



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS
“DR. IGNACIO CHÁVEZ”



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
DELEGACIÓN REGIONAL EN MICHOACÁN
UNIDAD DE MEDICINA FAMILIAR N° 80
TESIS QUE PRESENTA

MANJARREZ LUCIANO BRISA YADIRA
MÉDICO CIRUJANO Y PARTERO

PARA OBTENER EL GRADO DE
ESPECIALISTA EN MEDICINA FAMILIAR

TÍTULO:

“CARACTERIZACIÓN DE LOS MARCADORES BIOQUÍMICOS DE ESTRÉS OXIDATIVO
EN UNA POBLACIÓN MEXICANA APARENTEMENTE SANA”

ASESOR:

DR. JUAN MANUEL GALLARDO MONTOYA

Investigador Asociado “B” Unidad de Investigación Médica en Enfermedades
Nefrológicas, Hospital de Especialidades CMN Siglo XXI.

CO-ASESOR:

DR. CLETO ÁLVAREZ AGUILAR

Médico Familiar, Hospital General Regional No. 1, IMSS, Morelia, Michoacán.
Maestría en Ciencias Médicas

MORELIA MICHOACÁN, SEPTIEMBRE DEL 2013



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD DE MEDICINA FAMILIAR No. 80
MORELIA MICHOACÁN

DR. BENIGNO FIGUEROA NÚÑEZ
Coordinación de Planificación y Enlace Institucional

DR. LUIS ESTRADA SALAZAR
Coordinación Auxiliar de Educación

DR. JUAN GABRIEL PAREDES SARALEGUI
Coordinador Auxiliar de Investigación

DR. RUBÉN RICARDO GARCÍA JIMÉNEZ
Director de la U.M.F. 80

DRA. OLIVA MEJÍA RODRÍGUEZ
Coordinadora Clínica de Educación e Investigación de Medicina Familiar

DR. JOSÉ RAMÓN SARABIA RAMÍREZ
Profesor Titular De La Residencia De Medicina Familiar



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

DR. VÍCTOR MANUEL FARÍAS RODRÍGUEZ

Jefe de La División de Estudios de Posgrado de La Facultad de Ciencias Médicas Y
Biológicas
"Dr. Ignacio Chávez"

DR. RAFAEL VILLA BARAJAS

Coordinador de la Especialidad de Medicina Familiar
Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez"

Para la realización de este trabajo se obtuvo financiamiento de la coordinación nacional de investigación científica de IMSS a través del fondo de financiamiento en salud (FOFIS)

Este trabajo se realizó en la Unidad de Medicina Familiar No. 80 del Instituto Mexicano del Seguro Social en la ciudad de Morelia, Michoacán, México.

Asesor

Dr. Juan Manuel Gallardo Montoya

Investigador Asociado "B" Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Nefrológicas,
Hospital de Especialidades CMN Siglo XXI

Co- asesor

Dr. Cleto Álvarez Aguilar

Médico Especialista en Medicina Familiar

M. En Ciencias Médicas

Colaboradores:

Dra. Oliva Mejía Rodríguez

Médico Especialista en Medicina Familiar

M.C. en Farmacología Clínica

Coordinadora clínica de educación e investigación en salud UMF 80

Profesora de Asignatura "A"

División de Estudios de Postgrado

Universidad Nacional Autónoma de México

Dr. Rafael Villa Barajas

Médico especialista en Medicina Familiar

M. E. Médica

Coordinador de la Especialidad en Medicina Familiar

División de estudios de postgrado

Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez"

Matemático Carlos Gómez Alonso

Analista Matemático "A"

CIBIMI IMSS



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

DIRECCIÓN DE PRESTACIONES MÉDICAS
Unidad de Educación, Investigación y Fomento de Salud
Coordinación de Investigación en Salud

Dictamen de Autorizado

COMITÉ LOCAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD NÚM.
1602 REGIONAL NÚM. 1, PROYECTO

FECHA 30/08/2011

DR. CLETO ALVAREZ AGUILAR

P R E S E N T E

Tengo el agrado de notificarle, que el protocolo de investigación con título:

CARACTERIZACIÓN DE LOS MARCADORES BIOQUÍMICOS DE ESTRÉS OXIDATIVO EN UNA POBLACIÓN MEXICANA APARENTEMENTE SANA

que usted sometió a consideración de este Comité Local de Investigación en Salud, de acuerdo con las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores, cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de ética y de investigación, por lo que el dictamen es **A U T O R I Z A D O** con el número de registro institucional:

Núm. de Registro
R-2011-1602-4

SENTAMENTE:

DR.(A). MARIO ALBERTO MARTÍNEZ LEMUS
Presidente del Comité Local de Investigación en Salud núm 1602

IMSS

Este trabajo se presentó en Foros especializados:

XIII JORNADAS DE MEDICINA FAMILIAR Y QUÍMICOS del 14 al 16 de noviembre del 2012 Morelia Michoacán.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por permitirme la vida y darme la fuerza y el coraje para que este sueño se cumpliera, por ayudarme a levantarme de los fracasos y por enseñarme que cada momento transcurrido tanto bueno como malo es una experiencia nueva que debe convertirnos en mejores personas.

A mi asesor el Dr. Juan Manuel Gallardo Mendoza porque gracias a su respaldo y compromiso fue posible que concluyera esta investigación.

A mi co-asesor el Dr. Cleto Álvarez Aguilar por su paciencia, enseñanza y disponibilidad ya que sin su ayuda no hubiera sido posible la culminación del estudio.

A la Dra. Anel Gómez García por su colaboración en el procesamiento bioquímico de las muestras.

A todo el personal de banco de sangre, por su profesionalismo, tiempo y sobre todo por su apoyo incondicional que fue crucial para que esta investigación se realizara, mil gracias.

DEDICATORIA

A mis padres Rocío y Javier por darme la vida pero sobre todo por su amor, por su confianza, por compartir mis horas grises, mis momentos felices, ambiciones, y sueños. Gracias por ayudarme a salir adelante en la adversidad, por hacer de mí lo que hoy soy, quiero que sientan que el objetivo alcanzado también es de ustedes y que la fuerza que me ayudó a conseguirlos fue su gran apoyo. Los amo.

A mi Hermano Edson, por tu cariño incondicional y por preocuparte por mí cuando las cosas me salían mal, eres el mejor gran hermano que una gran hermana puede tener. Gracias.

A toda mi familia, en especial a mi Tía Vero, Tío Alberto y Tío Rogelio que fueron pieza clave durante mi infancia y a quienes nunca dejare de agradecer el que me haya brindado su mano en las derrotas y logros de mi vida.

Al amor de mi vida porque con su compañía, apoyo, y comprensión hace de cada día un regalo maravilloso.

Y finalmente a mis amigos y compañeros, gracias por los momentos compartidos, y por hacer que los tragos amargos se olviden rápidamente.

Los quiero

BRISA

ÍNDICE

DESCRIPCIÓN

Resumen	2
Abstract	3
Abreviaturas	4
Glosario	5
Relación de Tablas y Figuras	7
Introducción	8
Antecedentes	9
Planteamiento del problema	16
Justificación	17
Objetivo	
Objetivo General	18
Objetivos específicos	18
Material y métodos	
Diseño	19
Población de estudio	19
Criterios de inclusión	19
Criterios de Exclusión	19
Tamaño de Muestra	19
Descripción operativa de variables	20
Metodología	23
Análisis estadístico	27
Consideraciones Éticas	28
Recursos, Financiamiento y Factibilidad	30
Resultados	32
Discusión	42
Conclusiones	45
Recomendaciones	46
Bibliografía	47
Anexos	
Anexo I. Cronograma de actividades	52
Anexo II. Hoja de consentimiento informado	53

RESUMEN

Antecedentes. El estudio de los marcadores de estrés oxidativo es importante ya que se ha definido que sean causa u efecto de enfermedades crónicas. Se han establecido parámetros basales en otras partes del mundo sin embargo no se pueden considerar para la población mexicana ya que cada población tiene características y estilos de vida diferentes

Objetivo. Caracterizar algunos marcadores bioquímicos de estrés oxidativo en una población mexicana aparentemente sana y establecer parámetros de normalidad.

Material y métodos. En un estudio transversal, se estudiaron 80 sujetos, ambos géneros, mayores de 18 años, peso mayor de 55 kilos, que acudieron al HGR No. 1, IMSS, y cumplieron los requisitos establecidos para ser aptos como donadores. A todos se les midió peso, talla, índice de masa corporal (IMC) presión arterial sistólica y diastólica, hemoglobina, glucosa, creatinina, ácido úrico y albúmina en suero; marcadores pro-oxidantes malondialdehído, (MDA) y productos avanzados de la oxidación de proteínas (AOPP) y antioxidantes Glutación y Óxido Nítrico (NOx) en plasma. El análisis estadístico se realizó con medidas de tendencia central, dispersión, ANOVA y Correlación de Pearson.

Resultados. De la población estudiada 51 fueron hombres y 29 mujeres con edad promedio de 30 ± 1 y 30 ± 2 años respectivamente. Los valores de referencia de los marcadores pro y antioxidante por género en hombres y mujeres fueron MDA (19.18 ± 11.71 y $17.28 \pm 4.56\mu\text{M/L}$), AOPP (42.33 ± 19.29 y $43.60 \pm 23.95\mu\text{M/L}$), glutación (0.64 ± 0.21 y $0.54 \pm 0.23\text{mM/L}$) y NOx (26.36 ± 16.06 y $24.26 \pm 24.16, \mu\text{M}$) respectivamente. Se observó una tendencia hacia un aumento en las concentraciones plasmáticas de estos marcadores por edad y por IMC aunque la diferencia no alcanzó a ser significativa. Existe una correlación directa entre los marcadores antioxidantes y los niveles séricos de albúmina.

Conclusiones: Se obtuvieron marcadores de referencia pro y antioxidantes (MDA, AOPP, Glutación y NOx respectivamente) en una población mexicana aparentemente sana.

Palabras clave: Estrés oxidativo, malondialdehído, productos avanzados de la oxidación de proteínas, glutación, oxido nítrico.

ABSTRACT

Background. The study of markers of oxidative stress is important as it is defined that cause or effect of chronic diseases. Baseline parameters were established in other parts of the world but can not be considered for the Mexican population as each population has characteristics and life styles.

Objective. Characterize some biochemical markers of oxidative stress in a healthy Mexican population to establish parameters to normality.

Material and methods. In a transverse study, we studied 80 subjects, both genders, aged 18 years, weighing over 55 kilos, who attended the HGR No. 1 IMSS, and met the requirements to be eligible as donors. All were measured weight, height, body mass index (BMI), systolic and diastolic blood pressure, hemoglobin, glucose, creatinine, uric acid and albumin in serum; pro-oxidant markers malondialdehyde (MDA) and advanced oxidation products of protein (AOPP) and antioxidants glutathione (GSH) and nitric oxide (NOx) in plasma. Statistical analysis was performed using measures of central tendency, dispersion, ANOVA and Pearson correlation.

Results. Of the study population 51 were men and 29 women, mean age 30 ± 1 and 30 ± 2 years, respectively. The reference values of pro-and antioxidant markers by gender in men and women were MDA (19.18 ± 11.71 and 17.28 ± 4.56 mM / L), AOPP (42.33 ± 19.29 and 43.60 ± 23.95 mM / L), GSH (0.64 ± 0.21 and 0.54 ± 0.23 mM / L) and NOx (26.36 ± 16.06 and 24.26 ± 24.16 , M) respectively. There was a trend toward increased plasma concentrations of these markers by age and BMI, although the difference failed to be significant. There is a direct correlation between antioxidant markers and serum albumin.

Conclusions: We obtained reference pro-and antioxidant markers (MDA, AOPP, GSH, and NOx, respectively) in a Mexican population apparently healthy.

Keywords: Oxidative stress, malondialdehyde, advanced oxidation products of protein, glutathione, nitric oxide.

ABREVIATURAS

AOPP	Productos avanzados de la oxidación de proteínas
EOx	Estrés oxidativo
EROS	Especies Reactivas De Oxígeno
GSH	Glutación
HDL-c	Colesterol de alta densidad
IMC	Índice De Masa Corporal
LDL-c	Colesterol de baja densidad
MDA	Malondialdehído
NADH, NAD(H)P	Oxidasa y oxidasa reducida del fosfato dinucleótido
NOx	Oxido nítrico
O_2^-	Anión Superóxido
OH ·	Radicales Hidroxilo
TC	Colesterol Total
TG	Triglicéridos
PAS	Presión arterial sistólica
PAD	Presión Arterial Diastólica
RL	Radical libre

GLOSARIO

ESPECIE REACTIVA DE OXÍGENO. Moléculas que derivan del metabolismo del oxígeno, son producto de reacciones normales y esenciales como la generación de energía mitocondrial.

ESTRÉS OXIDATIVO. Daño celular que se produce en un organismo cuando la formación de radicales libres es superior a la capacidad del organismo para eliminarlos. Que lleva a una variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos los cuales provocan deterioro y la muerte celular.

FOSFORILACIÓN OXIDATIVA. Es un proceso bioquímico que ocurre en las células, principal vía de producción de energía en forma de ATP.

GLUTATIÓN. Es un tripéptido formado por la unión de tres aminoácidos: γ -glutamil-cisteinil-glicina, que es un potente antioxidante, evitando el daño celular.

MALONDIALDEHÍDO. Subproducto derivado del metabolismo de los lípidos (grasas) en el cuerpo.

ÓXIDO NÍTRICO. Se produce en los vasos sanguíneos y algunas células nerviosas y sirve como: vasodilatador (relaja los vasos sanguíneos para que la sangre circule sin problema por el cuerpo), regula la presión y evita la formación de la placa aterosclerótica, evita la formación de trombos, fortalece el sistema inmunológico, tiene efectos antiinflamatorios, es un efectivo neurotransmisor y antioxidante.

PEROXIDACIÓN LIPÍDICA. Es la incorporación de oxígeno en los lípidos. En este proceso los radicales libres capturan electrones de los lípidos (ácidos grasos poliinsaturados) en las membranas celulares y posterior daño celular.

PRODUCTOS AVANZADOS DE LA GLICACIÓN DE PROTEÍNAS. Productos resultantes del metabolismo en las proteínas en la mitocondria organelo de la célula encargado de la formación de energía.

RADICAL LIBRE. Son átomos o grupos de átomos que, en su composición, cuentan con un electrón que no está aparejado por lo que son altamente reactivos e inestables. Para lograr establecer el equilibrio este átomo buscará “robarle” un electrón a otro átomo. Cuando esto sucede, el átomo que pierde su electrón se convierte a su vez en un radical libre. Así se va generando una reacción en cadena que daña las células y produce el envejecimiento y muchas enfermedades.

RELACIÓN DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Variables antropométricas de los sujetos en relación al género.....	32
Tabla 2. Variables bioquímicas de los participantes por género.....	33
Figura 1. Frecuencia de la población estudiada por género.....	34
Figura 2. Concentración de MDA distribuido por género.....	35
Figura 3. Concentración de AOPP distribuido por género.....	36
Figura 4. Concentración de Glutación distribuido por género.....	37
Figura 5. Concentración de Óxido Nítrico distribuido por género.....	38
Tabla 3. Resultados de los marcadores pro y antioxidantes de la población estudiada analizada por edad.....	39
Tabla 4. Resultados de los marcadores pro y antioxidantes de la población estudiada analizada por índice de masa corporal.....	39
Tabla 5. Correlación de Pearson de las variables estudiadas.....	40
Tabla 6. Valores plasmáticos de los marcadores pro y antioxidantes de la población estudiada propuestos como valores de referencia.....	41

INTRODUCCIÓN

El incremento descontrolado de los RL genera el fenómeno conocido como estrés oxidativo (EOx), ya que ocurre una alteración entre la producción de sustancias prooxidantes con respecto a las sustancia antioxidantes.⁴ El plasma como los demás líquidos biológicos son ricos en moléculas antioxidantes, las cuales pueden ser clasificadas en dos grandes grupos: I) aquellas que previenen la activación y II) las que retrasan la progresión de las reacciones peroxidativas. Entre las primeras se incluyen a antioxidantes como la ceruloplasmina y la transferrina, que tienen la capacidad de unirse a metales; entre las segundas están las vitaminas A, E, y C, y el glutatión, las cuales actúan reduciendo la propagación y amplificación de la cadena oxidativa. El estrés oxidativo daña a varias biomoléculas de las células al alterarla ya sea funcionalmente o al modificarlas estructuralmente. Un ejemplo se presenta durante la generación de los peróxidos lipídicos y que dan como resultados los aldehídos y las cetonas, tales como el malondialdehído (MDA). Se sabe que el EOx se asocia con el envejecimiento, diabetes mellitus, síndrome metabólico, enfermedad cardiovascular; e Insuficiencia Renal Crónica, entre muchas otras patologías, sin embargo no se han establecido marcadores bioquímicos de estrés oxidativo de referencia universales debido a la diversidad de la población a nivel mundial, por lo nosotros realizamos un estudio en nuestra población aparentemente sana para establecer valores referencia de estos marcadores.

ANTECEDENTES

El oxígeno es esencial para la vida, pero posee una paradoja en los organismos que la utilizan. Este elemento desempeña una función importante como aceptor final de electrones durante la respiración celular, pero también constituye el punto de partida para un tipo de daño celular conocido como estrés oxidativo (EOx). El incremento descontrolado de los radicales libres produce este fenómeno. Estos radicales libres de oxígeno producen daño celular por oxidación de estructuras macromoleculares como son lípidos, proteínas y ADN y la modificación de sus funciones biológicas que al final causan muerte celular.^{1,2}

Los radicales libres de oxígeno son responsables de muchos efectos biológicos. Se forman durante el metabolismo normal, en la fosforilación oxidativa mitocondrial, ya que el oxígeno molecular (O_2), es el último aceptor de electrones. En este proceso el O_2 reducido parcialmente no es dañino para la célula, al encontrarse fuertemente ligado a los sitios activos de las enzimas mitocondriales, pero la formación de RL fuera de esta localización puede resultar en lesión celular.¹

Más del 95 % del oxígeno consumido por los seres humanos y la mayoría de los organismos eucarióticos es reducido completamente a H_2O durante la respiración mitocondrial, pero un reducido porcentaje (< 5%) es convertido a especies semirreducidas conocidas como especies reactivas del oxígeno (EROS). Estas representan un tipo de moléculas que derivan del metabolismo del oxígeno y existen en todos los organismos aeróbicos. La mayoría son de origen endógeno y son subproductos de reacciones normales y esenciales, como la generación de energía mitocondrial y las reacciones de detoxificación catalizadas por el sistema P450. Entre las EROS se encuentran el anión superóxido, el radical hidroxilo, los radicales peróxidos y otros derivados. Más recientemente, se han incluido dentro de este grupo al óxido nítrico (NOX) y los aldehídos, todos ellos, dañinos para la célula y derivan de las diferentes reacciones redox que tienen lugar en la misma.³

El EOx aparece en el organismo cuando existe producción excesiva de radicales libres (RL) o bien por un desbalance a corto o largo plazo del equilibrio antioxidante/pro-oxidante que provocan una disrupción de los sistemas de señalización y control a consecuencia de favorecer los procesos de pro-oxidación u obstaculizar los mecanismos antioxidantes. Un RL es una molécula o átomo que contiene electrones no apareados.⁴

Existen dos tipos de sistemas antioxidantes: el sistema antioxidante enzimático y el sistema antioxidante no enzimático y la función más importante de ambos es el mantener

constante el estado redox del medio intracelular el máximo tiempo posible. El sistema endógeno antioxidante más importante es la superóxido dismutasa, catalasa y la glutatión peroxidasa. El sistema antioxidante glutatión es formado por la reducción de la actividad de la enzima glutatión reductasa. Los antioxidantes exógenos son la vitamina A, C, E, y los metales cobre y selenio, este último es un cofactor para la enzima glutatión peroxidasa. Estos sistemas antioxidantes endógenos y exógenos limitan la actividad y la producción de EROS y mantienen el sistema en control. Por los productos del metabolismo del oxígeno, las EROS se reactivan debido a la presencia de electrones no unidos a su valencia.^{5,6}

La producción de EROS no es solo intracelular, sino también fuera de la célula. La sangre transporta el oxígeno a los tejidos, y la presión parcial de oxígeno es de unos 100 mm Hg en la circulación arterial y disminuye rápidamente a nivel tisular con valores entre 4 y 20 mm Hg. De esa manera, la sangre es al menos comparable, si no más expuesta a EROS que el interior de las células. Paradójicamente, la concentración de antioxidantes es mucho menor en el plasma que en las células.^{7,8}

El plasma como los demás líquidos biológicos son ricos en moléculas antioxidantes, las cuales pueden ser clasificadas en dos grandes grupos: I) aquellas que previenen la activación y II) las que retrasan la progresión de las reacciones peroxidativas. Entre las primeras se incluyen a antioxidantes como la ceruloplasmina y la transferrina, que tienen la capacidad de unirse a metales; entre las segundas están las vitaminas A, E, y C, y el glutatión reducido, las cuales actúan reduciendo la propagación y amplificación de la cadena oxidativa.⁹⁻¹¹

El plasma también contiene varias moléculas antioxidativas que no están bien caracterizadas y que contribuyen a neutralizar a los radicales libres. Todas estas múltiples formas de los antioxidantes primarios conforman una gran cantidad de moléculas que por su dificultad para cuantificar, obliga a los investigadores elegir solamente a algunas de ellas. Debido a que en el plasma humano el estado antioxidativo es muy dinámico, también puede ser afectado por varios factores, incluida la dieta, el ejercicio físico, las agresiones medioambientales, y las enfermedades, de tal forma que la relación entre la capacidad antioxidativa no-proteínica (CANP) del plasma y las proteínas plasmáticas oxidadas, los lípidos peroxidados y los grupos sulfidrilos totales (tioles) son las moléculas que mejor reflejan el verdadero estado oxidativo y el grado de salud orgánica. Los radicales libres de oxígeno producen daño celular por oxidación estructuras macromoleculares como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, dando como resultado una gran variedad de alteraciones

bioquímicas importantes, dañando a varias biomoléculas al alterarlas ya sea funcionalmente o al modificarlas estructuralmente y ocasionar además la muerte celular.¹²

Los peróxidos lipídicos se forman cuando los lípidos son "cortados" y aparecen los aldehídos y las cetonas, tales como el malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxinoneal que a su vez modifican a las apolipoproteínas-B en la región de las lisinas. La oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) ocurre también durante la modificación de la apolipoproteínas-B.¹³⁻¹⁶

En la participación del estrés oxidativo debe haber una relación entre los niveles superóxido dismutasa y catalasa que puede garantizar el control efectivo del estrés oxidativo. El sistema antioxidante fisiológico involucrado en la desintoxicación de órgano-peróxidos y peróxido de hidrógeno está formado básicamente por glutatión reductasa, glutatión peroxidasa catalasa. El proceso de peroxidación de lípidos puede ser iniciado por un radical hidroxilo. Especies reactivas de oxígeno son importantes para los eventos oxidativos en la pared arterial, el más abundantes es el peróxido de hidrogeno, el daño resultante oxidativo de este se cree que ocurre a través de la descomposición de metales de transición, catalizada con la consecuente formación de radicales hidroxilo, esta peroxidación lipídica en el caso de la sistema vascular puede causar oxidación de las LDL y al mismo tiempo desactivan receptores endoteliales para acetilcolina, serótina, trombina bradiquinina disminuyendo la producción de óxido nítrico y promoviendo la placa aterosclerótica. La principal fuente de radicales libres en la pared vascular inflamada son NADPH oxidasa, óxido nítrico sintasa endotelial desacoplada, óxido nítrico sintasa inducible, mieloperoxidasa, xantina oxidasa, lipoxigenasa /cicloxigenasa.^{2, 3}

EL NAP(P) H oxidasa es una importante fuente de ROS(formando superóxido) esta enzima cataliza la transferencia de electrones de la NADPH al O₂ formando superóxido. En presencia de superóxido dismutasa (SOD) el superóxido se dismuta formando un importante papel agente microbicida el peróxido de hidrógeno, a nivel vascular tiene un papel en la aterosclerosis, ya que los fibroblastos de la adventicia, del musculo liso y células endoteliales utiliza el NADH O NAPH como donante de electrones. A nivel la pared arterial el proceso inflamatorio conduce a producción de radicales libres de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno, esto amplia la inflamación vascular y causa la oxidación de biomoléculas que es importante para favorecer la remodelación de tejidos y modulación de las características de las lesiones ateroscleróticas. En la fisiología vascular óxido nítrico se produce por la óxido nítrico sintasa en el sistema vascular, pero en los estados inflamatorios esta enzima se expresa en los macrófagos y células musculares y contribuye a la

producción de Óxido Nítrico, también elevan los niveles de citoquinas lo que resulta en la inflamación localizada.² Cuando el O₂ es producido en conjunto con óxido nítrico forman un importante mediador de la peroxidación lipídica nitración de proteínas, incluyendo la oxidación de las LDL y ser factor pre-aterogénico ya que los neutrófilos y los monocitos secretan mieloperoxidasa que aparece para iniciar la peroxidación lipídica, hay activación de la metaloproteinasas de matriz extracelular de colágeno con debilitamiento de la capa fibrosa y ruptura; Sin embargo si hay ausencia de óxido nítrico este Oxígeno es dismutado al más estable ROS peróxido de hidrógeno por la peróxido dismutasa que posteriormente se transforma en agua por cualquier otra peroxidasa catalasa o glutatión.^{3,17}

La mayoría de los EROS se producen en la cadena respiratoria mitocondrial y de estos 2% al 5% de los electrones son desviados para la producción de radicales libres, estos también puede ser generados en procesos inflamatorios en el catabolismo de ácidos grasos, en la degradación de la xantina a ácido úrico y auto-oxidación de catecolaminas. EL ataque oxidativo en proteínas origina carbonilos de proteína con la pérdida de la funcionalidad de la proteína matriz. Al atacar ácidos grasos poliinsaturados en los fosfolípidos de la membrana celular y formar posteriormente peróxidos de lípidos, se pueden fragmentar en compuestos que pueden medirse para evaluar esta peroxidación como son el malodialdehído.^{3, 18}

Los radicales libres también se producen para combatir agentes estresantes pero cuando estos radicales son mayores de la capacidad de defensa pueden ocurrir daños celulares significativos. Los radicales libre son acusantes y el estrés oxidativo se ha observado en varias patologías, en el tracto intestinal los radicales libres se generan en el lumen y en la mucosa intestinal, la mitocondria es la principal fuente en la producción de ATP mediante la fosforilación oxidativa y el consumo de oxígeno, en paciente con cáncer de colon línea celular 2/15 ocasiona una depleción de ATP, inhibición de la cadena de transporte mitocondrial, complejo mitocondrial de Ca²⁺, apoptosis de la células, lesiones del ADN mitocondrial. Esta peroxidación de las mitocondrias y disminución de la producción de ATP pone en peligro el manteniendo de la homeostasis celular, esta disminución de la ATPs secundaria a los pueden llevar a una degradación en la eficiencia de las enzimas de la cadena respiratoria.^{1, 19, 52}

Son múltiples los procesos patológicos asociados con el desequilibrio del balance oxidación/antioxidación. Sin embargo, entre los más estudiados está en el envejecimiento^{20,21} cáncer,^{19,22,23} enfermedades crónicas como la enfermedad de Alzheimer^{24,25} diabetes mellitus,²⁶⁻²⁷ procesos relacionados con la aterosclerosis,^{2,28,29} síndrome metabólico y ECV,^{17,30,31,32} y enfermedad renal crónica,³²⁻³⁴ entre otras.

Se ha demostrado que la capacidad antioxidativa influye en el pronóstico, de ciertos padecimientos como el cáncer,^{35,36} y las evidencias sugieren que el papel de los radicales libres agrava varias enfermedades como son la aterosclerosis, la inflamación crónica, y el mismo cáncer.^{37,38}

En el cáncer colorrectal los niveles de malondialdehído, así como superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa aumentan significativamente.³⁶ El malondialdehído es un caracterizado mutágeno que reaccionan con desoxiguanosina para formar un aducto endógeno importante en el ADN del hígado en humanos, estas lesiones causadas por el ataque de radicales hidroxilo podría significar el aumento al ADN o en disminuir su reparación. La reacción de aldehídos producidos durante la peroxidación de lípidos con los residuos de los aminoácidos de las proteínas, podría dar lugar a la modificación oxidativa de ellos y estos productos de la peroxidación causar degradación de las proteínas.¹⁹

El anión superóxido, así como alcoxilo peroxilo y los radicales podrían inactivar una de las enzimas antioxidantes catalasa y reducir la eficacia de las células para defenderse del daño de los radicales libres, en el cáncer colorrectal la catalasa disminuyo y por tanto aumenta el peróxido de hidrogeno en el tejido canceroso, esto favorece que haya un aumento de la secreción de metaloproteinasas en la matriz y en la colágena y así como desarrollo de factores angiogénicos (VEGF E IL8) y favorecen no solo el crecimiento de la neoplasia sino también metástasis.¹⁹

El estrés oxidativo está asociado con la diabetes y sus complicaciones. La glucosa se auto-oxida a enediones (enolizarse) en solución acuosa y en presencia de metales de transición, como el Fe^{+3} , reacción en la cual se producen citoaldehídos intermediarios oxidados y Radicales libres con un alto poder oxidante con activación del factor Kappa beta (NF-Kappabeta) y la proteinquinasa C, lo que aumentan la formación de productos finales de la glucosilación intracelulares y la acumulación del sorbitol. La interacción de los productos finales de la glicación avanzada (PFGA) con sus receptores celulares favorece la producción intracelular de RL y a disminuir los niveles intracelulares de antioxidantes. Esta producción de $O_2^{\cdot-}$ mitocondrial inducida por la hiperglucemia aumentando la activación de la vía de los polioles (vías de los hexosaminas) y, consecuentemente, una disminución de NADPH, que constituye el cofactor de las enzimas generadoras de GSH y un aumento del RL peroxinitrito, potente oxidante de lípidos y proteínas. Por otro lado el desbalance entre los EROs y los antioxidantes es un elemento patogénico de la resistencia a la insulina, debido a que no hay estimulación adecuada de las vías de señalización mediados por esta hormona.¹²

La relación catalasa/superóxido dismutasa es considerado un biomarcador del control de la glucemia y ser un factor de riesgo de las complicaciones vasculares presentes en diabéticos. La hipertrigliceridemia asociada a la diabetes aumenta los niveles de Malondialdehído.^{12, 51}

El estrés oxidativo desempeña un papel la enfermedad de Alzheimer, existe una disminución de la capacidad antioxidante total y esto es el resultado de que los antioxidantes se utilizan hasta mantener especies reactivas de oxígeno en condiciones de niveles normales sin una activación de las nuevas moléculas de enzimas antioxidantes, en el cerebro hay exceso de la oxidación de ADN y un aumento de la actividad antioxidante superóxido dismutasa, así mismo existe un aumento de la actividad de leucocitos a nivel de la circulación sistémica. La proteína beta amiloide es una fuente de estrés oxidativo con evidencia de actividad citotóxica en células neuronales. La homocisteinemia y la disminución de la capacidad antioxidante total se correlaciona con la duración de la patología. La concentración de 4-HNE 4-hidroxinonal que es un producto aldehídico de la peroxidación de lípidos está relacionado con el grado de deterioro cognitivo y está implicado en la interrupción de la homeostasis de iones y la muerte celular neuronal inducida por el péptido beta amiloide y por otro lado en los pacientes con enfermedad de Alzheimer los niveles reducidos de ascorbato reduce los niveles de glutatión y un fallo para desintoxicar la acumulación de 4-hidroxenonal.^{18, 24}

En pacientes con insuficiencia renal crónica los productos avanzados de la oxidación de proteína (AOPP) aumentan con la progresión de la patología. Los AOPP activan los monocitos, aumentan la síntesis de $TNF\alpha$ mediadores de la inflamación y se relacionan con la aterosclerosis acelerada de la insuficiencia renal y con los productos de glicación avanzada de la pentosidina así como disminución del nivel de glutatión peroxidasa, estado asociado a uremia crónica y desregulación inmune. Esta activación de los monocitos de la NADPH oxidasa con lleva a la producción de aniones superóxido. Isoprostanos marcador biológico del estrés oxidativo se encuentra elevado en pacientes con insuficiencia renal en comparación con sujetos sano. El aumento del estrés oxidativo y la inflamación son frecuentes en los pacientes con insuficiencia renal crónica antes de la iniciación de la terapia renal pero no se relaciona con las estimaciones de la tasa de filtración glomerular. Las proteínas plasmáticas tiol oxidación y el contenido de proteínas plasmáticas carbonilo puede ser regulada en gran medida por la función tubular principal y no por la filtración glomerular.^{34,39}

Por lo anterior, el estudio de los marcadores de estrés oxidativo continúa siendo un área de mucho interés en diversos grupos de investigadores.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La producción de los radicales libres es inevitable, debido a las reacciones redox de los productos biológicos, de hecho, los radicales libres tales como OH, Peróxido de Hidrógeno, y varios más, se producen como parte de los procesos biológicos esenciales y normales del organismo.^{4,40} Está bien establecido que los radicales libres y las EROS, nitrógeno y el cloro contribuyen al desarrollo de varias enfermedades por inducir estrés oxidativo y daño oxidativo. El estrés oxidativo es comúnmente definido como una alteración entre el balance pro-oxidante y anti-oxidante llevando a un daño en los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos.⁴¹ El estrés oxidativo puede resultar en una reducción en los niveles de anti-oxidantes y/o un incremento en las especies reactivas.⁴² Por lo que consideramos es necesario establecer parámetros de normalidad de marcadores de estrés oxidativo en población aparentemente sana para plantear con más conocimiento de causa medidas no farmacológicas y farmacológicas para prevenir daño por pérdida entre el balance de las sustancias pro-oxidantes y anti-oxidantes.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.

¿Cuáles son los parámetros normales de los marcadores pro y antioxidantes en una población mexicana aparentemente sana?

JUSTIFICACIÓN

El estudio de los niveles plasmáticos de los marcadores de EOX es importante porque no se han definido si son parte de la causa o de la consecuencia de algunas de las complicaciones de las enfermedades mismas, si parecen ser un buen indicador de la severidad del daño orgánico, con el fin de que pueda ser de mayor valor es importante que se establezcan los valores de referencia a fin de ser utilizados para comparar sujetos sanos vs. pacientes con enfermedades graves o crónicas y sus complicaciones y efectos secundarios como la diabetes mellitus, la insuficiencia renal crónica, el síndrome isquémico coronario agudo, o por la afectación del estado de salud por cualquier otra circunstancia.

Si bien, los agentes pro-oxidantes están siendo utilizados cada vez con mayor frecuencia como marcadores biológicos confiables del estrés oxidativo, no han sido suficientemente estudiados en poblaciones sanas, pues la mayoría de la información que se presenta se limita a los grupos testigos de cada estudio en particular.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Caracterizar algunos marcadores bioquímicos de EOx en una población mexicana aparentemente sana para establecer los valores de referencia.

Objetivos Específicos.

- Establecer los valores de referencia plasmáticos de malondialdehído totales en sujetos aparentemente sanos.
- Establecer los valores de referencia plasmáticos de productos tardíos de la oxidación de proteínas (AOPP) en sujetos aparentemente sanos
- Establecer los valores de referencia plasmáticos de glutatión total en sujetos aparentemente sanos.
- Establecer los valores de referencia plasmáticos de óxido nítrico (NOX) en sujetos aparentemente sanos.
- Establecer los valores de referencia plasmáticos de carbonilos totales en sujetos aparentemente sanos.
- Establecer los valores de referencia plasmáticos de dienos conjugados en sujetos aparentemente sanos.
- Establecer los valores de referencia plasmáticos de los productos tardíos de la glucosilación (AGEs) en sujetos aparentemente sanos.
- Establecer los valores de referencia plasmáticos de peróxido de hidrogeno (H₂O₂) en sujetos aparentemente sanos

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño del estudio

Estudio transversal, observacional y descriptivo en sujetos adultos aparentemente sanos.

Población de estudio

La población de estudio se seleccionó de los voluntarios que acudieron al banco de sangre como posibles donadores y que de acuerdo a la historia clínica, y marcadores bioquímicos resulten aptos para ser donadores. Todos los participantes dieron su autorización verbal y por escrito y el protocolo de estudio fue autorizado por el Comité Local de Investigación y Ética del Hospital General Regional No. 1 del IMSS en Morelia, Michoacán.

Criterios de inclusión

Se involucraron a sujetos mayores de 18 años, sin selección por género, que no eran portadores de hipertensión, diabetes o cualquier otra enfermedad aguda o crónica, no estar recibiendo medicación, que otorguen su consentimiento informado y estén en condiciones de proporcionar una muestra de sangre.

Criterios de exclusión

Sujetos con presencia de infecciones (bacterianas o virales), cáncer, alcoholismo, tabaquismo, padecimientos articulares crónicos, y consumo complementario de vitaminas A, B, C, D, E, selenio o zinc.

Tamaño de muestra

Para valores mínimos de coeficiente de correlación > 0.2 con ES de 0.06, $\alpha=0.05$ y potencia de 0.90, la n debe ser >190 casos.

Definición Operativa de Variables.

VARIABLE	DEFINICIÓN OPERATIVA	CATEGORÍA	ESCALA	INDICADOR
Edad	Tiempo de existencia desde el nacimiento.	Cualitativa	Discreta	Años
Sexo	Designación a la determinación del género masculino y femenino	Cualitativa	Nominal	Masculino/Femenino
Talla	Distancia que existe entre el vértex y el plano de sustentación	Cuantitativa	Continua	Metros
Peso	Fuerza con la cual un cuerpo actúa sobre un punto de apoyo, y que está originada por la acción del campo gravitatorio local sobre la masa del cuerpo	Cuantitativa	Continua	KG
IMC	Es el cociente entre el peso de una persona y su altura (expresada en metros) elevada al cuadrado	Cuantitativa	Continua	Kg/mts ²
Presión arterial	Es la fuerza o presión que lleva la sangre contra las paredes de las arterias. la fuerza de igual magnitud pero en sentido contrario ejercido por la pared de la arteria que se opone a la distensión	Cuantitativa	Continua	mmHG
Glucosa	Monosacárido soluble en agua presente en la sangre	Cuantitativa	Continua	Mg/dl

Caracterización de marcadores bioquímicos de estrés oxidativo

Triglicéridos	Lípidos formados por una molécula de glicerol esterificado con tres ácidos grasos	Cuantitativa	continua	Mg/dl
HDL c	Lipoproteínas que transportan el colesterol desde los tejidos del cuerpo hasta el hígado.	Cuantitativa	Continua	Mg/dl
LDL- c	La mayor parte del colesterol que se transporta en la sangre unido a proteínas	Cuantitativa	Continua	Mg/dl
Creatinina	Sustancia orgánica, producto del metabolismo de las proteínas, que se elimina por la orina y que se mide en la sangre como indicador de la función del riñón.	Cuantitativa	Continua	Mg/dl
Acido Úrico	es el resultado final del metabolismo de las purinas (partes de DNA y RNA)	Cuantitativa	Continua	Mg/dl
Albumina	Proteína soluble en agua y que se coagula por el calor, presente en el plasma sanguíneo. Su función principal es la de transportador inespecífico de muchas otras moléculas.	Cuantitativa	Continua	Mg/dl
Hemoglobina	Proteína que se encarga de realizar el intercambio de gases en los tejidos del	Cuantitativa	Continua	Gr/dl

Caracterización de marcadores bioquímicos de estrés oxidativo

	organismo. Es el principal componente de los hematíes			
Glutación	El glutación es una proteína pequeña, formada por tres aminoácidos: cisteína, ácido glutámico y glicina, antioxidante endógeno	Cuantitativa	Continua	μM/L
Óxido Nítrico	Gas biológicamente activo producido básicamente en las células del endotelio vascular es una pequeña molécula de 30 Da difusible en líquidos y tejidos corporales con una vida media muy corta de aproximadamente 5 segundo	Cuantitativa	Continua	μM/L
Malondialdehído	Conjunto de enzimas de la β-oxidación mitocondrial que reducen los ácidos grasos de distintas longitud de cadena.	Cuantitativa	Continua	μM/L
AOPP	Productos resultantes del metabolismo en las proteínas en la mitocondria.	Cuantitativa	Continua	μM/L

METODOLOGÍA

Somatometría y análisis de laboratorio de rutina

Se midió y registro peso, estatura, circunferencia de cintura y cadera. Tras un periodo de 10 minutos de reposo en posición de sentado y sin haber tomado bebidas cafeinadas o haber fumado cigarrillos, se tomó y registró las cifras de presión arterial, con un baumanómetro de mercurio (mercurial baumanometer, LTD). Para considerar las cifras de presión arterial normal sistólica y diastólica se consideraron los criterios del JNC-VII⁵⁰ y sin que estuvieran tomando medicamentos antihipertensivos. En ayuno de al menos 8 horas se tomó una muestra de 10 mL de sangre de la vena antecúbita izquierda, en dos tubos uno sin anticoagulante que se utilizó para la determinación de la química sanguínea 6 y uno con anticoagulante que se utilizó para la determinación de Hb, Ht y los marcadores de estrés oxidativo; una vez obtenida la sangre inmediatamente se centrifugó a 2500 rpm y el suero y plasma obtenido se mantuvo en congelación de -70° C hasta sus determinaciones bioquímicas.

En suero se midió glucosa, urea, creatinina, colesterol total, triglicéridos, c-HDL, c-LDL, ácido úrico y albúmina en un autoanalizador bioquímico automatizado Modelo: Easy Kem Plus N° Serie 400606087 Marca Kontrol Lab. y los resultados se reportaron en mg/dL y gr/dL respectivamente. Por cuestiones técnicas en el laboratorio solo se pudieron determinar las concentraciones plasmáticas de Malondialdehído, AOPP, Glutación y óxido nítrico, sin embargo se describen todas las técnicas que habitualmente se utilizan en el laboratorio para la determinación de estos marcadores pro y antioxidantes, de los cuales no existen rangos de referencia para comparación.

Procedimientos bioquímicos

La toma de muestra sanguínea se realizó en las primeras horas de la mañana tras un ayuno mínimo de 8 horas. Una vez colectada la sangre (en tubo heparinizado, aproximadamente 5 mL) se mantuvo a 4°C y se envió rápidamente al laboratorio. Una vez en el laboratorio, la sangre se centrifugo a 3000 rpm durante 15 minutos y se separará el plasma de los eritrocitos. El plasma fue fraccionado en alícuotas y se mantendrán a -70°C hasta el momento de las mediciones bioquímicas.

El colesterol total (CT), y los triglicéridos (Tg), se determinaron por método enzimático colorimétrico, siguiendo las indicaciones de los insertos del fabricante.

Determinación de la peroxidación lipídica (MDA)

El malondialdehído es el producto final de la peroxidación de los ácidos grasos y un marcador de la actividad de los radicales libres. Para la medición de la concentración de peroxidación lipídica se utilizó el método del ácido tiobarbitúrico (TBA) descrito por Wade y van Rij (49). Aunque el TBA no sólo se limita a la medición del MDA, es el método más empleado para determinar la oxidación lipídica y por lo tanto el estrés oxidativo. En resumen, a 100 μ L de plasma se les añadieron 50 μ L de ácido tricloroacético al 25%, y se incubaron a 4 °C durante 15 minutos, posteriormente se centrifugaron a 4 °C, 5000 x g durante 3 min, y el sobrenadante (100 μ L) neutralizado con NaOH (JT Baker) 4 M. A 1 mL de la solución anterior se le adicióno 1 mL de TBA (AcrosOrganics, Bélgica) al 0.7 % y se incubará a 90 °C durante 60 min. La reacción de color se midió con espectrofotométricamente (532 nm). Se utilizará al tetrametoxipropano como estándar. La concentración de MDA (medido como sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, TBAR) se calculo como μ mol/L

Concentración de productos avanzados de la oxidación de proteínas (AOPP)

La determinación de AOPP fue determinada a partir de una curva de calibración utilizando como patrón de referencia cloramina T (Sigma St Louis, MO, EE.UU.) con un método colorimétrico en medio ácido y en presencia de yodo. Serán utilizados 100 μ L de suero en 1 mL de solución amortiguadora a los cuales se añadirán 50 μ L de ioduro de potasio (Sigma St Louis, MO, EE.UU.) y 100 μ L de ácido acético glacial (Sigma St Louis, MO, EE.UU.). La absorbancia de la reacción será determinada inmediatamente a 340 nm contra blanco de reactivo (47) La concentración de AOPP será expresada como μ M de cloramina T.

Concentración de glutatión

Luego de llevar a cabo una precipitación de grupos tioles proteicos, la concentración de GSH se determinó mediante el método de Hu (45) y de Sedlak y Lindsay (46) que utiliza el reactivo de Ellman (ácido 2, 2'ditio-bis-2-nitrobenzoico) 10⁻² M (Sigma StLouis,MO, EE.UU.). La longitud de onda utilizada será de 412 nm. Fue utilizado GSH (Sigma St Louis, MO, EE.UU.) como patrón de referencia para la generación de una curva de calibración que permitirá la extrapolación y el cálculo de la concentración de GSH en la muestra analizada.

Determinación de la producción de óxido nítrico (NOx)

La medición de NOx se realizó mediante la determinación de la cantidad total de nitritos (NO₂-), que son los productos estables del metabolismo de NO. Se utilizará el reactivo de Griess (solución acuosa de sulfanilamida al 1% y naftilenetilendiamina al 0.1% en H₃PO₄ (al 2.5%, JT Baker), el cual forma un cromóforo estable con NO₂-, y que absorbe a 546 nm.¹⁵ La curva de calibración se realizó con diferentes concentraciones de nitrito de sodio disuelto en NaCl al 0.9%, (53). Cada muestra fue ensayada por duplicado y el fondo de lectura se obtuvo de tratar a unas muestras de plasma usando ácido fosfórico al 25%, en el lugar del reactivo completo de Griess. La curva de calibración se hizo con nitrito de sodio en agua destilada y (rango lineal de 0-100 uM/L). El límite de detección es muy cercano a 1.5 umol/L.

Determinación de los carbonilos totales

La oxidación de proteínas se determina midiendo la cantidad de grupos carbonilos en presencia del reactivo ácido dinitrofenilhidrazina a 370 nm (48). Se empleará como blanco una muestra de plasma pero sin dinitrofenilhidrazina a la que se le restará de los valores obtenidos. El contenido de carbonilos se hará utilizando el coeficiente de extinción molar de 22,000. Los resultados se expresarán como nmol/mL plasma.

Determinación de los dienos conjugados (DC)

La formación de dienos conjugados es una de las consecuencias del ataque oxidativo a los lípidos poliinsaturados (PUFAS). El método convencional para su determinación consiste en su extracción de las muestras biológicas con una mezcla de cloroformo-metanol y midiendo su absorbancia a 233 nm. El método puede utilizarse tanto "in vivo" como "in vitro" porque es relativamente rápido y simple. Se han realizado trabajos en muestras humanas de bilis y jugo duodenal en pacientes con pancreatitis o cáncer de páncreas, en plasma de pacientes con distintas patologías, etc. Esta medición se hace de acuerdo al método de Wallin et al. (50). En resumen, una muestra de plasma se mezclan con isopropanol, se agitarán en un agitador tipo vortex y tras una centrifugaron a se leerá en la fase orgánica la lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda 232 nm, contra un blanco de isopropanol. Los resultados se expresarán en nmoles de DC/mg proteínas.

Determinación de los productos tardíos de la glucosilación (AGEs)

Debido a que los AGEs son compuestos fluorescentes, se determinan mediante un método fluorométrico con base en los procedimientos de Henle (51) y Munch (52). Una muestra de plasma será diluida 100 veces con PBS y filtrada (0.22 μm , Millex-GV; Millipore, Bedford, MA, USA). El ensayo se realiza en placas de 96 pozos y el espectro fluorescente (con corrección del fondo) se medirá por triplicado en un espectrofotómetro luminiscente a temperatura ambiente. Las longitudes de onda de excitación como de emisión se fijarán a 1 nm y se emplearán la longitud de 350 nm de excitación y 440 nm de emisión. Los AGEs totales séricos fluorescentes se expresan como la intensidad relativa de fluorescencia en unidades arbitrarias (UAF).

Concentración de hidroperóxidos totales

Para la determinación de ROOH (H_2O_2) se utiliza el ensayo que se basa en la oxidación de iones ferrosos a férricos causada por los ROOH bajo condiciones ácidas. Los iones férricos se unen al indicador xilenol naranja (3,3'-bis(N,N-di(carboximetil)-aminometil)-o-cresolsulfonaftaleina, sal sódica) (Sigma St Louis, MO, EE.UU.) y forman un complejo estable coloreado detectable a 560 nm (54).

La peroxidación de lípidos se evalúa mediante la oxidación del Fe^{2+} al Fe^{3+} en presencia de naranja de xilenol (ensayo de FOX) a 560 nm (55). En resumen, la mezcla de reactivos contiene plasma, naranja de xilenol, sulfato ferroso de amonio, metanol, butil hidroxitolueno y ácido sulfúrico. Después de un periodo de incubación a temperatura ambiente se mide la absorbancia a 560 nm utilizando un espectrofotómetro Beckman. La solución de calibración se hace con peróxido de hidrógeno. Los resultados se expresarán en nmol/mL de plasma.

Análisis Estadístico

Se usaron medidas de tendencia central y de dispersión paramétricas o no paramétricas según la distribución de los datos para presentar las características clínicas y bioquímicas de la población estudiada.

Las diferencias en las medias de las variables clínicas y bioquímicas obtenidas por género se analizaron mediante la prueba de *t* Student para muestras independientes; mientras que el análisis de las diferencias en las medias de las variables cuando se analizaron por edad e IMC se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguido de la prueba de Tukey como pos-Hoc. A si mismo se utilizó coeficiente de correlación de Pearson como un índice para medir el grado de relación de dos variables cuantitativas.

Todos los cálculos fueron realizados con el paquete estadístico SPSS versión 18 para Windows y el paquete estadístico Prisma V.4. Se consideró un nivel de significancia estadística a un valor de $p < 0.05$.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

Buenas Prácticas Clínicas:

Este estudio se realizó de acuerdo con las Buenas Prácticas Clínicas, según lo definió la Conferencia Internacional sobre Armonización y de acuerdo con los principios éticos subyacentes en las disposiciones contenidas en el Reglamento de la Ley General de Salud en materia de Investigación para la salud. De acuerdo a este reglamento, este tipo de investigación está clasificada como: Investigación con riesgo mínimo. (Sección de Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos. (pag.424, Capítulo I, Artículo 17)). El protocolo en ninguno de sus procedimientos atenta contra la integridad física y moral de las personas que se involucren en él.

La identidad de los pacientes se mantuvo en la Unidad de Investigación en Epidemiología Clínica donde acudió para su evaluación inicial y seguimiento. El personal médico que participó en la realización de este estudio es calificado por su educación, capacitación y experiencia para realizar sus respectivas tareas. El personal codificó la muestra y la remitirá al laboratorio para su procesamiento. La información que se envió al laboratorio no incluía ninguna referencia que permitiese identificar directa o indirectamente al paciente. Para el acceso a otros datos de la historia clínica del paciente, fue el investigador principal del proyecto quién acudió a los diversos servicios clínicos para conseguir dicha información, salvaguardando el principio de confidencialidad. Por lo tanto, los datos personales de todos los individuos que participaron en el estudio se manejaron con confidencialidad.

El protocolo se ajusta a los principios científicos y éticos prescritos para realizar estudios de investigación en sujetos humanos, tomando en cuenta lo contenido en la Norma Oficial Mexicana. En el presente estudio, el procedimiento que se realizó para la obtención de la muestra de sangre periférica está asociado a riesgos mínimos para el paciente.

Se respetaron cabalmente las enmiendas de la Declaración de Helsinki de 1964, revisado por última vez en 2004, los principios contenidos en el Código de Núremberg, el Informe Belmont y el Código de Reglamentos Federales de Estados Unidos.

Comité de ética en la Investigación:

Antes de iniciar el estudio, el investigador obtuvo la aprobación/opinión favorable por escrito y fechada del Comité de Ética en la Investigación, del HGR No.1, IMSS, forma de consentimiento, materiales del reclutamiento del sujeto/proceso, y cualquier otra forma por escrito que se le proporcione a los sujetos de estudio.

El investigador o quien designe responsable proporcione al Comité de Ética en la Investigación reportes, actualizaciones y otra información (por ejemplo enmiendas y cartas administrativas) de acuerdo a los requerimientos regulatorios o procedimientos de la institución.

Consentimiento informado:

El/los investigador(es) se aseguraron de que los sujetos, o en aquellas situaciones donde los sujetos no pueden otorgar el consentimiento, su representante legalmente aceptable, recibió información clara y completa acerca del propósito, riesgos potenciales y asuntos críticos respecto del estudio en el cual participan de manera voluntaria. Se obtuvo el consentimiento informado por escrito y libremente otorgado de cada sujeto o, en aquellas situaciones donde los sujetos no puedan otorgar el consentimiento, de su representante legalmente aceptable, antes de su participación en este estudio, incluyendo el consentimiento informado para cualquier procedimiento que se le realice.

RECURSOS, FINANCIAMIENTO Y FACTIBILIDAD

Recursos

Humanos: tres investigadores y un médico residente de medicina familiar.

Investigador principal:

- Dr. Juan M. Gallardo Montoya. Adscrito a la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Nefrológicas. Centro Médico Nacional "Siglo XXI" - IMSS. Con amplia experiencia y dominio de las técnicas y análisis de los marcadores de estrés oxidativo.
- Dr. Cleto Álvarez Aguilar. Adscrito al Hospital General Regional No. 1 del IMSS. Con experiencia en la conducción de estudios epidemiológicos y ensayos clínicos, línea de investigación en enfermedades nefrológicas. Responsable local de la conducción del estudio, del análisis de los resultados y de la escritura del manuscrito para publicación. Participó también en la selección de la población de estudio y fungió como co- tutor de la residente de medicina familiar.
- Dra. Brisa Yadira Manjarrez Luciano. Residente de Tercer año de Medicina Familiar que fue su trabajo de tesis para obtener su Especialidad, participó en la selección de los voluntarios sanos que acudieron como donadores del banco de Sangre del HGR No. 1, IMSS, llenó la historia clínica, y tomó las muestras así mismo las procesó para congelarlas a -70 °C.
- Dra. En Farmacología, Anel Gómez García. Adscrita al Centro de Investigación Biomédica de Michoacán (CIBIMI), con amplia experiencia en manejo de tejido hemático y de las técnicas para la medición de todos los marcadores bioquímicos que se realizaron en el presente estudio, además de propuestas para tratamientos farmacológicos.

Físicos:

- 1 computadora
- 1 software para análisis estadístico (SPSS o Prisma V-4)
- 1 Impresora láser
- Insumos de papelería (hojas, lápices, cartuchos para impresoras, etc.)

Laboratorio:

- Equipo
- Reactivos

Financiamiento

Fue financiado con los recursos que tienen los investigadores tanto de la Unidad de Investigación en Enfermedades Nefrológicas del Hospital de Especialidades CMN siglo XXI como del HGR No. 1, IMSS, Morelia Michoacán.

Factibilidad

- Los investigadores cuentan con la formación y experiencia en evaluaciones clínico-epidemiológicas, así como en ensayos clínicos experiencia en el manejo y procesamiento de muestras biológicas y en laboratorio.
- Cuentan con los recursos físicos para realizar el estudio en complemento con lo indicado en el presupuesto y en el tiempo planeado.

RESULTADOS

Estos resultados corresponden a un estudio piloto donde se describen parte de la muestra analizada (80 de 242 sujetos) de ambos géneros aparentemente sanos ya que se consideraron aptos para ser donadores de tejido hemático. La Tabla 1 muestra los resultados de las variables clínicas obtenidas analizadas por género. Solo se observó diferencia en la talla ($p= 0.034$) y en los límites en el peso corporal ($p=0.053$). La Tabla 2 ilustra los resultados obtenidos de las variables bioquímicas analizadas igualmente por género. No hubo diferencias entre los hombres vs mujeres.

TABLA 1. Variables antropométricas de la población estudiada en relación al género

VARIABLES	GENERO		p
	HOMBRES N= 51	MUJERES N=29	
Edad (años)	31 ± 1	30 ± 2	.402
Talla (m)	1.71 ± 0.08	1.57 ± 0.01	.034
Peso (Kg)	79.4 ± 1.2	72.1 ± 3.3	.053
IMC (Kg/m ²)	27.09 ± 0.35	28.94 ± 1.01	.740
PAS (mmHg)	116 ± 1	113 ± 2	.627
PAD (mmHg)	71 ± 1	71 ± 1	.626

IMC= índice de masa corporal; PAS= Presión arterial sistólica; PAD= Presión arterial diastólica.

TABLA 2. Variables bioquímicas de los participantes por género.

VARIABLE	GENERO		Sig
	HOMBRES N= 51	MUJERES N= 29	
Glucosa (mg/dl)	96.84 ± 1.44	85.98 ± 1.91	0.314
TG (mg/dl)	218.78 ± 13.86	124.32 ± 26.9	.0.258
Colesterol (mg/dl)	198.91 ± 6.48	151.74 ± 10.33	0.297
HDL-c (mg/dl)	48.35 ± 1.33	50.12 ± 1.65	0.073
LDL-c (mg/dl)	103.13 ± 5.10	76.76 ± 10.63	0.244
Creatinina mg/dl	0.94 ± 0.01	0.91 ± 0.03	0.088
Acido úrico (mg/dl)	5.03 ± 0.23	4.72 ± 0.63	0.893
Albumina (mg/dl)	4.25 ± 0.02	4.23 ± 0.07	0.573
Hemoglobina (g/dl)	16.05 ± 0.251	14.52 ± 0.11	0.365

PAS: Presión arterial sistólica; TAD Presión arterial diastólica; IMC: Índice de masa corporal, TG: triglicéridos; HDL-c Colesterol de Alta densidad, LDL-c colesterol de baja densidad. TC colesterol total

La figura 1 muestra la frecuencia de la población estudiada dividida por género. Predominó el género masculino en un 64 % (51 sujetos).

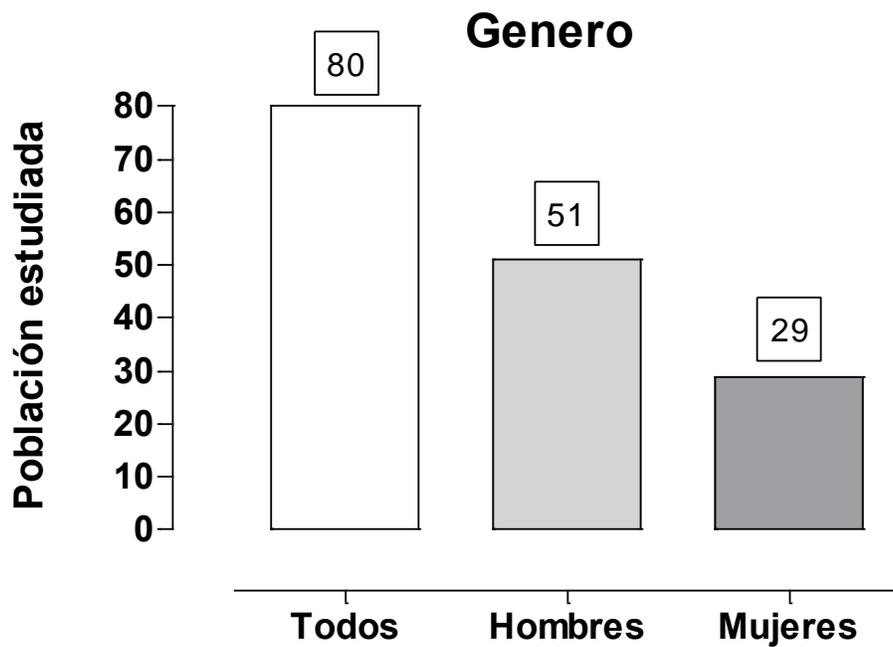


FIGURA 1. Frecuencia de la población estudiada por género

La figura 2 muestra los resultados obtenidos por género de las concentraciones plasmáticas de Malondialdehído donde no se observo diferencias significativas entre ambos.

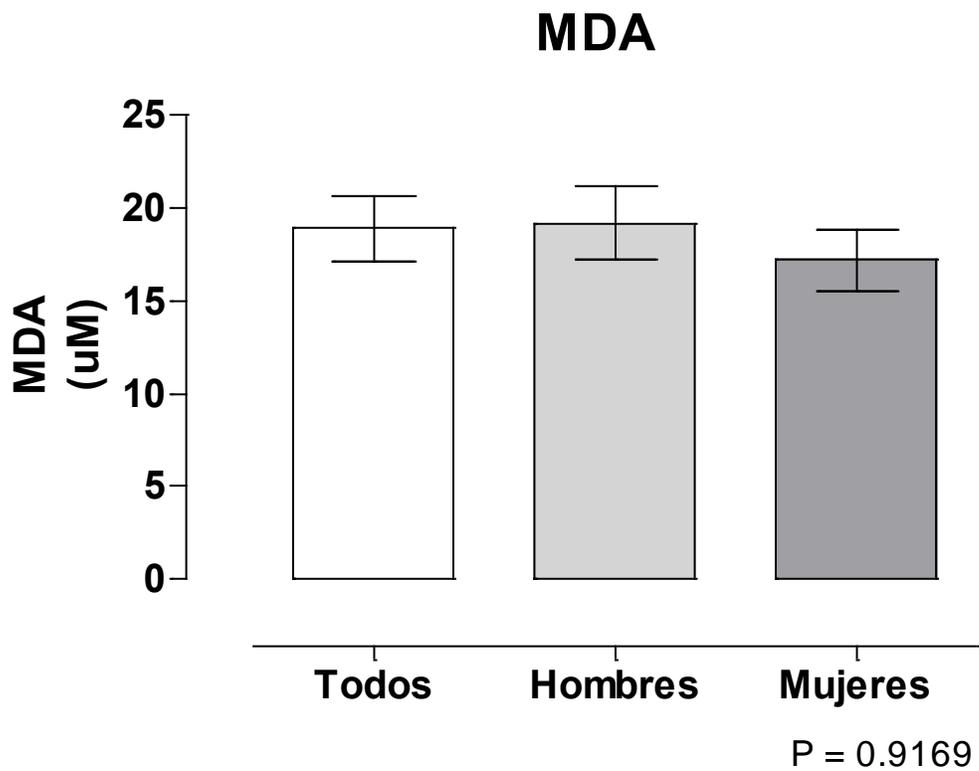


FIGURA 2. Concentración de Malondialdehído distribuido por género

La figura 3 nos muestra los resultados obtenidos por género de las concentraciones plasmáticas de Productos avanzados de la oxidación de proteínas donde se observa diferencia en ambos géneros sin embargo no es estadísticamente significativa.

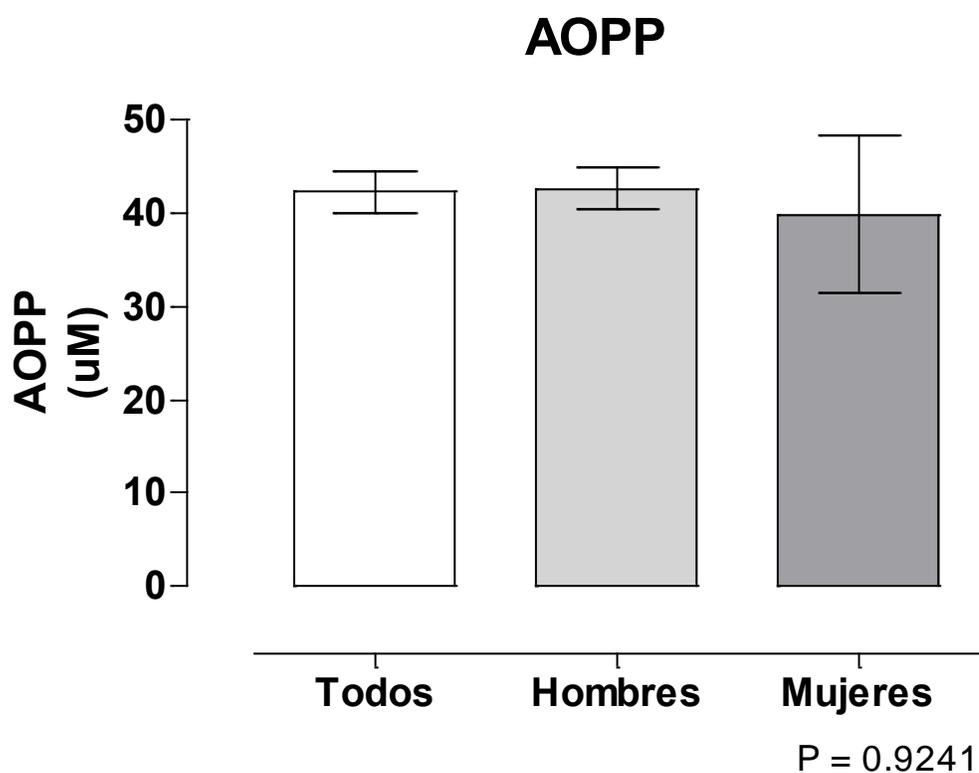


Figura 3. Concentración de Productos avanzados de la oxidación proteica distribuida por género.

La figura 4 nos muestra los resultados obtenidos por género de las concentraciones plasmáticas de Glutación donde la diferencia entre ambos géneros no fue significativa.

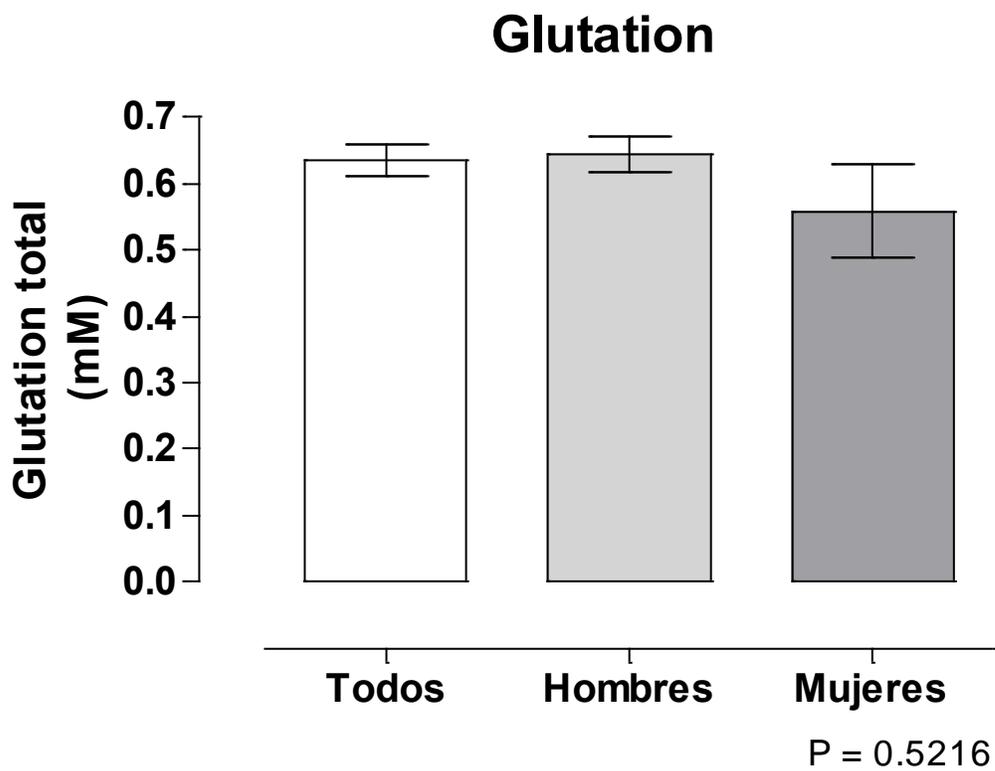


FIGURA 4. Concentración de Glutación distribuido por género

La figura 5 muestra que no hay diferencia significativa de las concentraciones plasmáticas de Óxido Nítrico obtenidos por género.

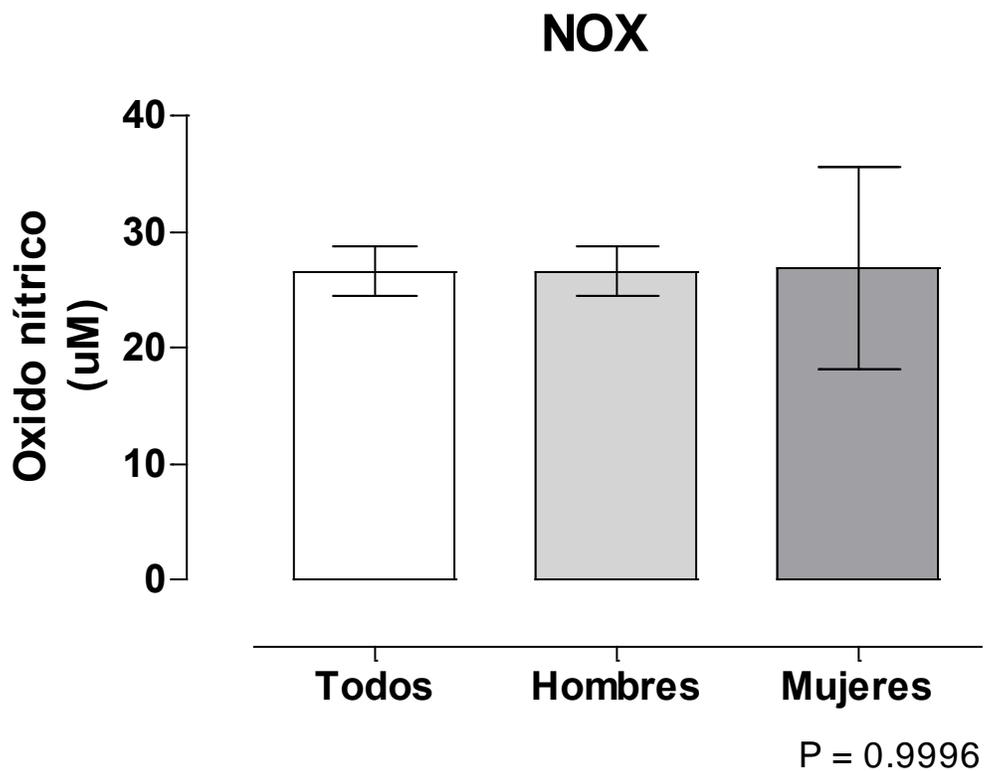


FIGURA 5. Concentración de óxido nítrico distribuido por género

Al realizar un análisis de estos marcadores pro y antioxidantes por edad y por IMC aunque se observó una tendencia hacia un aumento en las concentraciones plasmáticas de estos marcadores, la diferencia no alcanzó a ser significativa. Los resultados se muestran en la Tabla 3 y 4 respectivamente

Tabla 3. Resultados de los marcadores pro y antioxidantes de la población estudiada analizada por edad.

Marcador	Edad			p
	18-30	31-40	41-50	
MDA ($\mu\text{M/L}$)	18.90 \pm 13.35	17.02 \pm 6.59	22.48 \pm 9.85	0.577
AOPP ($\mu\text{M/L}$)	40.93 \pm 21.44	44.28 \pm 18.02	42.78 \pm 17.78	0.795
Glutación ($\mu\text{M/L}$)	0.63 \pm 0.23	0.64 \pm 0.21	0.62 \pm 0.18	0.958
NOX ($\mu\text{M/L}$)	24.34 \pm 16.59	28.98 \pm 17.75	30.52 \pm 18.11	0.486

MDA= Malondialdehído; AOPP= Productos avanzados de la oxidación de proteínas; NOX= Óxido nítrico.

Tabla 4. Resultados de los marcadores pro y antioxidantes de la población estudiada analizada por índice de masa corporal.

Marcador	IMC			p
	Hasta 25	25.1-29.9	≥ 30	
MDA ($\mu\text{M/L}$)	14.45 \pm 8.18	21.17 \pm 12.62	17.32 \pm 2.19	0.248
AOPP ($\mu\text{M/L}$)	42.66 \pm 21.03	41.39 \pm 20.97	45.69 \pm 10.45	0.795
Glutación ($\mu\text{M/L}$)	0.63 \pm 0.12	0.62 \pm 0.21	0.69 \pm 0.23	0.542
NOX ($\mu\text{M/L}$)	24.97 \pm 15.24	25.53 \pm 17.48	32.21 \pm 18.14	0.464

IMC= índice de masa corporal (peso kg/talla m^2); MDA= Malondialdehído; AOPP= Productos avanzados de la oxidación de proteínas; NOX= Óxido nítrico.

La Tabla 5 muestra la correlación de Pearson entre las variables estudiadas. Solo hubo una correlación directa entre las concentraciones plasmáticas del MDA ($r=0.303$, $p<0.01$) y NOX ($r=0.611$, $p<0.0001$) con las concentraciones séricas de albúmina.

Tabla 5. Correlación de Pearson de las variables estudiadas.

Variable	Edad	IMC	Glucosa	Albúmina	MDA	AOPP	Glutación	NOX
Edad	1							
IMC	.339	1						
Glucosa	-.032	.119	1					
Albúmina	.146	.204	.198	1				
MDA	.026	.102	-.057	-.146	1			
AOPP	.074	.022	.111	.174	-.094	1		
Glutación	.020	.108	.130	.303*	.101	.123	1	
NOX	.186	.160	.125	.611**	-.102	.102	.000	1

* $p<0.01$; ** $p<0.0001$

IMC= índice de masa corporal (peso kg/talla m^2); MDA= Malondialdehído; AOPP= Productos avanzados de la oxidación de las proteínas; NOX= Oxido nítrico.

Finalmente, la tabla 6 muestra las concentraciones plasmáticas de los marcadores pro y antioxidantes obtenidos de la población estudiada sana aparentemente y propuestos como valores de referencia.

Tabla 6. Valores plasmáticos de los marcadores pro y antioxidantes de la población estudiada propuestos como valores de referencia.

Marcador	HOMBRE	MUJER
MDA ($\mu\text{M/L}$)	19.18 ± 11.71	17.28 ± 4.56
AOPP ($\mu\text{M/L}$)	42.33 ± 19.29	43.60 ± 23.95
Glutación ($\mu\text{M/L}$)	0.64 ± 0.21	0.54 ± 0.23
NOX ($\mu\text{M/L}$)	26.36 ± 16.06	24.26 ± 24.16

MDA= Malondialdehído; AOPP= Productos avanzados de la oxidación de Proteínas; NOX= Óxido nítrico.

DISCUSIÓN

El endotelio vascular juega un papel importante en la aterogénesis, puesto que las células endoteliales modulan numerosos procesos claves que mantienen la homeostasis vascular incluyendo el tono vascular. El endotelio sano produce y reacciona a un importante número de mediadores activos locales, particularmente el NOX, y de esa manera mantiene un balance entre vasodilatación y vasoconstricción fenómenos fisiológicos indispensables para mantener una adecuada perfusión tisular.

Sin embargo, bajo la influencia de múltiples factores de riesgo, existe una producción importante de RL y una marcada reducción en la disponibilidad de NOX favoreciendo la acumulación de células inflamatorias en la pared vascular y lesión secundaria endotelial. El incremento descontrolado de los Radicales libres genera el fenómeno conocido como estrés oxidativo (EOx).¹ El daño a biomoléculas que determinan los estos radicales libres se haya relacionado con el desarrollo o exacerbación de algunos procesos patológicos: aterosclerosis, infarto del miocardio, cirugía cardíaca, diabetes, enfermedad de Parkinson, Alzheimer, neuropatía alcohólica, hiperoxia, isquemia o infarto cerebral, cataratas, daño, tabaquismo, cáncer de pulmón, enfisema, artritis reumatoide, insuficiencia renal crónica entre otros por lo que es necesario conocer los valores basales de los marcadores de daño por RL en población mexicana sana para valorar al efecto de patologías asociadas con el estrés oxidativo.⁴³

El presente estudio constituye el primer reporte que evalúa los niveles plasmáticos de MDA, AOPP, Glutación y NOX en una población mexicana aparentemente sana que acudieron a la unidad del Banco de sangre y que cumplieron con los requisitos que establecían en la Unidad para poder ser donadores, entre los que destacan no ser diabéticos, ni hipertensos, ni padecer enfermedades renales, hepáticas, cardíacas pulmonares o infectocontagiosas y con un peso por arriba de 55 kilos. Igualmente el determinar los valores plasmáticos de estos marcadores pro y antioxidantes nos permitirá establecer comparaciones o establecer parámetros basales y poderlos comparar con los valores que se obtengan en pacientes con alteraciones biológicas específicas.

En nuestro estudio no encontramos diferencias significativas en las concentraciones del MDA, AOPP, glutatión ni NOX cuando se analizaron por género. Tampoco se encontraron diferencias significativas en estos mismos marcadores cuando sus concentraciones fueron analizadas por edad o IMC, por lo que de continuar con esta misma tendencia los resultados podrán ser utilizados de referencia cuando se estudien a pacientes con edad, IMC, o patologías crónicas conocidas.

Muchas sustancias involucradas directa o indirectamente en el daño tisular son liberadas al medio extracelular y que pueden ser medidas en el plasma sanguíneo. El MDA y los AOPP, producto directo de la acción de los radicales libres de oxígeno sobre los ácidos grasos poliinsaturados y proteínas de la membrana celular y que reflejan el daño oxidativo a lípidos y proteínas son dos de los marcadores más comúnmente analizado.⁴⁴ Nuestros resultados incluyen a estos dos marcadores para ser utilizados en población mexicana aparentemente ya que aunque hubo una tendencia al incremento en las concentraciones en los diferentes grupos de edad y con diferente índice de masa corporal que generó una clasificación en cuanto a peso normal, sobrepeso y obesidad, estos no alcanzaron una diferencia significativa. Una de las patologías que se conoce cursa con un aumento importante en el estrés oxidativo es la cardiopatía isquémica. Nosotros encontramos concentraciones diferentes en una población estudiada con esta patología (MDA 89uM, NOx 11uM). (Datos no publicados). Similarmente otros estudios han reportado incrementos en estos marcadores de forma paralela con un incremento en la edad y con el peso corporal como lo definió Veglia y cols⁴⁵ se pudo observar índice global del estado de oxidación es posiblemente más sensibles a las variaciones de edad y sexo, en donde malondialdehído Glutatión reducido y glutatión disulfuro fue muy significativa asociada con la edad mayor de 51 a 77 años. Aunque estos resultados son contradictorios ya que otros reportes no encontraron diferencias significativas.^{44, 46}

El glutatión se trata de un tripéptido formado por los aminoácidos: ácido glutámico, glicina y cisteína (Glu-Gly-Cys), las funciones de este antioxidante no sólo es actuar a nivel de la detoxificación de compuestos endógenos y exógenos sino también en los procesos de defensa contra el *stress* oxidativo y su influencia en el balance del estado redox celular. Su reducción se asocia con envejecimiento secundario a radicales libres. Por otro lado el óxido nítrico otro antioxidante endógeno a partir del grupo guanidilo que se encuentra en la L-arginina en el endotelio vascular NO es un mediador crucial de la vasodilatación dependiente del endotelio y también puede jugar un papel en la agregación plaquetaria y en el mantenimiento del equilibrio entre el crecimiento de células musculares lisas y la

diferenciación, es capaz de inhibir la lipoperoxidación en las lipoproteínas de baja densidad.^{17,47}

Nuestro estudio mostró al igual que en las concentraciones plasmáticas MDA y AOPP no hubo diferencias cuando se analizaron por género, edad o peso corporal por lo que se induce que existe un balance adecuado pro y antioxidante en la población estudiada. Nuestros resultados están acorde con reportes previos como lo que mostro Torres-Ramos y cols⁴³ en un estudio realizado en una población mexicana sana mayor de 31 a 60 años observaron que daño a lípidos, con determinación de MDA no presentaron un aumento en sus concentraciones significativamente estadístico en relación con la edad. Así mismo en un estudio realizado en Maracaibo Venezuela por Cano y cols⁴⁴ en una población sana en sujetos sanos en dos grupos de edad eran de 13 a 19 años y de 20 a 38 años, La determinación del MDA en ambos sexos y grupos etarios reveló que no existe diferencia significativa entre ellos.

Por otro lado, resalta igualmente el hecho de haber encontrado una correlación directa entre las concentraciones plasmáticas del Glutatión y el NOX con las concentraciones séricas de albúmina. La albúmina es una proteína plasmática que conforman más del 50% de la actividad antioxidante total. Se le considera la responsable de captar entre el 10 y el 50% del total de radicales peroxilo que se generan en el plasma humano, además de que tiene la capacidad de unirse al cobre, y de esta manera inhibe la formación del radical hidroxilo que se forma a partir del peróxido de hidrógeno.⁴⁸

Este es el primer estudio en su género realizado en una población mexicana aparentemente sana en donde podemos observar que se obtienen valores de referencia de los marcadores bioquímicos de estrés oxidativo para esta población. Sin embargo nuestro estudio tiene algunas limitaciones. Una limitación es el no haber controlado la edad, el peso corporal y los niveles de lípidos de la población aparentemente sana incluida, que deberá controlarse en estudios futuros. Sin embargo, el hecho de no haber encontrado diferencias significativas en las concentraciones de los marcadores pro y antioxidantes sugiere que probablemente existen otros factores más relacionados y que probablemente se hacen evidentes cuando el sujeto desarrolla alguna patología.

CONCLUSIONES

Se obtuvieron valores de referencia de normalidad en una población mexicana aparentemente sana para los marcadores pro-oxidante (malondialdehído y productos avanzados de la oxidación proteínas) así como para los marcadores antioxidantes (Glutación y Óxido nítrico).

Estos valores obtenidos de cada uno de los marcadores de estrés oxidativo estudiados no se relacionan con la edad y con el índice de masa corporal lo que sugiere que existen otros factores los cuales pueden alterar dichos valores y son evidentes cuando el sujeto presenta alguna patología.

RECOMENDACIONES

1.- Que cada uno de los Módulos de Atención Preventiva Integral en conjunto con trabajo social y Nutrición establezcan la integración de los pacientes a grupos que promuevan los beneficios de un estilo de vida saludable con una alimentación adecuada ya que esta es la principal vía de ingreso de antioxidantes al organismo, y hacer referencia que la ingesta abundante de lípidos, el alcoholismo y el tabaquismo son factores de riesgo pro-oxidantes.

2.- Se sugiere a la Dirección de la Unidad de Medicina Familiar 80 Morelia Michoacán se gestione la posibilidad de un financiamiento para que los pacientes que cuenten con factores de riesgo cardiovascular, se les realice de manera preventiva la determinación de marcadores de estrés oxidativo ya que puede ser herramienta diagnóstica que contribuya a la prevención y seguimiento de patología cardiovascular, como son la enfermedad coronaria, la hipertensión arterial, las dislipidemias, la aterosclerosis, la diabetes, entre otros.

BIBLIOGRAFÍA

1. Taha R, Seidman E, Mailhot G, Boudreau F, Gendron FP, Beaulieu JF, et al. Oxidative stress and mitochondrial functions in the intestinal Caco-2/15 cell line. *Plos ONE* 2010;5:1-10.
2. Stocker R, Keaney JF Jr. New insights on oxidative stress in the artery wall. *J Thromb Haemost* 2005;3:1825-1834.
3. Pinho RA, Araújo MC, Melo Ghisi GL, Benetti M. Enfermedad arterial coronaria, ejercicio físico y estrés oxidativo. *Arq Bras Cardiol* 2010;94:531-537.
4. Jones DP. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 2006;8:1865-2879.
5. Rodríguez Puyol D, Duque I, Arribas I, Pérez de Lema G, López Ongil S, Rodríguez Puyol M. Papel de los radicales libres en la fisiopatología renal. *Nefrología* 1995;XV(S)1:49-54.
6. Rodríguez Puyol D, Lucio J, Ruiz P, López Ongil S, Iglesias MC, Ruiz Ginés JA, Torrecilla G, Rodríguez Puyol M. Radicales libres y daño glomerular. *Nefrología* 1996;XVI (s 3):29-34.
7. Brahim-Horn MC, Pouysségur J. Oxygen, a source of life and stress. *FEBS Lett* 2007;581:3582-3591.
8. Musante L, Bruschi M, Candiano G, Petretto A, Dimasi N, Del Boccio P, Urbani A, Rialdi G, Ghiggeri GM. Characterization of oxidation end product of plasma albumin "in vivo". *Biochem Biophys Res Commun* 2006;349:668-673.
9. Scott G. Antioxidants in Science, Technology, Medicine and Nutrition. Coll House, UK: Albion Publishing;1997: Chapters 3 and 4.
10. Porter NA. Autoxidation of polyunsaturated fatty acids: Initiation, propagation, and product distribution (basic chemistry). En: Vigo-Pelfrey C, Ed. *Membrane Lipid Oxidation*. Boca Raton, FL: CRC Press 1990:33.
11. Simic M, Karel M. Autoxidation in food and biological systems. New York: Plenum Press, 1980: 17.
12. Martínez G, Popov I, Pérez G, Al Dalaen SM, Horwat R, Giuliani A, et. al. Contribution to characterization of oxidative stress in diabetic patients with macroangiopathic complication. *Acta Farm Bonaerense*, 2005;24:197-203.
13. Nguyen-Khoa T, Massy ZA, Witko-Sarsat V, Canteloup S, Kebede M, Lacour B, Druke T, Descamps-Latscha B. Oxidized low-density lipoprotein induces macrophage respiratory

burst via its protein moiety: A novel pathway in atherogenesis? *Biochem Biophys Res Commun* 1999;263:804-809.

14. Maggi E, Bellazzi R, Falaschi F, Frattoni A, Perani G, Finardi G, Gazo A, Nai M, Romanini D, Bellomo G. Enhanced LDL oxidation in uremic patients: an additional mechanism for accelerated atherosclerosis? *Kidney Int* 1994;45:876-883.

15. Westhuyzen J, Saltissi D, Healy H. Oxidation of low density lipoprotein in hemodialysis patients: effect of dialysis and comparison with matched controls. *Atherosclerosis* 1997;129:199-205.

16. Nguyen-Khoa T, Massy ZA, Witko-Sarsat V, Thevenin M, Touam M, Lambrey G, Lacour B, Drüeke TB, Descamps-Latscha B. Critical evaluation of plasma and LDL oxidant trapping potential in hemodialysis patients. *Kidney Int* 1999;56:747-753.

17. Griending KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: Basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation* 2003;108(16):1912-1916.

18. McGrath L.T , McGleenon B.M., Brennan S, McColl D, McLroy S, Passmore A.P. Increased oxidative stress in Alzheimer's disease as assessed with 4-hydroxynonemal but not malondialdehyde. *Q J Med* 2001;94:485-490.

19. Skrzydlewska E, Sulkowski S, Koda M, Zalewski B, Kanczuga-Koda L, Sulkowska M. Lipid peroxidation and antioxidant status in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2005;11:403-406.

20. Berlett B S and Stadtman E R. Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress. *The J BiolChem* 1997;272:20313-20316.

21. Stadtman E R and Berlett B S. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Drug Metab Rev* 1998;30:225-243.

22. Kim MH, Cho HS, Jung M, Hong MH, Lee SK, Shin BA. Extracellular signal-regulated kinase and AP-1 pathways are involved in reactive oxygen species-induced urokinase plasminogen activator receptor expression in human gastric cancer cell. *Int J Ocol* 2005;26:1669-1674.

23. Lin JT, Wang JS, Jiann BP, Yu CC, Tsai JY, Huang JK, Wu TT. Correlation of p53 protein accumulation and Bcl-2 over expression with histopathological features in prostatic cancer. *J Forms Med Assoc* 2005;104:864-867.

24. Guidi I, Galimberti D, Lonati S, Novembrino C, Bamonti F, Tiriticco M, Venturelli E, et al. Oxidative in balance in patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2006;27:262-269.

25. Leutner S, Schindowski K, Frolich L, Maurer K, Kratzsch T, Echert A, Muller WE. Enhanced ROS-generation in lymphocytes from Alzheimer's patients. *Pharmacopsychiatry* 2005;38:312-315.
26. Marfella R, Quagliario L, Nappo F, Ceriello A, Giugliano D. Acute hyperglycemia induces an oxidative stress in healthy subjects. *The Journal of Clinical Investigation*. 2001;108:635-636.
27. Koska J, Blazícek P, Marko M, Grňa JD, Kvetnanský R, Vígás M. Insulin, catecholamines, glucose and antioxidant enzymes in oxidative damage during different loads in healthy humans. *Physiol Res* 2000;49:95-100.
28. Androulakis N, Durand H, Ninio E, Tsoukatos DC. Molecular and mechanistic characterization of platelet-activating factor-like bioactivity produced upon LDL oxidation. *J Lipid Res* 2005;46:1923-1932.
29. Lankin VZ, Lisina MO, Arzamastseva NE, Konovalova GG, Nedosugova LV, Kaminniy AL, et. al. *Bull Exp Biol Med* 2005;140:41-43.
30. Holvoet P, Mertens A, Verhamme P, Bogaerts K, Beyens G, Verhaeghe R, et al. Circulating Oxidized LDL Is a Useful Marker for Identifying Patients With Coronary Artery Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:844-848.
31. Valabhji J, McColl AJ, Richmond W, Schachter M, Rubens MB, Elkeles RS. Total antioxidant status and coronary artery calcification in type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2001;24:1608-1613.
32. Nguyen-Khoa T, Massy ZA, De Bandt JP, Kebede M, Salama L, Lambrey G, et al. Oxidative stress and haemodialysis: role of inflammation and duration dialysis treatment. *Nephrol Dial Transplant*. 2001;16:335-340.
33. Kim KM, Jung BH, Paeng KJ, Kim SW, Chung BC. Alteration of plasma total F2-isoprostanes before and after hemodialysis in end-stage renal disease patients. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2004;70:475-478.
34. Oberg BP, McMenamin E, Lucas FL, McMonagle E, Morrow J, Ikizler TA, Himmelfarb J. Increased prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease. *Kidney Int* 2004;65:1009-1016.
35. Shida H, Ban K, Matsumoto M, Masuda K, Imanari T, Yamamoto T. Prognostic significance of location of lymph node metastases in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1992;35:1046-1050.
36. Audisio RA, De Braud F, Wils J. Colorectal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 1998;27:139-141.

37. Smith CV. Correlations and apparent contradictions in assessment of oxidant stress status in vivo. *Free Rad Biol Med* 1991;10:217-224.
38. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals, ageing and disease. In: Halliwell B, Gutteridge JMC. Eds. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford: Clarendon Press, 1989:416-508.
39. Henle T, Deppisch R, Beck W, Hergesell O, Hansch GM, Ritz E. Advanced glycated end-products (AGE) during haemodialysis treatment: discrepant results with different methodologies reflecting the heterogeneity of AGE compounds. *Nephrol. Dial. Transplant* 1999;14:1968-1975.
40. Jolivalt C, Leininger-Muller B, Bertrand P, Herber R, Christen Y, Siest G. Differential oxidation of apolipoprotein E isoforms and interaction with phospholipids. *Free Rad Biol Med* 2000;28:129-140.
41. Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application, *Am J Med* 1991;91:S31-S38.
42. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it what do the results mean?. *Br J Pharmacol* 2004;142:231-255.
43. Torres Y, Sierra M, Olivares I, Hicks J. Marcadores plasmáticos de estrés oxidante en población mexicana sana de 31 a 60 años. *REV INST NAL ENF RESP MEX* 2006;19(3):206-213.
44. Cano C, Bermudez V, Sulbaran G, Morales R, Medina M, Amell A, et al. Influencia de la edad y el sexo en el balance oxidación/antioxidación. *AVFT v.* 2001;20(1):63-68.
45. Veglia F, Cighetti G, De Franceschi M, Zingaro L, Boccotti L, Tremoli E. Age- and gender-related oxidative status determined in healthy subjects by means of OXY-SCORE, a potential new comprehensive index. *Biomarkers* 2006;11(6):562-573.
46. Furchgott RF, Zawadzke JV. The obligatory role of endothelial cell in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373-376.
47. Martínez M, Barrado D, Zubillaga M, Hager A, De Paoli T, Conceptos actuales del metabolismo de glutatión utilización de los isotopos estables para le evaluación de su homeostasis. *Acta Bioquim Clin Lationoam* 2006;40(1):45-51.
48. Quintanar M, Calderon J. Capacidad antioxidante total. *REB* 2009; 28(3): 89-101.
49. Cruz J, Licea Puig, Hernández P, Abraham E, Yanes M. Estrés oxidativo y diabetes mellitus. *Rev Mex Patol Clin* 2011;58(1):4-15.

50. Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *JAMA* 2003;289:2560-2572.
51. Ceriello A, Bortolotti N, Motz E, Crescentini A, Lizzio S, Ruso A, et al. Meal-generated oxidative stress in Type 2 diabetic patients. *Diabetes care* 1998;21:1529-1533.
52. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it what do the results mean?. *Br J Pharmacol* 2004;142:231-255.
53. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen Khoa T, Capeillère-Blandin C, Nguyen AT, Canteloup S, et al. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J Immunol* 1998;161(5):2524-2532.

Anexo I

Cronograma de actividades

Actividad	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12
Búsqueda y estudio de la bibliografía	x	X	x	x	X	X	x	x	x	x	x	x
Reclutamiento y toma de muestra		X	x	x	X	X	x	x				
Procesamiento de las muestras en laboratorio			x	x	X	X	x	x	x			
Análisis estadístico									x	x	x	
Redacción del artículo o tesis										x	x	
Presentación del artículo o tesis												x

Caracterización de marcadores bioquímicos de estrés oxidativo

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

UNIDAD DE MEDICINA FAMILIAR NO 80

Protocolo: caracterización de los marcadores bioquímicos de estrés oxidativo en una población mexicana aparentemente sana

Carta de consentimiento informado.

Fecha:

Nombre del participante _____ Edad: _____

Número de afiliación _____ UMF _____

- En pleno uso de mis facultades mentales y en ausencia de engaño, declaro se me ha proporcionado información amplia referente al presente estudio, y se me ha invitado participar informándome que consiste en permitir de muestra sanguínea adicional a las pruebas cruzadas de aproximadamente 10ml, cuando en el área de banco de sangre se me considere apto para donación sanguínea con la finalidad de determinar marcadores que sirvan para establecer sin causa o consecuencias de enfermedades crónicas
- Se realizara en las instalaciones del área de banco de sangre del Hospital General Regional No. 1 IMSS, donde contare con un equipo multidisciplinario y el equipo técnico para asistirme en cualquier momento, de presentarse alguna eventualidad,
- El estudio desde su inicio y hasta la publicación de resultados, tiene interés en la ley general de salud, y el código de Helsinki, con observación en los criterios de no maleficiencia, justicia, y consentimiento informado, así como confidencialidad
- Se ha informado este tipo de investigación está clasificada como: investigación con riesgo mínimo y que el protocolo en ninguno de sus procedimientos atenta contra la integridad física y moral de las personas que se involucren en él.
- El estudio será realizado, y supervisado por un equipo científicamente calificado en la realización de protocolos de investigación, quienes cuentan con un aval institucional y universitario, los cuales estarán bajo vigilancia y sanción del comité de ética local.
- Se me ha orientado para que en caso de querer tratar cualquier asunto relacionado con mi participación pueda dirigirme a la Dra. Brisa Yadira Manjarrez Luciano tel. Celular 4431604898

NOMBRE DEL PARTICIPANTE _____

TELEFONO _____ FIRMA _____

NOMBRE DEL INVESTIGADOR:

Dr. Juan Manuel Gallardo Montoya

Investigador Asociado "B" Unidad de Investigación Médica en Enfermedades nefrológicas, Hospital de Especialidades CMN Siglo XXI.

DRA MANJARREZ LUCIANO BRISA YADIRA

DR. CLETO ALVAREZ AGUILAR

Residente De Medicina Familiar

Maestro en Ciencias/ Medico Familiar HGRNo. 1, IMSS Morelia

