambio compartieron sus

conocimientos, alegrías, tristezas, complicidad y desesperación durante este largo trayecto, los extrañare.

A mis mejores amigos, Yulyana y Luis empezamos juntos este camino, pero cada uno tomo rumbos distintos, son personas especiales que la universidad y la vida me regalo, siguen presentes sin importar la distancia, les agradezco por siempre estar, por darme ánimos cuando más lo necesite, por ser mis confidentes y consejeros. **A mi mejor amiga de la infancia, María Laura** has sido un apoyo en momentos difíciles sin importar la distancia ni el tiempo que duremos sin hablar, espero contar siempre con tu valioso e incondicional apoyo.

A todos los que aun sin nombrarlos formaron parte de esta etapa de mi vida.

www.bdigital.ula.ve

Ercilia Novoa

DEDICATORIA

Dedico este trabajo primeramente a **DIOS**, quien ha forjado mi camino, ha sido mi guía, fortaleza y su mano de fidelidad y amor han estado conmigo a lo largo de todo este viaje.

A mi madre **Raquel Quintero**, quien ha sido un ejemplo de esfuerzo, paciencia, amor y valentía ante las adversidades. Ha sido la principal promotora de mis sueños, sin ella nada de esto hubiese sido posible. Todos mis logros son dedicados a ella, quien estuvo siempre a mi lado brindándome su mano amiga, dándome a cada instante una palabra de aliento en los momentos más difíciles. Su sacrificio y esmero me enseñaron a ser fuerte, valiente y perseverante. Ha sido mi luz en los momentos más oscuros, su amor incondicional será siempre mi motor para seguir adelante. ¡Eres la mejor madre del mundo, no sé qué haría sin ti TE AMO!.

A mis abuelos **Arturo Quintero y Ernestina González**, por estar en los momentos más importantes de mi vida, por ser un ejemplo de lucha y amor. Por sus consejos que han sido de gran ayuda para mi vida y crecimiento. Este trabajo es el resultado de lo que me han enseñado día a día, a ser una persona honesta, con valores luchadora y triunfadora. Más que mis abuelos son las personas que después de mi madre se han preocupado más por mí, nunca tendré como pagarles. Finalmente, y aún más importante por inculcarme la palabra de Dios y por llevarme en sus oraciones cada día de mi vida, los amo inmensamente.

A mis hermanos **Raimary Quintero, Rosmery Quintero y Gabriel Vergara**, que en el día a día con su presencia, respaldo y cariño me impulsaron para salir adelante, saben que mis logros también son los suyos. Que dicha que sean quienes me acompañen en este camino llamado vida. Los amo mucho. Y a todos mis seres queridos que de una u otra manera siempre estuvieron apoyándome.

A mi pareja **Yhon Santiago**, quien ha estado conmigo a lo largo de estos años siendo mi apoyo incondicional en todo momento, inclusive en los más difíciles ha sido mi ayuda y esperanza. Por motivarme, creer en mí y brindarme su amor. Por entenderme, ser un compañero excepcional durante todo este tiempo. Su esfuerzo constante para hacerme feliz y alegrarme cada día me motivo a no rendirme y continuar hasta lograr la meta anhelada. Te amo Amor.

A mis amigas **Patricia Novoa, Rosa Angarita y Fragdimar Peraza** por haber compartido conmigo estos años de estudio. Sus risas, conversaciones, consejos y cariño me acompañaron en los momentos más difíciles. Cada una de ustedes ha dejado huella en mi vida y estoy muy feliz de haberlas conocido.

A todos los que aun sin nombrarlos formaron parte integral de esta etapa de mi vida, siempre los llevare en mi corazón.

www.bdigital.ula.ve

Rusmary Quintero

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecemos a **Dios** por ser el creador de la vida y quien nos ha dotado de capacidades, aptitudes, inteligencia y perseverancia para lograr esta anhelada meta. Por guiarnos y cuidarnos en cada decisión a lo largo de nuestra carrera.

A nuestro tutor **Prof. Luis Betancourt** por su dedicación y paciencia, sin sus palabras y correcciones precisas no habiésemos podido lograr llegar a esta instancia tan deseada. Gracias por su guía y todos sus consejos, los llevaremos grabados para siempre en la memoria de nuestro futuro profesional.

A nuestro jurado evaluador **Prof. Anny Lacruz y Prof. Elizabeth Pérez** por su criterio y experiencia aportada para cumplir con excelencia el desarrollo de este trabajo.

Al **Laboratorio de Biología y Medicina experimental (LABIOMEX)** de la Facultad de Medicina de la Universidad de los Andes, por abrirnos sus puertas para el desarrollo experimental de esta investigación.

A la **Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de los Andes** Por brindarnos sus espacios, los cuales se convirtieron en nuestro segundo hogar. A cada uno de los profesores que tuvimos la oportunidad de conocer, por su dedicación y compromiso con nuestra formación académica. Los conocimientos y habilidades que hemos adquirido gracias a su esfuerzo, son invaluable en nuestra carrera profesional.

A la **Ilustre Universidad de los Andes** por abrirnos sus puertas y concedernos la oportunidad de formarnos personal y profesionalmente. Por su entrega y por hacer que la educación sea un espacio de crecimiento constante. Nos sentimos muy orgullosas de pertenecer a esta distinguida casa de estudio. Su labor es fundamental en nuestro camino hacia el éxito.

Ercilia Novoa

Rusmary Quintero

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág
ÍNDICE DE TABLAS	xi
TABLA DE FIGURAS	xii
TABLA DE GRÁFICOS	xiii
RESUMEN	xiv
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I EL PROBLEMA	4
Planteamiento del Problema	4
Justificación de la Investigación	9
Objetivos de la Investigación	10
<i>Objetivo General</i>	10
<i>Objetivos Específicos</i>	11
Alcances y Limitaciones de la Investigación	11
CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO	13
Trabajos Previos	13
Antecedentes Históricos	15
Bases Teóricas	16
<i>Aproximación teórica sobre el metabolismo de los aminoácidos</i>	16
<i>Aproximación teórica sobre la relación de los aminoácidos y la diabetes.</i>	17
<i>Aproximación teórica sobre la electroforesis capilar con fluorescencia por láser.</i>	18
<i>Aproximación teórica sobre la detección de aminoácidos con electroforesis capilar</i>	18
Definiciones conceptuales	19
Definición operacional de Términos	20
Operacionalización del evento de estudio	23
CAPÍTULO III MARCO METODOLÓGICO	25

Tipo de la Investigación	25
Diseño de la Investigación	25
Población y Muestra	26
<i>Unidad de investigación</i>	26
<i>Selección del Tamaño de la Muestra</i>	26
Sistema de Variables	26
Instrumentos de Recolección de Datos	27
Procedimientos	27
<i>Obtención de las muestras de orina</i>	27
<i>Preparación de la muestra</i>	27
<i>Derivatización de la muestra</i>	28
<i>Corrida electroforética</i>	28
Análisis de los datos	29
Recolección de la Información	30
Análisis Estadístico	30
Variables estadísticas	30
CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIONES	32
Análisis de los resultados	32
Características generales de los pacientes incluidos en el estudio.	32
Resultados de la corrida electroforética	34
Análisis de electroferogramas en pacientes con albuminuria detectable y no detectable	36
Discusión	41
CAPÍTULO V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	43
Conclusiones	43
Recomendaciones	43
BIBLIOHEMEROGRAFÍA	45
ANEXOS	50
Anexo N°1	50

ÍNDICE DE TABLAS

N		Pág
1	Operacionalización del evento de estudio	24
2	Variables estadísticas según la naturaleza y escala de medida	31
3	Características generales de los pacientes que participaron en el estudio	33
4	Niveles de agmatina y arginina en pacientes con albuminuria normal y albuminuria elevada	35
5	Datos de medición de estándares de agmatina	38
6	Datos de medición de estándares de arginina	39

www.bdigital.ula.ve

TABLA DE FIGURAS

N		Pág
1	Alineación de los picos de electroferogramas promedio mediante un software para comparaciones de los picos medibles	34
2	Spiking de agmatina y arginina en muestras de orina	37

www.bdigital.ula.ve

TABLA DE GRAFICOS

N		Pág
1	Alturas de picos en unidades arbitrarias correspondientes a los niveles relativos de los aminoácidos identificados en las muestras de orina de los pacientes	35
2	Diferencias entre los picos de agmatina y arginina tanto en pacientes con microalbuminuria elevada ($>0.1\text{mg/l}$) como indetectable ($<0.1\text{mg/l}$)	36
3	Altura de picos de agmatina de muestras de orina de pacientes diabéticos	38
4	Altura de picos de arginina de muestras de orina de pacientes diabéticos	39
5	Concentración calculada a partir de alturas de picos de agmatina y arginina	40
6	Concentración de agmatina y arginina en orina de pacientes diabéticos con albuminuria detectable y no detectable	41



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
DPTO. DE BIOLOGÍA
LABORATORIO DE BIOLOGÍA Y MEDICINA EXPERIMENTAL



**NIVELES DE AMINOÁCIDOS EN ORINA MEDIANTE ELECTROFORESIS
CAPILAR EN ZONA CON DETECCIÓN DE FLUORESCENCIA INDUCIDA POR
LÁSER EN ADULTOS DIABÉTICOS CON ALBUMINURIA DETECTABLE Y NO
DETECTABLE.**

Proyecto de investigación

Autor(s):

Ercilia Patricia Novoa M.
C.I. V-27.147.683
Rusmary Quintero González.
C.I. V-27.668.098

Tutor:

Prof. Luis Betancourt.

RESUMEN

Desde su introducción como técnica analítica, la electroforesis capilar se ha utilizado para la separación de aminoácidos y otras moléculas pequeñas. Los sistemas de detección que se han utilizado dependen del uso de reactivos fluorogénicos y detección de fluorescencia inducida por láser. Se desarrolló un método sencillo y fiable basado en electroforesis capilar con detección de fluorescencia inducida por láser para el análisis de aminoácidos en orina de pacientes usando fluorescamina para la derivatización de las aminas, con un capilar de sílica fundida. El método fue completamente validado con respecto al rango lineal, la sensibilidad, el límite de detección y el límite de cuantificación en muestras de orina humana. El objetivo de este trabajo fue usar este método para comparar la relación entre los niveles de aminoácidos en orina determinados mediante electroforesis capilar en zona con detección de fluorescencia inducida por láser en adultos diabéticos con albuminuria detectable y no detectable cuantificada por el método de inmunoensayo UMELISA. Las curvas de calibración de agmatina y arginina son lineales en el rango de 0 μM a 500 μM . Se estima que los límites de concentración y detección para todos los aminoácidos son 0-5 μM y el límite de cuantificación (LOQ) fue de aproximadamente 7-13 μM . Siete aminoácidos fueron identificados en las muestras de orina (agmatina, glutamato, arginina, citrulina, ornitina, serina y valina), y mostraron diferencias en las alturas medias de picos, sin embargo, solo agmatina y arginina mostraron que sus concentraciones eran estadísticamente significativas. El presente método permitiría la determinación exitosa de aminoácidos en orina en relación con albuminuria en pacientes diabéticos.

Palabras claves: aminoácidos, electroforesis capilar, derivatización, albuminuria.

INTRODUCCIÓN

El conjunto de moléculas pequeñas presentes en células, tejidos y fluidos corporales se conocen como metaboloma. El estudio sistemático de ellas se denomina metabolómica, la cual tiene un gran impacto en el ejercicio de la medicina. En la Universidad de los Andes (ULA) existen antecedentes del análisis de metabolitos en distintos tipos de muestras biológicas. Estudios previos utilizando electroforesis capilar con detección de fluorescencia inducida por láser, han determinado que patologías como la eclampsia, la hipertensión arterial o la misma diabetes mellitus podrían explicarse fisiopatológicamente con la expresión de un patrón metabolómico específico. Así mismo, los avances tecnológicos han permitido añadir análisis por medio de inteligencia artificial al ámbito biomédico, que incrementa el potencial diagnóstico para muchas enfermedades ya que eleva de manera exponencial la cantidad de datos que podemos suministrar para su análisis (Dubin R, y cols 2020).

Se presume que el perfil metabólico de aminoácidos, monoaminas e indolaminas pueden ser nuevos biomarcadores útiles para el diagnóstico de las primeras etapas de la diabetes. Siendo así, la diabetes mellitus tipo 2 una enfermedad crónica que aparece cuando el páncreas no produce insulina suficiente o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce. Una de las alteraciones derivadas de la diabetes mellitus tipo 2 es la nefropatía, que dependiendo de la evolución del afectado puede variar en grados de afección (Rejas L, 2017).

A medida que avanza el siglo XXI, las plataformas analíticas modernas han permitido la medición eficaz de metabolitos, con resultados prometedores tanto para una comprensión más profunda de la fisiopatología de la diabetes como, en última instancia, la traducción clínica. Estudios recientes apoyan que la metabolómica representa un nuevo enfoque potencial para impulsar el

diagnóstico de la diabetes más allá de la aplicación de las pruebas de laboratorio clásicas (Lehmann R, 2013).

Una investigación puede iniciarse al darse cuenta que una situación no se desarrolla según lo esperado o lo deseado. Además, de la existencia de vacíos, necesidades o carencias (Hurtado, 2012). En tal sentido, los autores de esta investigación detectaron la ausencia de trabajos previos sobre los niveles urinarios de aminoácidos. De allí la necesidad de comparar los niveles urinarios de aminoácidos obtenidos de pacientes diabéticos con albuminuria detectable y no detectable mediante electroforesis capilar en zona con detección de fluorescencia inducida por láser.

Para esta investigación fue necesaria la obtención de las muestras de orina que fueron recolectadas en la Unidad de Endocrinología del Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes. A las muestras obtenidas, previamente preparadas, se les evaluó los niveles urinarios de aminoácidos por medio del método de electroforesis capilar en zona con detección de fluorescencia inducida por láser.

El presente trabajo esta sistematizado en correspondencia con las normas de la Asociación Americana de Psicología (APA) de la siguiente manera. En V Capítulos, el capítulo I denominado El Problema, contiene los siguientes elementos: Planteamiento del Problema, Justificación, Objetivos, Alcances y Limitaciones de la Investigación. El Capítulo II, llamado Marco Teórico comprende: Trabajos Previos, Antecedentes Históricos, Bases Teóricas y Operacionalización del evento de estudio. El capítulo III, titulado Marco Metodológico comprende los siguientes puntos: Tipo y Diseño de la Investigación, Población y Muestra, Instrumento de Recolección de Datos, Procedimientos de la Investigación y Diseño de Análisis. El capítulo IV, denominado Resultados y Discusiones. El capítulo V, llamado Conclusiones y Recomendaciones.

Finalmente, el objetivo de esta investigación fue comparar la relación entre los niveles de aminoácidos en orina determinados mediante electroforesis

capilar en zona con detección de fluorescencia inducida por láser (CZE-LIFD) en adultos diabéticos con albuminuria detectable y no detectable, que asistieron a la Unidad de Endocrinología del Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes, desde mayo de 2022 a noviembre de 2022.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La diabetes es una enfermedad metabólica crónica caracterizada por la presencia de hiperglucemia secundaria a una reducción en los niveles de insulina circulante, o un déficit en los efectos tisulares de esta hormona. La mayoría de los casos de diabetes pueden ser englobados dentro de dos grandes categorías según sea el mecanismo fisiopatológico predominante. En la diabetes mellitus tipo 1 existe un déficit absoluto en la secreción de insulina y habitualmente presenta síntomas y signos en una etapa temprana de la enfermedad. En cambio, la diabetes mellitus tipo 2 se caracteriza por la presencia de insulinoresistencia, y suele tener un periodo asintomático prolongado que dificulta su diagnóstico precoz. En tal sentido (Rojas y cols 2012) refirieron que:

La diabetes es un grupo de alteraciones metabólicas que se caracteriza por hiperglucemia crónica. Además de la hiperglucemia, coexisten alteraciones en el metabolismo de las grasas y de las proteínas. La hiperglucemia sostenida en el tiempo se asocia con daño, disfunción y falla de varios órganos y sistemas, especialmente riñones, ojos, nervios, corazón y vasos sanguíneos.

Lamentablemente, la diabetes es una causa de enfermedad renal crónica y, como tal, tiene naturaleza progresiva, no es curable y se asocia a una alta morbilidad cardiovascular. Actualmente, es la causa más frecuente de nuevos casos de enfermedad renal crónica en la mayoría de los países. La enfermedad renal crónica se define como daño renal de más de tres meses, que se distingue por anormalidades estructurales y funcionales del riñón, con

disminución de la tasa de filtración glomerular, manifestada por anomalías patológicas o marcadores de daño renal (Vázquez, I y cols 2015).

El estudio de las alteraciones metabólicas características de la enfermedad renal crónica es crucial para una mejor comprensión de la patogénesis, para identificar nuevos biomarcadores potenciales y dianas farmacológicas. Se presume, que el perfil metabólico de aminoácidos, monoaminas e indolaminas pueden ser nuevos biomarcadores útiles para el diagnóstico de las primeras etapas de la enfermedad renal diabética, al igual que la microalbúmina es un buen marcador de daño renal en estadios iniciales y, por ende, su valoración es imprescindible para orientar y dar medidas de acción preventivas concretas sobre el afectado (Rejas, L 2017).

Por otro lado, estudios afirman que los cambios en el metabolismo celular, el desarrollo de estrés oxidativo-nitrativo, la intensificación de la glicación y la peroxidación lipídica (LPO) son procesos importantes que ocurren durante la hiperglucemia crónica asociada a la diabetes mellitus (DM). Estos procesos contribuyen a desviaciones en la organización estructural y la actividad funcional de los leucocitos. El desarrollo de estrés oxidativo-nitrativo en las células de la sangre periférica durante la DM puede prevenirse con la agmatina, un metabolito endógeno de la L-arginina, que es un inhibidor del óxido nítrico sintasa (NOS) y posee propiedades hipoglucemiantes (Bila, I y cols 2019).

Ahora bien, la metabolómica de la orina ha surgido recientemente como un campo destacado para el descubrimiento de biomarcadores no invasivos que pueden detectar discrepancias metabólicas sutiles en respuesta a una enfermedad específica o intervención terapéutica. La orina, en comparación con otros biofluidos, se caracteriza por su facilidad de recolección, su riqueza en metabolitos y su capacidad para reflejar los desequilibrios de todas las vías bioquímicas dentro del cuerpo. Hoy en día, la aparición de la metabolómica (la medición y el análisis de metabolitos de alto rendimiento) ha proporcionado el marco para un análisis integral y sirve como punto de partida para generar

nuevas herramientas de diagnóstico molecular para su uso en nefrología (Betancourt, L 2021).

Las aproximaciones teóricas que sustentan esta investigación se refieren a: metabolismo de los aminoácidos, relación de los aminoácidos y la diabetes, la electroforesis capilar con fluorescencia por láser y la detección de aminoácidos con electroforesis capilar. En cuanto al metabolismo de los aminoácidos, es más complejo que el de la glucosa y los ácidos grasos. Ello se debe a que el radical hidrocarburo de su molécula (R-) es distinto para los más de veinte aminoácidos diferentes existentes. Por consiguiente, el uso de aminoácidos como la arginina o la glutamina pueden ser alternativas muy válidas para el desarrollo de propuestas terapéuticas efectivas. En el caso de la glutamina, se han identificado varios mecanismos que pueden ser efectivos en la terapia de la Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2).

Respecto al análisis de aminoácidos por electroforesis capilar (EC), abarca muchas de las aplicaciones analíticas en el campo de estos. Además, de hacer posible la separación de los aminoácidos y otros componentes de una muestra, permite la caracterización de sus propiedades. El sistema de electroforesis capilar, consiste en un capilar de sílica muy fino (150 micras de diámetro externo), lleno de buffer, cuyos extremos están sumergidos en reservorios de buffer y entre ellos se aplica un potencial eléctrico muy alto. La muestra que se va a analizar se aplica en el extremo anódico del capilar, y durante la corrida, las sustancias que la componen se separan mientras migran del ánodo al cátodo.

La situación actual del evento de estudio ha sido divulgada por diferentes autores, en los últimos cinco años, evidenciando algunos logros y razones. Al respecto, Ceballos y cols (2020) realizaron una predicción del rechazo frente a la tolerancia de los injertos de islotes pancreáticos. Estos investigadores revelaron algunos aspectos fundamentales sobre los procedimientos para llevar a cabo dichas investigaciones. Específicamente, desarrollaron un software bloqueado basado en una técnica de máquina de soporte (SVM) para

el reconocimiento de patrones en electroferogramas (EFG) generados por cromatografía electrocinética micelar y detección de fluorescencia inducida por láser (MEKC-LIFD), las predicciones se realizaron basándose únicamente en los EFG alineados obtenidos en muestras de humor acuoso de un microlitro.

Como resultado, obtuvieron un análisis donde se identificó picos discriminativos en los EFG de las tres categorías de muestras. Este software clasificador se probó con picos específicos y no específicos. La eficiencia del método con picos inespecíficos fue superior que, con picos específicos, sugiriendo que los patrones completos ofrecían mayor información útil para la clasificación. Finalmente, concluyeron que estos hallazgos demuestran la viabilidad de los enfoques de la inteligencia artificial (AI) y el aprendizaje automático (ML) para clasificar pequeñas cantidades de muestras y justifican más estudios para identificar los analitos/productos bioquímicos correspondientes a las características discriminatorias como biomarcadores potenciales de tolerancia y rechazo inmunitario del aloinjerto de islotes.

A su vez, Cordero y cols (2020) realizaron una revisión de estudios de aproximación metabólica para la identificación de biomarcadores de la nefropatía diabética para diferenciar entre etapas tempranas, evaluar y direccionar el tratamiento. Utilizaron bases de datos públicas (Pubmed y Google Scholar) y privadas (Scopus y Web of Knowledge), además, del programa MetaboAnalyst 4.0 para evidenciar las vías metabólicas que están asociadas con metabolitos en distintos bioespecímenes (orina, suero, plasma y sangre). Encontraron que con los datos de la literatura se identificaron grupos de metabolitos potenciales para la monitorización de la nefropatía diabética. Destacan en la orina: el óxido-3-hidroxiisovalerato, óxido de trimetilamina, aconitato, citrato y derivados del hidroxipropionato; en el suero: el citrato, la creatinina, la arginina y sus derivados; y en el plasma: aminoácidos como histidina, metionina y arginina.

En conclusión, la búsqueda de biomarcadores relacionados con la progresión de la nefropatía diabética junto con estrategias analíticas para su

detección y cuantificación es el punto de partida para el diseño de nuevos métodos de análisis químico-clínico. La correlación con la disfunción de vías metabólicas podría ser utilizada para la evaluación integral del tratamiento y seguimiento clínico de este padecimiento.

Posteriormente, Morze y cols (2022) efectuaron una revisión sistemática actualizada y un metaanálisis de los marcadores de metabolitos en plasma, suero y orina, y la incidencia de diabetes tipo 2. Seleccionaron estudios observacionales prospectivos en los que los investigadores utilizaron técnicas de alto rendimiento para investigar la relación entre los metabolitos del plasma, suero, orina y la diabetes tipo 2 incidente. Como resultado, obtuvieron que en el metaanálisis para 412 metabolitos de los cuales 123 se asociaron estadísticamente de manera significativa con riesgo de diabetes tipo 2. Así mismo, los niveles plasmáticos y séricos más altos de ciertos aminoácidos incluidos en el metaanálisis se asociaron con un mayor riesgo y los niveles más altos de glicina, glutamina, betaina, entre otros, se asociaron con un menor riesgo. Estos hallazgos apoyan la idea que varios metabolitos plasmáticos y séricos, incluidos aminoácidos, lípidos y carbohidratos están asociados con riesgo de diabetes tipo 2.

Una vez descrita la situación actual del problema de estudio, las autoras de esta investigación formularon el siguiente enunciado holopráxico:

¿Cuál será la relación entre los niveles de aminoácidos en orina determinados mediante electroforesis capilar en zona con detección de fluorescencia inducida por láser (CZE-LIFD) en adultos diabéticos con albuminuria detectable y no detectable, que asistirán a la Unidad de Endocrinología del Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes, desde mayo de 2022 a noviembre de 2022?.

JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

La Diabetes mellitus tipo 2 se considera una de las enfermedades crónicas con mayor impacto en la calidad de vida de la población mundial y constituye un verdadero problema de salud; pertenece al grupo de las enfermedades que producen invalidez física por sus variadas complicaciones multiorgánicas, con un incremento indudable en la morbilidad y mortalidad en los últimos años, independientemente de las circunstancias sociales, culturales y económicas de los países. Existen varios objetivos para el tratamiento del diabético tipo 2, pero su esencia radica en el control metabólico y la prevención de las complicaciones (Reyes, F y cols 2016).

Todas las enfermedades producen cambios químicos en el organismo. Estos cambios generalmente afectan el metabolismo de las células del paciente, lo que se refleja en los cambios de la composición química de los principales líquidos orgánicos, como la sangre, la orina y el líquido cefalorraquídeo. Uno de los problemas cruciales en la medicina moderna es detectar biomarcadores putativos que sirven como herramientas de diagnóstico temprano para identificar un subconjunto de pacientes con mayor riesgo de enfermedad. Los repertorios de sustancias bioquímicas (o moléculas pequeñas) presentes en las células, los tejidos y los fluidos corporales se conocen como metaboloma (Kaddurah-Daouk, R 2008).

En países como Venezuela, existe una escasez importante y crítica en la investigación de metabolómica para identificar biomarcadores de enfermedades y permitir el diagnóstico temprano de muchas enfermedades prevenibles. En el Laboratorio de Fisiología de la Conducta de la Escuela de Medicina de la Universidad de los Andes, se han dedicado a mejorar las técnicas de análisis químico de fluidos orgánicos y desarrollar nuevas tecnologías de química analítica. Por ejemplo, en las últimas dos décadas, ese laboratorio ha aplicado con éxito la electroforesis capilar en zona con detección de fluorescencia inducida por láser (CZE-LIFD, por sus siglas en inglés) al

estudio de la metabolómica de la meningitis, la pre-eclampsia, mecanismos de circuitos de memoria del cerebro, esquizofrenia, enfermedad de Parkinson (EP) y neurodesarrollo. También han desarrollado técnicas analíticas capaces de detectar concentraciones nanomolares de monoaminas, poliaminas y numerosos aminoácidos en fluidos biológicos (Betancourt, L 2021).

La metabolómica de la orina ha surgido recientemente como un campo destacado para el descubrimiento de biomarcadores no invasivos que pueden detectar discrepancias metabólicas sutiles en respuesta a una enfermedad específica o intervención terapéutica. La orina, en comparación con otros biofluidos, se caracteriza por su facilidad de recolección, su riqueza en metabolitos y su capacidad para reflejar los desequilibrios de todas las vías bioquímicas dentro del cuerpo (Betancourt, L 2021).

Se están logrando grandes avances en la eliminación de importantes barreras para la prevención y el tratamiento exitoso frente a enfermedades como la diabetes, lo que podría ser clave para aumentar la productividad de los pacientes y mejorar su calidad de vida. Además, el diagnóstico precoz y preciso de enfermedades comunes reduce los costos médicos, lo cual es particularmente importante en los países pobres y en desarrollo, como el nuestro.

Objetivos de la investigación

Objetivo general

- Comparar la relación entre los niveles de aminoácidos en orina determinados mediante electroforesis capilar en zona con detección de fluorescencia inducida por láser (CZE-LIFD) en adultos diabéticos con albuminuria detectable y no detectable, que asistieron a la Unidad de Endocrinología del Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes, desde mayo de 2022 a noviembre de 2022.

Objetivos específicos

- Detectar los niveles de aminoácidos en la orina usando un método basado en la electroforesis capilar en zona con detección de fluorescencia inducida por láser, en la unidad de investigación.
- Calcular las concentraciones de aminoácidos mediante curvas de calibración en las muestras de orina analizadas.
- Comparar los niveles de aminoácidos en orina de pacientes diabéticos con albuminuria detectable y no detectable, en la unidad de investigación.
- Determinar las variaciones en la concentración de aminoácidos en orina, en la unidad de investigación.

Alcances y limitaciones de la investigación

www.bdigital.ula.ve
Alcances de la investigación

Según Hernández- Sampieri y cols (2010), el alcance de una investigación está relacionado con la profundidad y/o logro de la misma. En tal sentido, el logro de la investigación permitirá comparar la relación entre los niveles de aminoácidos en orina determinados mediante electroforesis capilar en zona con detección de fluorescencia inducida por láser en adultos diabéticos con albuminuria detectable y no detectable. Además, existe la posibilidad de que esta investigación pueda orientar a la determinación de biomarcadores tempranos para el diagnóstico precoz y el tratamiento oportuno de pacientes diabéticos, antes de que ocurra el daño renal.

Limitaciones de la investigación

Es importante considerar que una investigación, aunque tenga un alcance concreto, podría tener limitaciones. En tal sentido, las limitaciones que se puedan presentar son las siguientes: La insuficiente cantidad de muestras de pacientes con diabetes tipo 2. Además, ya que no se ha hecho antes, las referencias sobre esta investigación son limitadas. Así como también, que esta técnica solo nos permite marcar moléculas que tengan un grupo amino primario y existen límites de detección del método.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos Previos

Ceballos y cols (2020), publicaron en la revista PLOS One, un trabajo titulado: Un enfoque de aprendizaje automático para predecir el rechazo frente a la tolerancia de los injertos de islotes pancreáticos. El objetivo fue demostrar la viabilidad de utilizar un enfoque AI/ML en un conjunto de datos relativamente pequeños para discriminar entre tres categorías de muestras obtenidas de ratones. El diseño de investigación fue de laboratorio. Para analizar muestras de humor acuoso, desarrollaron un software bloqueado basado en una técnica de máquina de vector de soporte (SVM) para el reconocimiento de patrones en electroferogramas (EFG) generados por MEKC-LIFD, para predecir si un animal trasplantado había rechazado o tolerado sus aloinjertos de islotes, o si no había sido trasplantado por completo. Estas predicciones se hicieron basándose únicamente en la altura de los picos en los EFG completos alineados de un total de 22 ratones que fueron trasplantados. Los resultados demostraron un análisis donde se identificaron picos discriminativos de los EFG de las tres categorías de muestras. Trabajando con los patrones de picos no dirigidos (es decir, basados en el patrón completo de los EFG), se pudo lograr un puntaje de clasificación positivo de 21 y 22 con una precisión de predicción correspondiente del 95,45% entre las tres categorías de muestras y 100% de precisión entre los destinatarios que rechazan y los tolerantes. Estos hallazgos demuestran la viabilidad de los enfoques de la AI/ML para clasificar pequeñas cantidades de muestras y justifican más estudios para identificar los analitos/productos bioquímicos correspondientes a las características discriminatorias como biomarcadores potenciales de tolerancia

y rechazo inmunitario del aloinjerto de islotes. Este trabajo se incluye como antecedente previo ya que los autores consideraron que el método sensible usado en esta investigación para detectar metabolitos en muestras de menor tamaño, es similar al que fue empleado en la presente investigación.

Cordero y cols (2020), publicaron en la revista PLOS One, un trabajo titulado: Metabolómica de la nefropatía diabética: detrás de la huella digital de los indicadores de desarrollo y progresión. El objetivo fue realizar una revisión de estudios de aproximación metabolómica para la identificación de biomarcadores de esta enfermedad con potencialidad para diferenciar entre etapas tempranas, evaluar y direccionar el tratamiento y coadyuvar a ralentizar el daño renal. El diseño de investigación fue documental. Utilizando bases de datos públicas (Pubmed y Google Scholar) y privadas (Scopus y Web of Knowledge), se realizó una búsqueda sistemática de la información que se ha publicado de metabolómica de la nefropatía diabética en distintos bioespecímenes (orina, suero, plasma y sangre). Posteriormente, se utilizó el programa MetaboAnalyst 4.0 para evidenciar las vías metabólicas que están asociadas con estos metabolitos. Encontraron que con los datos de la literatura se identificaron grupos de metabolitos potenciales para la monitorización de la nefropatía diabética. Destacan en la orina: el óxido-3- hidroxisovalerato, óxido de trimetilamina, aconitato y citrato y derivados del hidroxipropionato; en el suero: el citrato, la creatinina, la arginina y sus derivados; y en el plasma: aminoácidos como histidina, metionina y arginina. Utilizando el programa MetaboAnalyst 4.0 se detectaron las rutas metabólicas que están relacionadas con estos metabolitos. Refirieron que la búsqueda de biomarcadores relacionados con la progresión de la nefropatía diabética junto con estrategias analíticas para su detección y cuantificación son el punto de partida para el diseño de nuevos métodos de análisis químico-clínico. La correlación con la disfunción de vías metabólicas podría ser utilizada para la evaluación integral del tratamiento y seguimiento clínico de este padecimiento. Este trabajo se incluye como antecedente previo ya que los autores consideraron que son

pocos los estudios metabólicos realizados en la población que padece esta condición.

Morze, Wittenbecher y cols (2022) publicaron en la revista PLOS One, un trabajo titulado: Metabolómica y riesgo de diabetes tipo 2: una revisión sistemática actualizada y un metaanálisis de estudios cohortes prospectivos. El objetivo fue efectuar una revisión sistemática actualizada y un metaanálisis de los marcadores de metabolitos en plasma, suero y orina y la incidencia de diabetes tipo 2. El diseño de investigación fue documental. Para la investigación seleccionaron estudios observacionales prospectivos en los que los investigadores utilizaron técnicas de alto rendimiento para investigar la relación entre los metabolitos del plasma, suero, orina y la diabetes tipo 2 incidente. Como resultado obtuvieron un metaanálisis para 412 metabolitos de los cuales 123 se asociaron estadísticamente de manera significativa con riesgo de diabetes tipo 2. Así mismo, los niveles plasmáticos y séricos más altos de ciertos aminoácidos incluidos en el metaanálisis se asociaron con un mayor riesgo y los niveles más altos de glicina, glutamina, betaina, entre otros, se asociaron con un menor riesgo. Los autores refirieron que apoyan la idea que varios metabolitos plasmáticos y séricos, incluidos aminoácidos, lípidos y carbohidratos están asociados con riesgo de diabetes tipo 2. Este trabajo se incluye como antecedente previo ya que los autores consideraron que evidencia la relación de los aminoácidos u otros metabolitos y pacientes diabéticos tipo 2, lo cual es la base de esta investigación.

Antecedentes Históricos

La diabetes mellitus (DM) es un problema médico reconocido por la humanidad desde hace miles de años. Es notable que entre las formas de tratar la DM figuraran desde la antigüedad las modificaciones de la dieta y el aumento de la actividad física, ambos ejes del tratamiento actual. A la humanidad le ha llevado muchos años llegar a tener el conocimiento

contemporáneo de la DM. Con el impresionante desarrollo de la biología molecular en las últimas décadas, el panorama del conocimiento de la DM cambió radicalmente. Tal vez, en un futuro cercano se haga posible la meta anhelada por siglos: curar la diabetes mellitus (Chiquete y cols, 2001).

Durante décadas, la medida de glucosa, hemoglobina A1c, insulina y péptido C han sido pruebas de laboratorio de elección para detectar y controlar la diabetes. Sin embargo, estudios afirman que estas pruebas no identifican a los individuos en riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 (DM2), lo cual sería un prerrequisito para la prevención individualizada. La prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG) sigue siendo el único medio para la identificación temprana y fiable de las personas en fase de pre-diabetes con intolerancia a la glucosa (ITG). Este procedimiento, sin embargo, consume mucho tiempo, es costoso y no es adecuado como método de screening. La búsqueda de genes de riesgo diabético fue la primera y más intensamente perseguida estrategia para la prevención y el tratamiento individualizado de la diabetes. En los últimos 20 años se han analizado cohortes de miles de personas, y se han identificado más de 70 loci de susceptibilidad, relacionados con DM2 y rasgos metabólicos afines (Lehmann R, 2013).

Estudios recientes apoyan que la metabolómica representa un nuevo enfoque potencial para impulsar el diagnóstico de la diabetes más allá de la aplicación de las pruebas de laboratorio clásicas para diabetes. Esta estrategia consiste en la descripción de cientos de metabolitos (metabolómica dirigida) o miles de metabolitos (metabolómica no dirigida). Entre estos metabolitos, están los aminoácidos que son los componentes básicos de las proteínas y en diversas poblaciones se ha visto que trastornos de aminoácidos predicen el desarrollo de la resistencia a la insulina y la diabetes (Lehmann R, 2013).

Bases Teóricas

Aproximación teórica sobre el metabolismo de los aminoácidos

Los aminoácidos son los componentes primarios de las proteínas, las cuales son agentes esenciales del metabolismo y elementos estructurales del organismo. Además de este papel, los aminoácidos tienen otras funciones muy distintas, entre las que podemos destacar las siguientes: son fuente de nitrógeno orgánico para la síntesis de moléculas tales como las porfirinas, purinas, pirimidinas, aminoazúcares, etc. Aportan fragmentos de un carbono en el contexto del metabolismo; participan en los procesos de eliminación del exceso de nitrógeno en el organismo; son precursores de hormonas y neurotransmisores (e incluso algunos aminoácidos actúan directamente como tales hormonas o neurotransmisores); son substratos energéticos de gran importancia (Castillon E, 2011).

A pesar de que todos los aminoácidos tienen una estructura básica común, su metabolismo es más complejo que el de la glucosa y los ácidos grasos. Ello se debe a que el radical hidrocarburo de su molécula (R-) es distinto para los más de veinte aminoácidos diferentes existentes, lo que hace que las fuentes y vías de síntesis y degradación de los aminoácidos sean muy diversas (Castillon E, 2011).

Aproximación teórica sobre la relación de los aminoácidos y la diabetes

El uso de aminoácidos como la arginina o la glutamina pueden ser alternativas muy válidas para el desarrollo de propuestas terapéuticas efectivas. En el caso de la glutamina, se han identificado varios mecanismos que pueden ser efectivos en la terapia de la Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2). El principal implicado es la relación existente entre la glutamina y la secreción del péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1), hormona responsable de la estimulación de la producción de insulina y disminución de la secreción de glucagón. También parece estar implicada en el aumento de la sensibilidad muscular a la insulina, al igual que en la estimulación directa de las células

beta del páncreas y en la inhibición de la neoglucogénesis intestinal (García N, 2019).

La glutamina es el aminoácido más abundante en el organismo. Aparte de su papel para contribuir a la formación de proteínas, la glutamina es fuente básica de energía, principalmente para las células intestinales y del sistema inmunológico. Hay varios estudios que han propuesto una supuesta implicación de este aminoácido con la mejora y estabilización de la glucemia en individuos con DM2 (García N, 2019).

Aproximación teórica sobre la electroforesis capilar con fluorescencia por láser

El sistema de electroforesis capilar, consiste en un capilar de sílica muy fino, lleno de buffer, cuyos extremos están sumergidos en reservorios de buffer y se aplica un potencial eléctrico muy alto entre ellos. La muestra que se va a analizar se aplica en el extremo anódico del capilar, y durante la corrida, las sustancias que la componen se separan mientras migran del ánodo al cátodo. La separación y migración de los analitos en la muestra, depende de la movilidad electroforética y del flujo electroosmótico (Vargas J, 2005).

El sistema de detección de fluorescencia inducida por láser con geometría colineal, consiste en dirigir y enfocar un haz de un láser sobre el capilar, cerca del extremo catódico, utilizando para ello, un espejo dicróico y un objetivo, respectivamente. La fluorescencia emitida por los componentes de la muestra, se recoge sobre la línea en que incide el haz de láser, y la señal colectada luego de pasar por dos filtros ópticos, se amplifica mediante un fotomultiplicador, el cual envía la señal a un computador para su registro. (Vargas J, 2005).

Aproximación teórica sobre la detección de aminoácidos con electroforesis capilar

El análisis de aminoácidos por electroforesis capilar (EC) abarca muchas de las aplicaciones analíticas en el campo de estos. Además de hacer posible la separación diversos componentes de una muestra, permite la caracterización de sus propiedades. De hecho, el análisis de aminoácidos, junto con el análisis y secuenciación del ADN, corresponde claramente al campo de aplicación más amplio y más estudiado de la EC (Sevilla, M y cols, 2014).

La electroforesis de aminoácidos en orina permite detectar y estimar la concentración de componentes monoclonales u otros trastornos. Cabe destacar, que con la EC se puede alcanzar un límite de detección (LOD) en masa muy bajo, debido a los volúmenes tan pequeños que se requiere inyectar para realizar las separaciones (del orden de nanolitros). Este aspecto la hace muy interesante en el campo de aplicación de análisis de aminoácidos en muestras biológicas, ya que con una muestra de pocos microlitros se puede hacer un elevado número de análisis (Sevilla, M y cols, 2014).

www.bdigital.ula.ve

Definiciones Conceptuales

Factores que influyen en la diabetes

Existen muchos factores relacionados con el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2, algunos no modificables como edad, sexo, historia familiar, región de origen, a los que se suman los modificables relacionados con el estilo de vida, como peso corporal, inactividad física, tabaquismo y consumo de alcohol. El conocimiento de dichos factores de riesgo permite desarrollar actividades preventivas, promotoras y políticas de salud, a fin de modificarlos en la población de mayor riesgo y de ese modo disminuir las tasas de la enfermedad y sus complicaciones (Leiba, A y cols, 2018).

Principio fisicoquímico de la electroforesis capilar

Las moléculas son separadas por las fuerzas del campo eléctrico aplicado. Recordemos que la electroforesis ha sido definida como el movimiento diferencial de especies cargadas (iones) o no, por atracción o repulsión en un campo eléctrico. Las muestras separadas en el capilar son monitoreadas por el detector y los picos del electroferograma son similares a los de la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), y se generan como consecuencia de la concentración de los analitos y de su velocidad de migración (Castagnino, 2000).

Las muestras son introducidas en el capilar por electroforesis, por electrocinética, o por desplazamiento por inyección. Durante la inyección electroforética, el capilar está sumergido en la muestra y se aplica el alto voltaje. Los iones de la muestra migran dentro del capilar en relación a sus movilidades electroforéticas. Si la fuerza iónica de la solución muestra es más baja que el buffer electroforético, los cambios en el campo eléctrico de la interfase muestra-buffer producen un efecto de enfoque o stacking, en el cual los iones del analito aparecen concentrados alrededor de la zona de la interfase. Este proceso de delineamiento de la zona, puede producir incrementos en la detección de la sensibilidad y poder de resolución. El efecto de enfoque, puede producir cambios sustanciales en la inyección electroforética (Castagnino, 2000).

Definición operacional de términos

Función renal

Es el estudio del órgano que regula la excreción de los productos de desecho. Como ocurre con el resto de nuestro organismo la fisiología renal está ligada a la estructura excretora renal, diseñada para mantener un flujo unidireccional. Este flujo hará que la orina que inicia su formación en los riñones, órganos esenciales y principales del sistema, pase a través de los

uréteres a la vejiga urinaria para su almacenamiento, para que posteriormente pueda ser eliminada a través de la uretra (Carracedo, J y cols, 2020).

Daño renal

Se define como alteraciones microanatómicas que ocurren en la membrana de filtración glomerular en las primeras etapas del daño renal (Carracedo, J y cols, 2020).

Uroanálisis

También llamado análisis de la orina, es considerado un examen con gran sensibilidad para detectar alteraciones del tracto urinario e incluso sistémicas, este tipo de alteraciones multifactoriales son el resultado de interacciones entre factores ambientales, hormonales, genéticos y anatómicos; dentro de los factores ambientales encontramos los hábitos alimenticios encontrando una relación fuerte con el sobrepeso, obesidad, la deshidratación, entre otros (Galindo, L y cols, 2019).

Albuminuria

La albuminuria se define como la pérdida de albumina en orina. Se trata de un hallazgo común a muchas patologías renales. El rango de excreción de albumina es altamente variable, siendo tradicionalmente considerado patológico un CAC >30mg/g. La albuminuria puede oscilar desde la pérdida de escasos miligramos a la pérdida franca de gramos de albumina en orina de 24 horas (Vergara, A y cols, 2022).

Biomarcador

Se define como aquellas características biológicas, bioquímicas, antropométricas, fisiológicas, entre otras, objetivamente mensurables capaces de identificar procesos fisiológicos o patológicos, o bien una respuesta farmacológica a una intervención terapéutica. El biomarcador ideal debe ser específico, sensible, predictivo, rápido y económico, estable in vivo e in vitro, no invasivo y que tenga suficiente relevancia pre-clínica y clínica como para modificar las decisiones relativas al proceso patológico en que se aplica (Raimondi y cols, 2021).

Metabolómica

Consiste en la evaluación de todos los metabolitos producidos por el organismo en una muestra de tejido o en un fluido orgánico. Proporciona información completa sobre los procesos metabólicos de la célula, a diferencia de la genómica, la transcriptómica o la proteómica, que no informan sobre los productos de las reacciones metabólicas. Los metabolitos identificados incluyen productos del metabolismo intermediario, hormonas y otras moléculas de señalización (Icart P y cols, 2020).

Aminoácido

Los aminoácidos son moléculas orgánicas que contienen un grupo amino primario (NH₂) en uno de los extremos de la molécula y un grupo ácido carboxílico (COOH) en el otro extremo. Son las unidades que forman a las proteínas, sin embargo, tanto estos como sus derivados participan en funciones celulares tan diversas como la transmisión nerviosa y la biosíntesis de porfirinas, purinas, pirimidinas y urea (Vázquez I, y cols, 2015).

Poliaminas

Las poliaminas son moléculas alifáticas nitrogenadas de bajo peso molecular con grupos amino distribuidos de forma regular a lo largo de su estructura. Entre sus principales funciones destacan el empaquetamiento de ácidos nucleicos, la modulación de receptores de membrana y canales iónicos, la regulación de la expresión génica y la señalización celular (Guasco C, y cols 2014).

Arginina

La L-arginina es un aminoácido semi-esencial se encuentra formando parte de las proteínas, es precursor del óxido nítrico (NO) por medio de la enzima óxido nítrico sintetasa (Lowenstein, C y cols 1994).

Agmatina

Molécula derivada de la arginina, ha sido identificada como una poliamina. Es una amina policatiónica que es sintetizada por descarboxilación de la L-arginina y que fue originalmente identificada como neurotransmisor (Gómez C, y cols (2008).

Operacionalización del evento de estudio

Las variables se operacionalizaron con el fin de medirlas. En tal sentido, Palella y Martins (2006), han referido que las variables son conceptos abstractos y de esta manera no se pueden medir. Al respecto, es necesario, para medirlas, transformarlas en empíricas. Por eso, se definen y categorizan para identificar el identificador específico. A continuación, se presenta el cuadro de operacionalización del evento de estudio (Tabla 1).

Tabla 1. [Operacionalización del evento de estudio]

1.Evento	2.Definición Conceptual ¿Qué es?	3.Definición operacional ¿Cómo se mide?
Cambio en los niveles de aminoácidos en orina mediante electroforesis capilar en zona con detección de fluorescencia inducida por láser en adultos diabéticos con microalbuminuria detectable y no detectable	Los aminoácidos desde un punto de vista estructural, son los elementos componentes de las proteínas y estas a su vez son las estructuras que componen cualquier tejido vivo, su presencia es tan relevante, que se les conoce como los constructores de la vida. Desde un punto de vista funcional, los aminoácidos cumplen importantes funciones, entre ellas, su intervención en el metabolismo energético, y su acción anti estrés minimizando los efectos nocivos que provocan ciertas enfermedades (Morales y cols, 2017)	Electroforesis capilar con fluorescencia inducida por láser. Es una herramienta de separación de moléculas, presenta la versatilidad de poder separar aminoácidos, ácidos orgánicos, carbohidratos, material genético, entre otros. Este método generalmente se combina con el uso del láser para la detección de sustancias trazas con una preparación previa de la muestra para marcar las sustancias a medir con una sustancia fluorescente. (Magaña y cols, 2009).
Dimensiones	Indicador	
Niveles de aminoácidos en orina.	Monitoreo de Picos mediante electroferograma.	
Albuminuria detectable y no detectable	Método de ultramicro ELISA de tipo sándwich simple (UMELISA)	

Fuente: Novoa, Quintero y Betancourt (2022).

CAPÍTULO III

MARCO METOLÓGICO

Tipo de investigación

El tipo de investigación tiene relación con la interrogante de estudio en el cual resalta lo que se quiere saber, pues esto marca el logro general que se desea conseguir durante el proceso de la investigación, a través de la pregunta y el objetivo general enunciado con el verbo específico. Es importante resaltar, que existen distintos tipos de investigación. Entre ellos, la investigación comparativa que tiene por objetivo lograr la identificación de diferencias o semejanzas con respecto a la aparición de un evento en dos o más contextos (Hurtado, 2010). En tal sentido, esta investigación buscó comparar la relación entre los niveles de aminoácidos en orina determinados mediante electroforesis capilar en zona con detección de fluorescencia inducida por láser (CZE-LIFD) en adultos diabéticos con albuminuria detectable y no detectable en una unidad de estudio y contexto determinado. Por lo tanto, este trabajo corresponde a una investigación comparativa.

Diseño de investigación

Las tácticas que se utilizaron en este trabajo de investigación definieron el diseño. Específicamente, el diseño de una investigación se refiere a la estrategia que adopta el investigador para responder al problema, dificultad o inconveniente planteado en el estudio, puede ser no experimental, experimental y bibliográfico (Palella y Martins, 2006). Con respecto a lo anterior, (Hurtado, 2010), señalo que el diseño guarda relación con el dónde, cuándo y la amplitud de la información que se recolectara. En tal sentido, esta

investigación tuvo un diseño de campo y de laboratorio, univariable o unieventual. Al respecto, los datos clínicos y la muestra se recolectaron en la Unidad de Endocrinología del IAHULA. Las muestras de orina fueron analizadas en el Laboratorio de Medicina y Biología experimental, Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes.

Población y muestra

Unidad de investigación

El grupo de estudio estuvo representado por los adultos diabéticos, que asistieron a la Unidad de Endocrinología del Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes. Luego de obtener el previo consentimiento informado de los pacientes, se incluyeron los pacientes que cumplieron con los siguientes criterios de inclusión: adultos con diabetes.

Selección del tamaño de la muestra

La “n” muestral fue determinada de acuerdo a la disponibilidad de reactivos en el laboratorio. En tal sentido, se incluyeron 30 muestras urinarias provenientes de los pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión de esta investigación, cuyas edades varían entre 21 años y 60 años.

Sistema de variables

La variable relacionada con la investigación son los niveles de aminoácidos en orina. Sin embargo, esta variable no fue sistematizada en dependiente o independiente, ya que esta investigación es comparativa. Por lo tanto, no se estudiará una relación de causa-efecto, sino de correspondencia.

Instrumento de recolección de datos

La recolección de la información pertinente se realizó a través de un software hecho en casa basado en LabVIEW para el reconocimiento de patrones en electroferogramas (EFG) generados por electroforesis capilar en zona con detección de fluorescencia inducida por láser (CZE- LIFD).

Procedimientos de la investigación

Obtención de las muestras de orina

Se incluyó, en el presente estudio a los pacientes que aceptaron y firmaron el consentimiento para participar. A cada paciente que acudió a la Unidad de Endocrinología el día de su consulta se le recogió una muestra de orina de 20cc en un recolector estéril para la determinación de la albuminuria por tira reactiva y posteriormente para la electroforesis y análisis metabólico. Se procedió a trasladar al laboratorio CEPREMAD anexo al IAHULA donde se analizaron 10cc de la muestra por medio de un estudio denominado UMELISA microalbuminuria.

La otra parte de la muestra de orina se transportó el mismo día al Laboratorio de Biología y Medicina Experimental (LABIOMEX) de la Universidad de Los Andes donde se realizó la electroforesis capilar para determinar el patrón metabólico de cada muestra.

Preparación de la muestra

Se tomó una fracción de la muestra con una jeringa de 1 ml, la cual se unió a un filtro de nylon de 0,20 micras y 13 mm de diámetro por donde fue filtrada la muestra siendo almacenada en un tubo eppendorf. Posteriormente se tomó 20 µl con una pipeta y se añadió a un tubo de plástico y se mezcló con 20 µl

de la solución derivatizadora. Se procedió a agitar mediante vortex durante 30 segundos. Se espero aproximadamente 15 minutos y luego la muestra pudo ser analizada en el aparato de electroforesis capilar con fluorescencia inducida por láser (Betancourt, 2021).

Derivatización de la muestra (marcaje con fluorescamina)

La muestra guardada en un eppendorf (600µL) se esperó a que alcanzara una temperatura ambiente para poder ser tratada. Luego en un tubo de plástico se agregó un volumen de muestra estándar de 20 µL y posteriormente se le añadió 20 µL de solución derivatizadora filtrada. Cada muestra fue derivatizada con igual cantidad de una mezcla de acetona/fluorescamina (2mg de fluorescamina en 1 ml de acetona). Se llevó a agitación en el vortex por aproximadamente 30 segundos. Una vez transcurrido el tiempo necesario se pasaron las muestras por el equipo (Betancourt, 2021).

Corrida electroforética

Las mediciones se realizaron en un aparato R2D2-1 CZE-LIFD (Meridialysis Co., Mérida, Venezuela) equipado con un ion argón láser de 20 mW y con un capilar de silica fundida de 64 cm de largo, 25 micras de diámetro interno y 350 micras de diámetro externo. Se uso la línea de 405 nm.

El equipo se preparó antes de realizar alguna lectura lavando con: hidróxido de sodio (NaOH) filtrado al 1 M por 6 minutos, luego con agua desionizada filtrada con 18 MW por 6 minutos y por último con buffer carbonato filtrado y desgasificado al 20 mM por 6 minutos. Los estándares de aminoácidos y las muestras derivatizadas fueron inyectadas hidroareodinamicamente por el extremo anódico del capilar mediante la aplicación de una presión negativa de 13 p.s.i por 1 seg en el extremo catódico del capilar. La muestra se corrió durante 25 minutos para poder tener un electroferograma de alta calidad.

Después de separadas las sustancias por fuerza electrosmotica y electroforética fueron detectadas en un detector colineal que recibe un rayo láser de 405 nm y 10 mW de potencia emanado de un tubo de ion argón. El láser es conducido al detector mediante una fibra óptica, es desviado hacia un objetivo de apertura numérica alta mediante un espejo dicroico centrado a 405 nm. La fluorescencia es recogida por el mismo objetivo, atraviesa el espejo dicroico y es concentrada, mediante un ocular, en la ventana fotosensible de un tubo fotomultiplicador. La señal del tubo fotomultiplicador es alimentada en un computador equipado con el software CZE – 2 (Betancourt y cols, 2012).

Análisis de los datos

Por medio del electroferograma de cada muestra se identificó la presencia de aminoácidos, por el tiempo de aparición y por la altura de la espiga o pico. La certeza de que fuese el aminoácido de interés fue comprobada de la siguiente manera: después de haber corrido la muestra problema obteniendo un primer electroferograma y acondicionado el equipo nuevamente para volver a hacer otra corrida, se combinó la muestra (inyección de 1 segundo) con una solución patrón de concentración conocida de los aminoácidos en estudio (inyección de 1,2 segundos), luego se volvió a correr la muestra con la solución estándar. Al obtener el segundo electroferograma se superpusieron ambos electroferogramas para constatar que el pico que creció en el segundo electroferograma comparado con el primer electroferograma fue el correspondiente al aminoácido de importancia.

Este proceso es dado partiendo de una muestra que tiene una concentración de una sustancia X que se desea conocer (para el presente caso la solución de aminoácidos urinarios), esta última cuando se mezcla con una solución patrón a una concentración conocida de la sustancia todos los demás analitos presentes en la matriz disminuyen su concentración y aumenta aquella sustancia que se le está agregando en mayor proporción. Por tanto,

como los analitos tienen un tiempo de migración muy similar por su comportamiento molecular y de cargas se puede ubicar la exactitud de la espiga del aminoácido de interés en el electroferograma correspondiente solo a la muestra. (Betancourt y cols, 2012).

Por lo tanto, una vez obtenidos los resultados de los análisis realizados en el laboratorio CEPREMAD se procedió a comparar los resultados con los patrones metabolómicos obtenidos en el LABIOMEX de la Universidad de los Andes.

Recolección de la Información

Se crearon hojas de cálculo de Excel ® para almacenar la información sobre las variables a estudiar para su procesamiento posterior.

Análisis Estadístico

www.bdigital.ula.ve

Los cálculos de los promedios, las desviaciones típicas y los análisis estadísticos se realizarán con la hoja de cálculo Excel ® y el paquete estadístico SPSS. Para comparar las varianzas entre las medias de diferentes grupos se utilizó el índice de varianza (ANOVA). Se evaluó el tipo de distribución de los datos con la prueba de Tukey-Kramer. Para los datos agrupados según distribuciones normales se analizaron por medio de la prueba estadística de T apareada y el análisis de varianza de un factor. Se realizaron análisis de correlación y regresión para evaluar la asociación entre variables. Se calcularon los valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo negativo, valor predictivo positivo de cada una de las pruebas utilizadas. Se asignará un valor significativo de P cuando ésta sea menor de 0.05.

Variables estadísticas

Las variables estadísticas de esta investigación fueron clasificadas desde su naturaleza y escala de medida. El fin es identificar el indicador estadístico pertinente (Tabla 2).

Tabla 2. Variables estadísticas según la naturaleza, escala de medida e indicadores estadísticos

Variables	Tipo de variable			Escala de medidas				Indicador Estadístico
	Cualitativa	Cuantitativa		Nominal	Ordinal	Intervalo	Razón	
		Discreta	Continua					
Niveles de aminoácidos en orina	NO	NO	SI	NO	NO	NO	NO	NO

Fuente: Novoa y Quintero, 2022.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Análisis de los resultados

Características generales de los pacientes incluidos en el estudio.

El presente estudio fue realizado con la participación de los pacientes de la consulta externa del Servicio de Endocrinología del IAHULA. Se incluyeron 30 pacientes con un promedio de edad $51,48 \pm 32,5$ años, el 54,38% de los pacientes eran de sexo femenino, 23 pacientes eran procedentes de la ciudad de Mérida, lo que representó el 74,19% y 8 de otras localidades (Ejido, Tabay, Mucuchies), lo que representó el 25,80% de la población estudiada (Tabla1).

La glicemia capilar fue en promedio de $179,67 \text{ mg/dl} \pm 39,35$ (DS) reportada en 25 pacientes al momento de la recolección de la muestra. La hemoglobina glicosilada fue en promedio de $6,98\% \pm 1,03$ (DS) obtenida en 10 pacientes que acudieron al área de Endocrinología (Tabla1).

La albuminuria fue catalogada como no detectable en 13 pacientes, normal en 2 pacientes y elevada en 15 pacientes (Tabla1).

Tabla 3 Características generales de los pacientes que participaron en el estudio.

PARAMETROS	N (DS)
EDAD (Años)	51,48 ± 32,5
SEXO (%)	
Masculino	43.4 ± 24.5
Femenino	53,2 ± 15,4
PROCEDENCIA (%)	
Mérida	74,19
Otros Lugares	25,81
GLICEMIA CAPILAR N (DS) mg/dl	179,67± 39,35
HbA1C (%)	6,98 ±1,03
HbA1C con Alb >20mg/L N (%)	7 (22,58%)
HbA1C con Alb indetectable N (%)	3 (9,6%)
Albuminuria	
Rango Alto (>20mg/L)	15 (50%)
Rango Normal (0.1-19.90mg/L)	2 (6,66%)
Rango Bajo (<0.1mg/L) indetectable	13 (43,33%)

Nota: En los pacientes con HbA1C con Alb >20mg/L se obtuvo un valor de p 0,43361

Resultados de la corrida electroforética

Cada pico corresponde a un metabolito, la altura y el ancho del pico midieron la cantidad de cada metabolito encontrado en la muestra. Los picos de arginina y agmatina fueron significativamente mayores ($P < 0,041798$). (Figura 1).

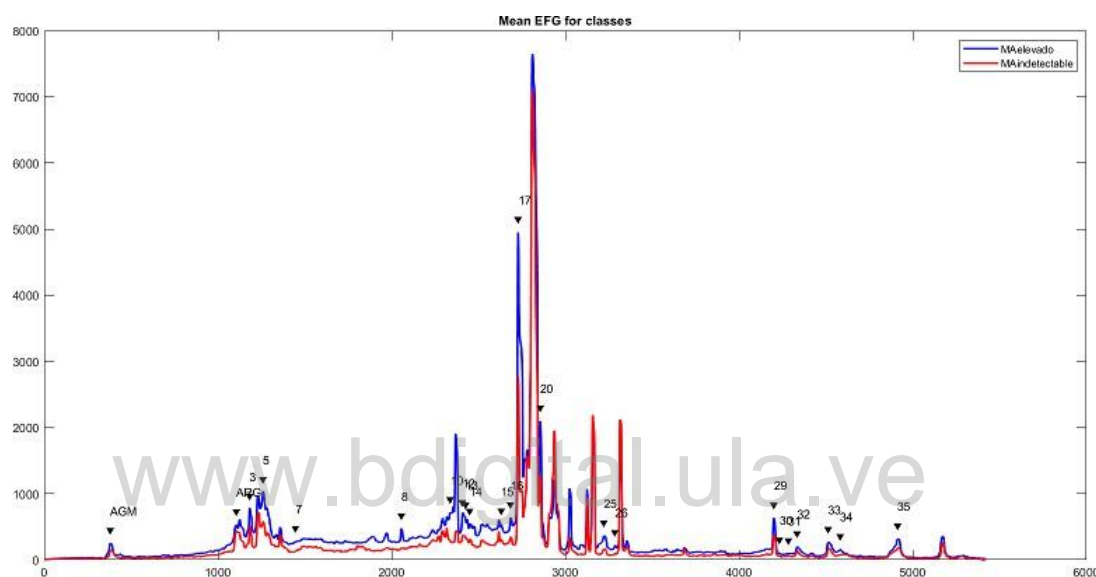


Figura 1. Alineación de los picos de electroferogramas promedio mediante un software para comparaciones de los picos medibles.

La secuencia obtenida al correr las muestras de orina marcadas con fluorescamina nos permitió identificar y determinar los niveles de aminas primarias.

Los aminoácidos identificados al comparar las muestras con aminoácidos purificados en el grupo de pacientes fueron: Valina, Serina, Arginina, Agmatina, Citrulina, Glutamato y Ornitina. (Gráfico 1).

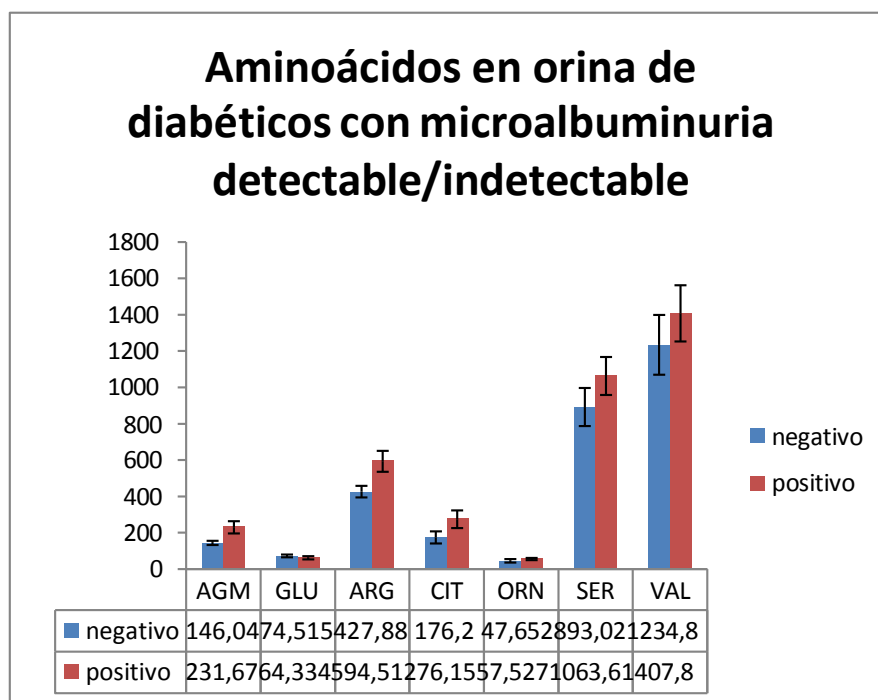


Gráfico 1. Alturas de picos en unidades arbitrarias correspondientes a los niveles relativos de los aminoácidos identificados en las muestras de orina de los pacientes. AGM: agmatina; GLU: glutamato; ARG: arginina; CIT: citrulina; ORN: ornitina; SER: serina; VAL: valina.

Se encontró que en los pacientes con albuminuria $\geq 20\text{mg/l}$ y en aquellos con albuminuria indetectable las alturas de picos correspondientes a los niveles de agmatina y arginina presentan diferencias significativas (Tabla 4)

TABLA 4. Niveles de agmatina y arginina en pacientes con albuminuria normal y albuminuria elevada.

Metabolito	MICROALBUMINURIA ELEVADA (>0.1mg/l)	MICROALBUMINURIA INDETECTABLE (<0.1mg/l)	VALOR DE P
ARG (altura pico) [μM]	(726.3) 16.22	(434.7) 10.04	P<0.041318
AGM (altura pico) [μM]	(246.17) 30.91	(131.64) 13.93	P <0.018302

La electroforesis capilar con detección de fluorescencia inducida por láser mostró que a mayores niveles de albuminuria las alteraciones del electroferograma de AGM y ARG tenían los picos más altos. El

electroferograma mostró que existían diferencias entre AGM y ARG con respecto a toda la muestra. En los pacientes diabéticos con albuminuria $\geq 20\text{mg/l}$ y en los pacientes con albuminuria no detectable se encontraron los picos más elevados de AGM y ARG y esta diferencia fue significativa ($P < 0,018302$), ($P < 0,0041358$). (Gráfico 2)

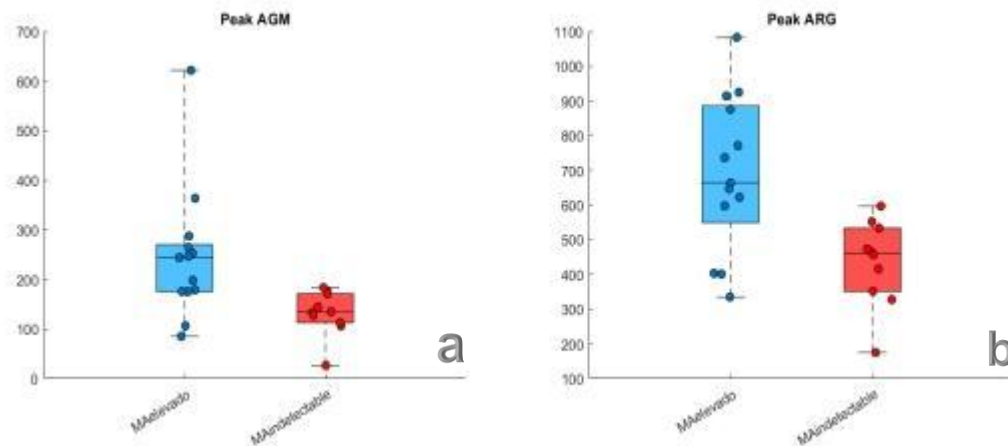


Gráfico 2. Diferencias entre los picos de agmatina (a) y arginina (b) tanto en pacientes con microalbuminuria elevada ($>0.1\text{mg/l}$) como indetectable ($<0.1\text{mg/l}$). ($p < 0.05$)

Análisis de electroferogramas en pacientes con albuminuria detectable y albuminuria no detectable

Los picos que fueron identificados (AGM y ARG), están etiquetados en la Figura 2. En particular, estos picos corresponden a analitos putativos que pueden usarse potencialmente como biomarcadores para el diagnóstico de daño renal en pacientes diabéticos.

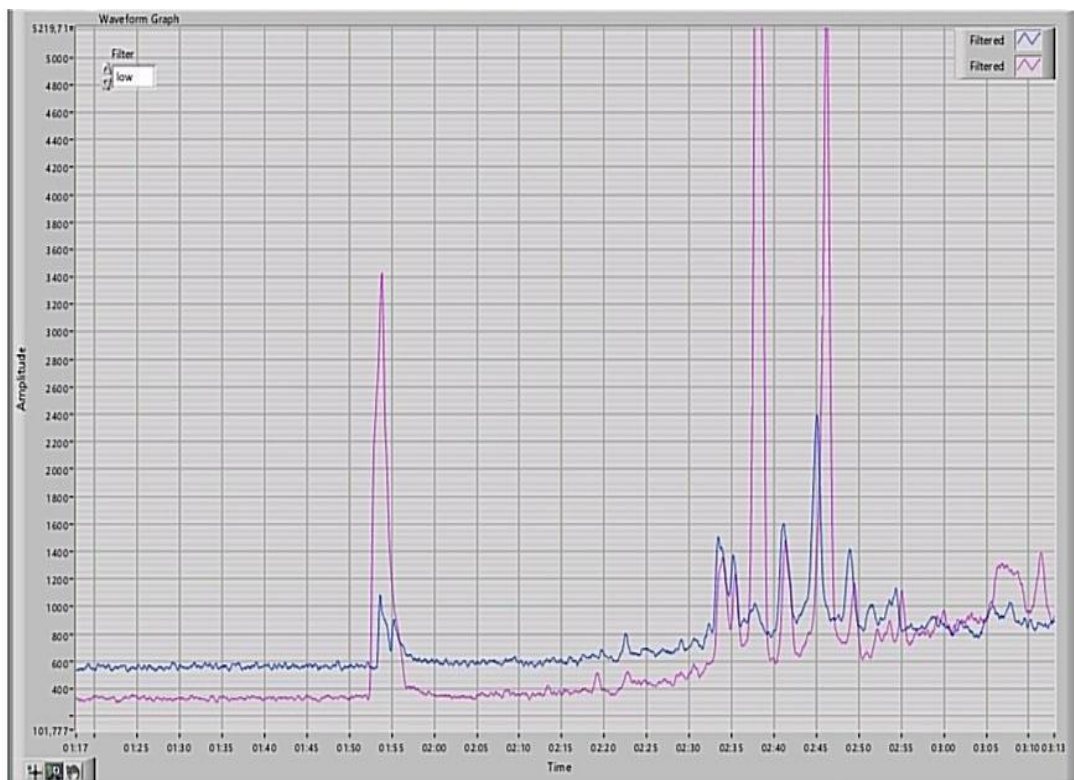


Figura 2. Spiking de agmatina y arginina en muestras de orina.

Con las condiciones de trabajo establecidas, se realizaron las curvas de calibración para AGM Y ARG, aplicando diferentes volúmenes de solución estándar, donde dichas graficas de calibración mostraron ser lineales con un coeficiente de determinación ($R^2 > 0,99$). (Gráfico 3 y 4)

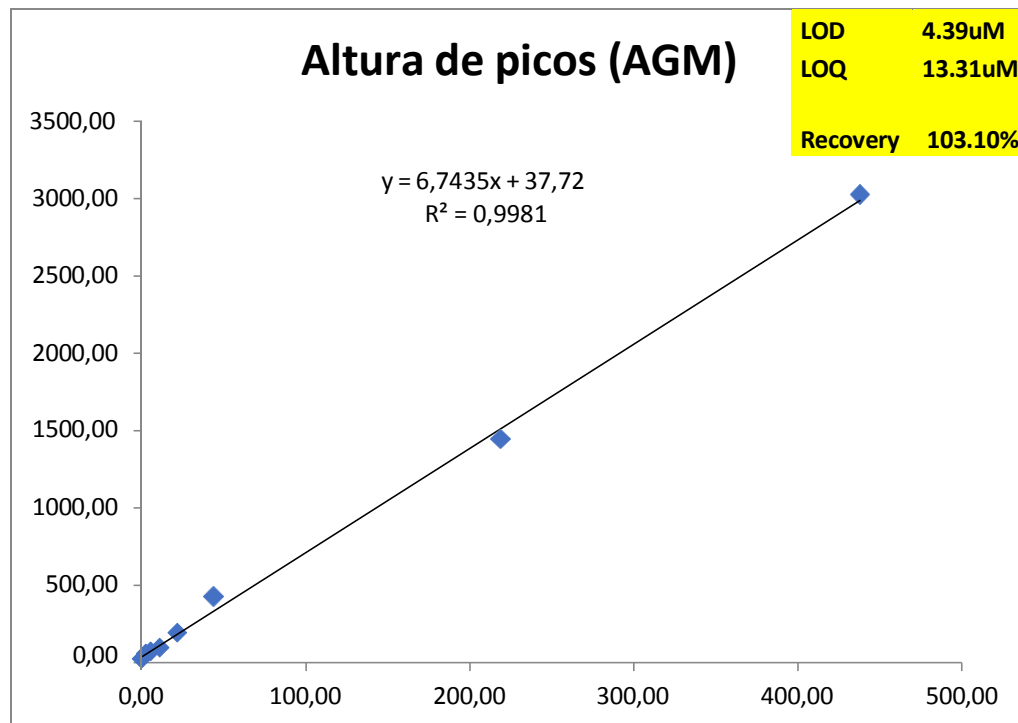


Gráfico 3. Altura de picos de agmatina de muestras de orina de pacientes diabéticos.

Altura de picos	Concentración (μM)
3026,00	443,13487
1431,27	206,65085
411,54	55,43368
191,07	22,74086
95,54	8,57368
70,17	4,81215
55,95	2,70352
24,00	-2,03455

Tabla 5. Datos de medición de estándares de agmatina.

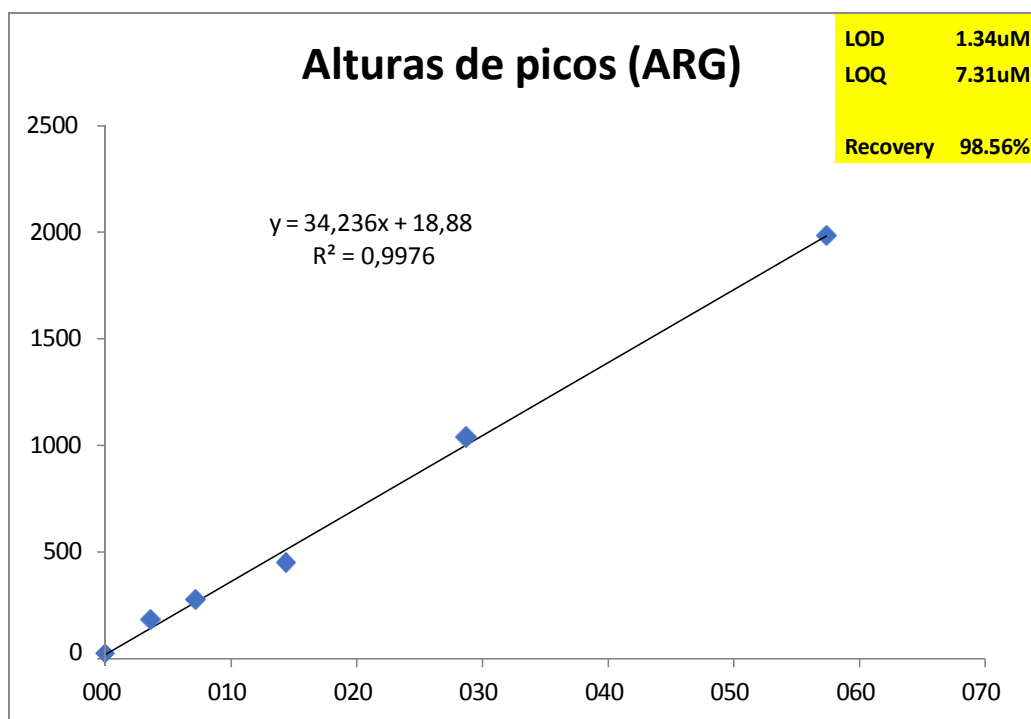


Gráfico 4. Altura de picos de arginina de muestras de orina de pacientes diabéticos

Altura de picos	Concentración (μM)
1984,8	57,42260
1029,73	29,52594
442,22	12,36535
267,268	7,25517
174,073	4,53304
24 0	0,14955

Tabla 6. Datos de medición de estándares de arginina.

En el proceso de validación se estimaron los valores para los parámetros que determinan el rendimiento del método, como son: el límite de detección (LOD) para todos los aminoácidos, específicamente arginina 1,34 μM y agmatina 4,39 μM y el límite de cuantificación (LOQ) fue de aproximadamente 7-13 μM respectivamente. Los cuales sirvieron como criterios de confianza del

método a utilizar para la detección de estos aminoácidos en la orina de pacientes diabéticos.

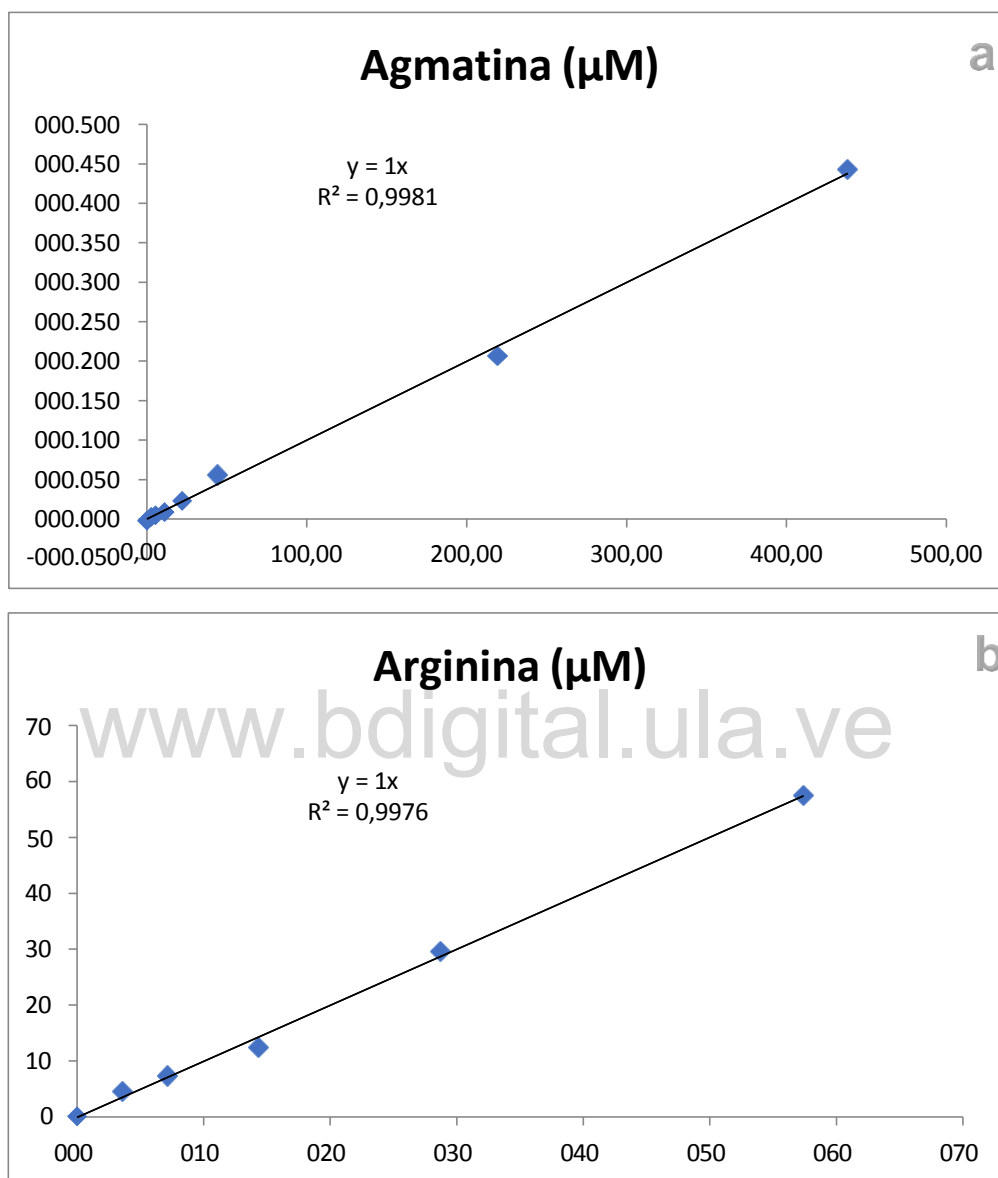


Gráfico 5. Concentración calculada a partir de alturas de picos de agmatina (a) y arginina (b) (Gráfico 3 y 4).

La orina de los pacientes diabéticos con albuminuria en un rango $>0,1\text{mg/L}$ tuvieron un patrón metabólico diferente a aquellos pacientes con albuminuria no detectable. (Gráfico 6).

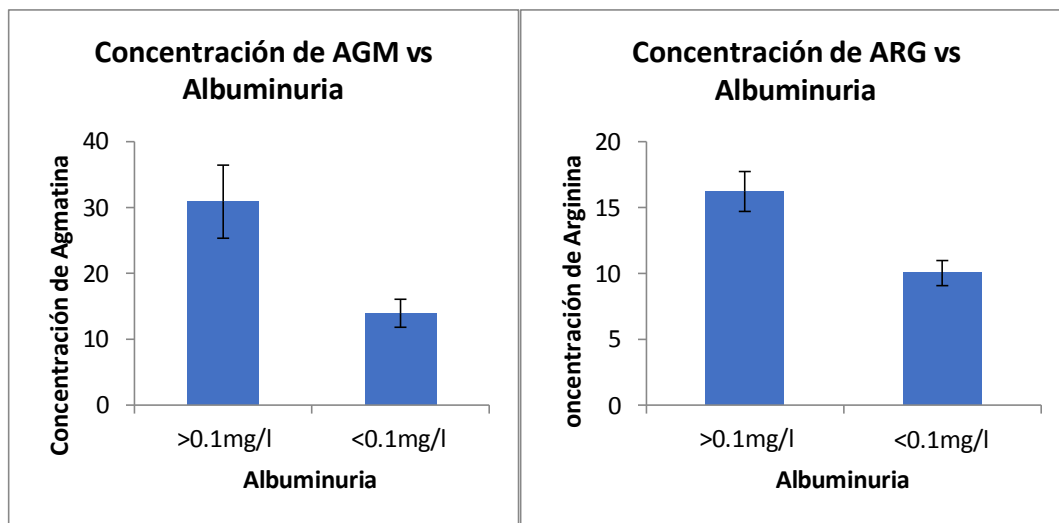


Gráfico 6. Concentración de agmatina y arginina en orina de pacientes diabéticos con albuminuria detectable y no detectable.

Discusión

La presencia de aminoácidos en la orina de pacientes diabéticos puede deberse a varias causas, como una alteración en el transporte o reabsorción de aminoácidos por los túbulos renales, una disminución en la síntesis o catabolismo de las proteínas por el hígado o los músculos, o una mayor demanda de aminoácidos por el organismo debido al estrés oxidativo o a la hiperglucemia. Estas alteraciones pueden tener consecuencias negativas para la salud, como deterioro de la función renal (García N, 2019).

Estudios previos postulan que la degradación de arginina se produce a través de múltiples vías que producen entre otras sustancias óxido nítrico, poliaminas, glutamato, agmatina, entre otros y que cada una de ellas presenta un rol biológico preponderante. Cabe destacar, que la arginina es la fuente principal para la generación del óxido nítrico por la vía óxido nítrico sintasa (NOS). Por otra parte, otras investigaciones plantean que la agmatina ejerce efectos sobre la ultrafiltración glomerular a través de un mecanismo constitutivo dependiente de NOS, y esto no requiere la participación de adrenorreceptores alfa 2 (Schwartz D, y cols 1997).

Es por ello, que el análisis de patrones metabolómicos por medio de electroforesis en fluidos corporales como la orina busca ser una herramienta que permita determinar si existe una correlación entre los patrones electroforéticos encontrados y la albuminuria de los pacientes diabéticos.

En el presente estudio se reportaron incrementos en los niveles de arginina y agmatina en el grupo de diabéticos con albuminuria. Estos valores podrían estar alterados como parte de un mecanismo de defensa incipiente ante la lesión renal en el paciente diabético, ya que como se expone anteriormente, la arginina se utiliza como sustrato para la síntesis de óxido nítrico, entre otras sustancias y esto determina un incremento de la disponibilidad del mismo para evitar que la lesión se perpetúe. Sin embargo, el óxido nítrico con el paso del tiempo se agotaría e inevitablemente se instauraría la lesión renal como tal. La otra explicación planteada indica que la elevación de estos metabolitos puede asociarse a una respuesta secundaria a las alteraciones metabólicas producto de la hiperglicemia en estos pacientes; la exposición de las células a niveles altos de glucosa estimula la cadena de respiración mitocondrial y favorece la formación de radicales libres de oxígeno, aumentando así el estrés oxidativo y lesionando la barrera de filtración glomerular que conduce a la enfermedad renal diabética (Bila I, y cols 2019).

Finalmente, mediante el software basado en LabVIEW para el reconocimiento de patrones en electroferogramas (EPG) generados por CZE-LIFD, se pudo determinar si un paciente diabético con o sin albuminuria presentaba cambios significativos en los niveles de L-arginina o agmatina basándose solo en las alturas de los picos en los EFG completos alineados, obtenidos de muestras de orina de un total de 30 pacientes. Esto resulto con diferencias significativas entre los picos de arginina ($P < 0,041318$) y agmatina ($P < 0,01832$), lo que puede sugerir que estos patrones podrían predecir la instalación de cambios en el riñón como consecuencia de las alteraciones antes descritas.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

Después de analizar los resultados obtenidos se llegó a las siguientes conclusiones:

- La metabolómica puede ser utilizada como herramienta que ayude a identificar nuevos biomarcadores para la detección temprana de la enfermedad renal diabética, incluso antes de que se presente la albuminuria.
- Se encontraron niveles significativamente elevados de metabolitos tipo arginina-agmatina en pacientes con albuminuria detectable y sin ella.
- Los niveles de agmatina y arginina en el metaboloma de pacientes diabéticos sin albuminuria podrían explicar el fenotipo no proteinurico que se presenta en casi la tercera parte de los pacientes con enfermedad renal diabética.
- La técnica CZE-LIFD es un método altamente sensible para la detección de aminas urinarias. Requiere una pequeña cantidad de muestra y de reactivo, lo que reduce el costo y el impacto ambiental del análisis.

Recomendaciones

Partiendo de los resultados de la investigación los autores recomiendan:

- El uso de la electroforesis capilar como método de análisis de fluidos corporales constituye una técnica que puede proporcionar grandes avances en la investigación de los procesos patológicos, no solo en la

diabetes mellitus y la enfermedad renal crónica, sino en todos los procesos que involucren metabolitos para su génesis.

- Se recomienda realizar estudios con una mayor muestra de pacientes.
- Para posteriores estudios se recomienda, recolectar muestras de una población más homogénea (tomar en cuenta características demográficas de los pacientes como sexo y edad de la población).
- Es conveniente procesar las muestras de forma inmediata al ser obtenidas, para evitar alteraciones en los metabolitos, que puedan interferir con el análisis de los resultados.
- Ante la escasez de trabajos previos relacionados con la detección de aminoácidos en orina de pacientes diabéticos, es importante la publicación de esta investigación en revistas de divulgación primaria con la modalidad de acceso libre, para que esté disponible para otros investigadores.

www.bdigital.ula.ve

BIBLIOHEMEROGRAFÍA

- Abdelsattar, S., y cols. (2021). La metabolómica dirigida como herramienta para el diagnóstico de la enfermedad renal en la diabetes mellitus tipo 2. **Br J Biomed Sci**, 78, 184-19. Doi: 10.108/09674845.2021.1894705.
- Ardiles, L., y Mezzano, S. (2010). Enfermedad renal en la diabetes: a propósito del día mundial del riñón. **Rev Med**. 138, 397-400. Doi: <http://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872010000400001>
- Barradas, O., López, R., y Muñoz, O. (2008). Los aminoácidos, eslabones de vida. *Revista de divulgación científica y tecnológica*, 23(3). Recuperado de <https://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol23num3/articulos/aminocidos/index.html>
- Benozzi, F., y Pennacchiotti, G. (julio, 2017). Albuminuria: consideraciones preanalíticas y analíticas. **Acta bioquímica clínica latinoamericana**, 51 (1). Recuperado de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572017000100008&lng=es&tlng=es.
- Benzadón, M., Forti, L., y Sinay, I. (2014). Actualización en el diagnóstico de la diabetes. **Rev Med**, 74 (1). Recuperado de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0025-76802014000100016
- Betancourt, L. (2021). *Protocolo para la ejecución de un estudio de metabolómica en orina y suero de pacientes de la Servicio de Nefrología y la Unidad de Diálisis del Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes (IAHULA)* (Trabajo de Investigación). Universidad de los Andes, Mérida.
- Betancourt, L., Rada, P., Paredes, D., y Hernandez, L. (2012). In vivo monitoring of cerebral agmatine by microdialysis and capillary

- electrophoresis. **Journal of Chromatography B**, 880, 58- 65. Doi: 10.1016/j.jchromb.2011.11.016.
- Betancourt, L., Rada, P y cols (2018). Cromatografía electrocinética micelar con fluorescencia inducida por láser en la detección de putrescina en muestra de eritrocitos en pacientes con enfermedad de parkinson. **Journal of Chromatography B**, 1081-1082. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.02.015>.
- Bila, I., Dzydzan, O y cols (2019). La agmatina previene el estrés oxidativo-nitrativo en los leucocitos sanguíneos bajo diabetes mellitus inducida por estreptozotocina. **Open Life Sciences**, 14 (1). 299-310. <https://doi.org/10.1515/biol-2019-0033>
- Carracedo, J.,y Ramírez, R. (2020). *Fisiología renal* (Trabajo de investigación). Universidad Complutense, Madrid.
- Castagnino, J. (julio, 2000). Electroforesis capilar. **Bioquímica**, 25 (1). <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57611797003>
- Castillon, E. (2011). *Metabolismo general de aminoácidos* (Trabajo de Investigación). Universidad de Alcala de Henares, Madrid.
- Ceballos, G., Hernández, L y cols (2020). Un enfoque de aprendizaje automático para predecir el rechazo frente a la tolerancia de los injertos de islotes pancreáticos. **PLOS One**. Doi: 10.1371/journal.pone.0241925.
- Chiquete, E., Nuño, P., y Panduro, A (2001). Perspectiva histórica de la diabetes mellitus. Comprendiendo la enfermedad. *Investigación en salud*, 3 (99). Recuperado de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=14239902>
- Cordero, P., Sánchez, C y cols (2020). Metabolómica de la nefropatía diabética: detrás de la huella digital de los indicadores de desarrollo y progresión. **PLOS One**. Doi: 10.1016/j.nefro.2020.07.002.

- Dubin, R., y Rhee, E. (2020) Proteómica y metabolómica en la enfermedad renal, incluidos conocimientos sobre etiología, tratamiento y prevención. ***Clin J Am Soc Nephrol***. Doi: 10.2215/CJN.07420619.
- Galindo, L., y Pérez, J. (2019). *Rendimiento del uroanálisis en pacientes con sospecha diagnóstica de cólico renoureteral en el servicio de emergencias* (Trabajo de investigación). Universidad del Rosario, Bogotá.
- García, N. (2019). *Efecto de aminoácidos dietéticos (Glutamina) en la capacidad secretora de insulina de las células beta del páncreas. Implicaciones en la fisiopatología de la diabetes* (Trabajo de Investigación). Universidad Jaume I, España.
- Gómez, C., Ros, G y cols (2008). Papel de las poliaminas en la alimentación: Importancia de las poliaminas en la alimentación infantil. ***Archivos Latinoamericanos de Nutrición***, 58(2), 117-125. Recuperado de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222008000200001&lng=es&tlng=es.
- Guasco, C., Chávez, S y cols (2014). Poliaminas: pequeños gigantes de la regulación metabólica. ***REB. Revista de educación bioquímica***, 33(2), 51-57. Recuperado de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-19952014000200004&lng=es&tlng=es.
- Hurtado, J. (2010). ***El proyecto de investigación, comprensión holística de la metodología y la Investigación***. Bogotá-caracas: Ediciones Quirón.
- Icart, P., Monserrat, M., y Hernández, A. (2020). *Uso y adaptación de herramientas bioinformáticas para el análisis metabólico de orina basado en 1H-RMN* (Trabajo de Investigación). Universidad Rovira i Virgili, Tarragona- España.
- Kaddurah-Daouk, R., Kristal, B., y Weinshilboum R. (2008). Metabolómica: un enfoque bioquímico global para la respuesta a los medicamentos y las enfermedades. ***Revisión anual de farmacología y toxicología***, 48

- (1), 653-683. Recuperado de <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.48.113006.094715>.
- Lehman, R. (diciembre, 2013). Sub- fenotipos de diabetes y metabólica: ¿la clave para descubrir marcadores de laboratorio para una medicina personalizada? **Acta Bioquim. Clin**, 47 (4).
Recuperado de https://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S032-29572013000400011
- Leiba, A., y cols. (2018). Factores asociados al desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 en Chile. **Nutrición hospitalaria**, 35, 400-407. Doi: <https://dx.doi.org/10.20960/nh.1434>
- Lowenstein, C., Dinerman, J., y Snyder, S. (1994). Óxido nítrico: mensajero fisiológico. **Ann Intern Med**, 120:227-37.
- Magaña, J., Arenas, M., y Gomes, R. (2009). Electroforesis capilar como una nueva estrategia en la medicina y el diagnóstico clínico. **Rev Med Chile**, 7(137), 946-956. Doi: <http://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872009000700014>.
- Morze, J., Wittenbecher, C y cols (2022). Metabólica y riesgo de diabetes tipo 2: una revisión sistemática actualizada y un metanálisis de estudios cohortes prospectivos. **PLOS One**. Doi: 10.2337/dc21-1705.
- Palella, S., y Martins, F. (2006). **Metodología de la investigación cuantitativa**. Caracas: FEDUPEL.
- Raimondi, R., Quattrocchi, G., y Joacquir, G. (2021). Recomendaciones para el uso de biomarcadores en el paciente con Covid 19. Primera parte. **Revista bioquímica y Patología clínica**, 85 (3). Recuperado de <http://revista.aba-online.org.ar/index.php/bypc/article/view/189>
- Rejas, L. (2017). *Evaluación de la concentración de microalbumina en orina como marcador de daño renal en pacientes hiperglicémicos atendidos en el laboratorio TECNOLAB* (Trabajo de investigación). Universidad Alas Peruanas, Ica.

- Reyes, F y cols (marzo, 2016). Tratamiento actual de la diabetes mellitus tipo 2. *Correo científico médico*, 20 (1). Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1560-43812016000100009&lng=es&tlng=es.
- Rojas, E., Molina, R., y Rodríguez, C. (2012). Definición, clasificación y diagnóstico de la diabetes mellitus. *Rev Venez Endocrinol*, 10 (1). Recuperado de http://v.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1690-31102012000400003
- Sevilla, M., Díaz, J., y Frutos, M. (2014). *Electroforesis capilar, purificación y derivatización fluorescente para el análisis de isoformas del antígeno específico de próstata* (Trabajo de Investigación). Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.
- Vargas, L. (2005). *Medición de Agmatina por Electroforesis Capilar en zonas y Detección de Fluorescencia inducida por láser* (trabajo de investigación). Universidad de los Andes, Mérida.
- Vázquez, I., Luna, O., y Sosa, A. (2015). Prevalencia de enfermedad renal crónica no diagnosticada en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 en atención primaria a la salud. *Med Int Méx*, 31 (1). Recuperado de <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=56631>
- Zea, G., Zea, W., Vaccaro, V., y Avalos, E. (2017). Los aminoácidos en el cuerpo humano, *Revista científica Mundo de la Investigación y el Conocimiento*, 1, 379-391. Doi: 10.26820/recimundo/1.5.2017.379-391

ANEXOS

Anexo N° 1

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Pacientes Adultos

En el Instituto Autónomo Hospital Universitario de los Andes se está realizando un proyecto de investigación titulado “ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE LA ALBUMINURIA Y LA METABOLOMICA POR INMUNOFLUORESCENCIA EN LA ORINA DE PACIENTES DIABETICOS” con el objeto de determinar si los patrones metabólicos son predictores de lesión renal en pacientes diabéticos con microalbuminuria en los pacientes que acuden a la Consulta Externa del Servicio de Endocrinología del Instituto Autónomo Hospital Universitario de los Andes en el Estado Mérida-Venezuela.

Yo, _____, C.I. _____

Nacionalidad _____ Estado civil _____

Siendo mayor de edad, en uso pleno de mis facultades mentales y sin que medie coacción ni violencia alguna, en completo conocimiento de la naturaleza, forma, duración, propósito, inconvenientes y riesgos relacionados con el estudio que más abajo indico, declaro mediante la presente:

1. Haber sido informado de manera objetiva, clara y sencilla, de todos los aspectos relacionados con este trabajo de investigación y tener conocimiento claro de los objetivos del mismo.
2. Conocer bien el protocolo expuesto por el investigador, en el cual se establece que mi participación consiste en: Interrogatorio, examen físico y realización de pruebas diagnósticas.
3. Que los datos obtenidos durante el estudio guardarán carácter confidencial.
4. Que la información obtenida de la investigación, sobre mi participación, me será notificada por el equipo investigador responsable.
5. Que cualquier pregunta que tenga en relación con éste estudio, me será respondida oportunamente por parte de la responsable de la investigación: Dr. Jorge Villarreal Q

Teléfono 04247479861. Residente del postgrado de Nefrología del IAHULA, quien usará la información obtenida para cumplir con su Trabajo Especial de Grado.

DECLARACIÓN DEL VOLUNTARIO.

Luego de haber leído, comprendido y recibido las respuestas a mis preguntas con respecto a éste formato de consentimiento:

1. Acepto las condiciones estipuladas en el mismo y a la vez doy mi consentimiento al equipo de investigadores a realizar las evaluaciones ya descritas.
2. Me comprometo a colaborar con el cumplimiento de las indicaciones.
3. Me reservo el derecho de revocar este consentimiento y donación en cualquier momento sin que conlleve algún tipo de consecuencia negativa para mí.

Nombre: _____ C.I. No _____

En _____ a los _____ días del mes de _____ de 20 _____

Firma: _____

www.bdigital.ula.ve

DECLARACIÓN DEL INVESTIGADOR.

Luego de haber explicado detalladamente al Sr (a) _____

La naturaleza del proyecto mencionado, certifico mediante la presente que, a mi leal saber, el sujeto que firma este formulario de consentimiento comprende la naturaleza, requerimientos, riesgos y beneficios de la participación en éste estudio.

Por el equipo de Investigación:

Responsable: Dr. Jorge Villarreal Quintero PASAPORTE:

AS516800 Firma: _____

Tutor: Dr. Luis Betancourt Hitcher C.I. _____ Firma: _____

En _____, a los _____ días del mes de _____ de 20 _____