



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
SECRETARIA DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACION
ESPECIALIDAD EN:
MEDICINA DE LA ACTIVIDAD FISICA Y DEPORTIVA

**“ CAMBIOS INDUCIDOS POR EL EJERCICIO AGUDO EN LA
FRAGILIDAD OSMOTICA DEL ERITROCITO Y LA RESPUESTA
LEUCOCITARIA EN SUJETOS CON OBESIDAD TRATADOS
CON VITAMINAS E Y C ”**

T E S I S

PARA OBTENER EL DIPLOMA DE

MEDICO ESPECIALISTA EN:

**MEDICINA DE LA ACTIVIDAD FISICA Y
DEPORTIVA**

P R E S E N T A :

M. C. SALVADOR SANCHEZ SERRANO



PROFESOR TITULAR: M.E. JOSE CLEMENTE IBARRA PONCE DE LEON
PROFESOR ADJUNTO: M. E. JOSE GILBERTO FRANCO SANCHEZ
ASESORES DE TESIS: M en C. ANDREA PEGUEROS PEREZ
M. E. JOSE GILBERTO FRANCO SANCHEZ

MEXICO, D.F.

AGOSTO 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicatoria y Agradecimientos

A Dios, el Juez Justo

A mis padres, Emma y Eliseo

A ti Andrea, por tu tiempo, apoyo y dedicación

***A todos los que contribuyeron en la
terminación del presente trabajo***

***“... mejor es la sabiduría que las piedras preciosas; y todas las cosas que
se pueden desear, no son de comparar con ella”***

Proverbios 8:11

DRA. MATILDE L. ENRIQUEZ SANDOVAL
DIRECTORA DE ENSEÑANZA

DRA. XOCHIQETZAL HERNANDEZ LOPEZ
SUBDIRECTORA DE POSTGRADO Y EDUCACION CONTINUA

DR. LUIS GOMEZ VELAZQUEZ
JEFE DE ENSEÑANZA MEDICA

M.E. JOSE CLEMENTE IBARRA PONCE DE LEON
PROFESOR TITULAR

M.E. JOSE GILBERTO FRANCO SANCHEZ
ASESOR CLINICO

M en C. ANDREA PEGUEROS PEREZ
ASESOR METODOLOGICO

INDICE

	Pág.
1.- ANTECEDENTES	7
2.- JUSTIFICACION	12
3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
4.- HIPOTESIS	14
5.- OBJETIVOS	15
6.- SUJETOS, MATERIALES Y METODOS	16
6.1.- Diseño del Estudio	
6.2.- Sujetos de Estudio	
6.3.- Evaluación Clínica Inicial	
6.4.- Modelo de Ejercicio (Prueba de Esfuerzo)	
6.5.- Grupos de Estudio	
6.6.- Determinación de la Fragilidad Osmótica del Eritrocito	
6.7.- Determinación de α -Tocoferol y Acido Ascórbico	
6.8.- Respuesta Leucocitaria	
6.9.- Análisis Estadístico	
7.- RESULTADOS	20
8.- DISCUSION	27
9.- CONCLUSIONES	32
10.- BIBLIOGRAFIA	33
ANEXO. CONSENTIMIENTO INFORMADO	36

RESUMEN

“CAMBIOS INDUCIDOS POR EL EJERCICIO AGUDO EN LA FRAGILIDAD OSMOTICA DEL ERITROCITO Y LA RESPUESTA LEUCOCITARIA EN SUJETOS CON OBESIDAD TRATADOS CON VITAMINAS E Y C”

Palabras clave: obesidad, fragilidad eritrocitaria, leucocitosis, vitaminas E y C

Introducción. La obesidad afecta las células rojas de la sangre, alterando su función, debido a la peroxidación de los lípidos y las proteínas de la membrana eritrocitaria. Esto disminuye la tasa de flujo sanguíneo, la difusión de oxígeno y su intercambio con los tejidos, reduciendo la cantidad necesaria para el metabolismo aeróbico de la glucosa y ácidos grasos e incrementando el estado hipóxico de las células endoteliales y cardíacas contribuyendo al incremento de la incidencia de patologías cardiovasculares asociadas con la obesidad. Se ha estudiado el efecto del ejercicio agudo en sujetos entrenados y sedentarios no obesos tratados con vitaminas antioxidantes sobre los parámetros hematológicos y de fragilidad eritrocitaria, pero se desconoce la descripción de estos cambios en sujetos con obesidad.

Objetivo. Evaluar el efecto del α -tocoferol y ácido ascórbico sobre los cambios posteriores a una prueba de esfuerzo aeróbica, en los parámetros de fragilidad osmótica del eritrocito y respuesta leucocitaria en sujetos con obesidad.

Métodos. Se llevó a cabo un estudio doble ciego en 10 pacientes con obesidad del género masculino, asignados de forma aleatoria en dos grupos, a quienes se les realizó una prueba de esfuerzo antes y después del tratamiento con α -tocoferol y ácido ascórbico (grupo A) o ácido ascórbico y placebo (grupo B). Se evaluó a un grupo de 5 sujetos sanos para la obtención de datos que pudieran ser considerados como referencia; éste grupo solo fue evaluado al inicio del estudio. Se determinó en tiempos establecidos (0, 2,4 y 6 horas), la fragilidad osmótica del eritrocito (H_{50}), la concentración de vitamina E en suero y membrana del eritrocito, la concentración de vitamina C en suero, así como la respuesta leucocitaria.

Resultados. El valor de H_{50} fue mayor en los sujetos con obesidad vs sanos. La concentración de vitamina E en la membrana del eritrocito fue menor en los sujetos con obesidad vs sanos. A medida que disminuyó la concentración de vitamina E en el eritrocito aumentó la fragilidad osmótica. La respuesta leucocitaria fue mayor en los obesos vs sanos. Después del tratamiento el grupo A vs el grupo B, tuvo una disminución significativa de H_{50} . Ambos grupos presentaron una disminución en la respuesta leucocitaria después del tratamiento.

Conclusiones. La administración conjunta de vitamina E y C por tres semanas disminuye la fragilidad osmótica del eritrocito y la respuesta inflamatoria en sujetos con obesidad posterior al ejercicio agudo.

1. ANTECEDENTES

1.1 Obesidad, Estrés Oxidativo y Alteraciones Hematológicas

La obesidad se ha descrito como una enfermedad inflamatoria crónica relacionada con la hipoperfusión e hipoxia del tejido adiposo, que ocasiona alteraciones en la señalización de diferentes adipocinas y que favorece la resistencia a la insulina, la gluconeogénesis, la lipotoxicidad y el estrés oxidativo.

El estrés oxidativo en los pacientes con obesidad es resultado del desequilibrio entre los procesos oxidantes y antioxidantes. Las especies reactivas de oxígeno (ERO) se forman en la membrana interna de la mitocondria. Estos radicales libres pueden iniciar una serie de reacciones en cadena en los ácidos grasos de los fosfolípidos, dando lugar a la peroxidación de los lípidos de membrana, dañando la organización de la bicapa lipídica e inactivando enzimas y otras funciones celulares ^(1,2).

En la sangre, especialmente en los eritrocitos, las ERO se generan de manera permanente durante el transporte de oxígeno. Si bien los eritrocitos están protegidos por un eficiente sistema antioxidante, en situaciones en las que existe un aumento de especies reactivas de oxígeno, el sistema de protección puede ser sobrepasado y ocasionar daño celular. Por ello, éste tipo de célula es frecuentemente utilizada como modelo en los estudios *in vivo* sobre la respuesta antioxidante al estrés oxidativo.

En relación con lo anterior, se ha descrito que los lípidos y proteínas de la membrana eritrocitaria son peroxidados en correlación con el grado de obesidad debido a la disminución en los niveles de antioxidantes membranales y el grado de poliinsaturación lipídica. Estos factores sumados a la mayor rigidez de la membrana eritrocitaria por aumento en el contenido de colesterol, pueden ocasionar alteraciones como disminución de la tasa de flujo sanguíneo, interferencia con la difusión de oxígeno y su intercambio tisular; situación que contribuye con la hipoxia presente en el tejido adiposo y que reduce el oxígeno necesario para el metabolismo aeróbico de los ácidos grasos y de la glucosa, incrementa el estado hipóxico de las células endoteliales y cardíacas, favoreciendo la incidencia de patologías cardiovasculares asociadas con la obesidad ⁽³⁾.

1.2 Ejercicio Agudo y Alteraciones Hematológicas

Se ha documentado el efecto agudo del ejercicio sobre los elementos formes de la sangre, cuando se realiza una prueba de esfuerzo máxima tanto aeróbica como anaeróbica en individuos entrenados y sedentarios no obesos. En estos últimos, se reportaron alteraciones tales como aumento de la viscosidad, aumento de la fragilidad osmótica, disminución de la deformabilidad eritrocitaria con la consecuente hemólisis intravascular y disminución en el número de células rojas. Los cambios aparecieron desde las 2 horas y persistieron de 12 a 24 horas posteriores a la prueba de esfuerzo ^(4, 5).

Es importante mencionar que los cambios ocasionados por el ejercicio sobre las propiedades mecánicas del eritrocito y el aumento en la viscosidad sanguínea que interfieren con el flujo en la microcirculación, representan un factor de riesgo independiente de enfermedad cardiovascular ⁽⁶⁾.

Además, el eritrocito también funciona como un sensor de O₂, que contribuye en la regulación del flujo muscular y el transporte de O₂ por la liberación de ATP y juega un papel importante en el control del tono vascular, por lo que las alteraciones en su membrana interfieren con esta función ⁽⁷⁾.

La modificación en la reología y función eritrocitarias son reversibles, sin embargo, la persistencia de estas alteraciones pueden modificar anormalmente la perfusión tisular principalmente en vasos que tienen una reserva de flujo limitado como en la circulación coronaria y que se relaciona con problemas cardiovasculares durante el período temprano y tardío de la recuperación después del ejercicio ⁽⁵⁾.

Por otra parte, también se ha reportado que el ejercicio agudo ocasiona una respuesta inflamatoria representada por un aumento en el número de leucocitos. A este respecto se reportó en un grupo de sedentarios sin obesidad, que el conteo de leucocitos aumentó significativamente 2 horas después del ejercicio aeróbico y permaneció elevado a las 4, 8 y 12 horas posteriores. El conteo diferencial de estas células mostró aumento significativo de granulocitos a las 2 horas postejercicio con retorno a niveles basales a las 8 horas ⁽⁵⁾.

Los autores mencionan que la leucocitosis posterior al ejercicio representa una verdadera leucocitosis inducida por una respuesta inflamatoria y el estallido respiratorio de los granulocitos, tal como se observa en condiciones fisiopatológicas como la sepsis. La respuesta leucocitaria en este estudio se relacionó directamente con el aumento en la peroxidación (por aumento del estrés oxidativo) de los lípidos de membrana del eritrocito y las alteraciones en su deformabilidad y viscosidad ^(5, 8).

1.3 Sistema Antioxidante

Para contrarrestar el efecto adverso que los radicales libres pueden ocasionar a nivel celular, el organismo cuenta con un sistema antioxidante que depende tanto de la producción de enzimas endógenas como glutatión y superóxido dismutasa o catalasa, como de la adquisición a través de la dieta, de compuestos antioxidantes como la vitamina E (α -tocoferol), la vitamina C (ácido ascórbico) y la vitamina A (retinol) ⁽⁹⁾.

Tanto las fuentes endógenas como las exógenas de antioxidantes, se ven influenciadas por el estado nutricional y el estilo de vida, pudiendo modificarse en situaciones patológicas como la obesidad.

El ácido ascórbico es un antioxidante hidrosoluble que se encuentra en el citosol y el fluido extracelular que interactúa con el radical superóxido y el radical hidroxilo en fase acuosa, principalmente en el plasma, previniendo el daño a la membrana eritrocitaria ⁽¹⁰⁾. El ascorbato (forma reducida del ácido ascórbico) es el donador de electrones más importante para la transferencia trans-membrana en los eritrocitos y la regeneración de ascorbato a partir del radical ascorbilo inmediatamente después de la generación de este último, tiene sentido para la economía del ascorbato en el eritrocito. También actúa como antioxidante del α -tocoferoxil (producto oxidado del α -tocoferol) al reducirlo a α -tocoferol ⁽¹¹⁾.

Se ha observado que la administración única de vitamina C presenta efecto antioxidante en diversos procesos biológicos incluidos los involucrados a nivel de membranas celulares. Sin embargo, éste efecto se ve favorecido por la participación de otros compuestos antioxidantes como la vitamina E, la cual da como resultado un efecto aditivo (sinergismo) a la cascada de secuencia de reacciones óxido-reductoras que protegen al organismo de los efectos de los radicales libres ^(12,13).

El α -tocoferol es un compuesto lipofílico localizado en la membrana celular y es particularmente efectivo en neutralizar radicales libres originados en la membrana interna de la mitocondria y otras biomembranas ⁽¹⁰⁾. Protege contra la lipoperoxidación al actuar directamente con una variedad de sustancias reactivas de oxígeno, los productos de lipoperoxidación y el radical superóxido para formar un radical tocoferol relativamente inocuo ⁽⁹⁾.

El efecto antioxidante de la vitamina E, se ha reportado con dosis que oscilan desde 70 a 1000 mg y se recomienda que cuando se prescriban dosis por arriba

de 140 mg al día, se coadministre vitamina C la cual regenera al tocoferol a partir de α -tocoferoxil como se mencionó anteriormente ⁽¹⁴⁾.

Con lo que respecta al tiempo de administración, se ha reportado que las propiedades antioxidantes de la vitamina E en el eritrocito pueden observarse a partir de dos semanas de administración en pacientes sanos a una dosis de 500 mg/día ⁽¹⁵⁾.

Si bien la vitamina C y E tienen un efecto sinérgico como agentes antioxidantes en la membrana eritrocitaria, la vitamina E es la de mayor importancia dada su característica lipofílica y es probablemente la única que actúa como antioxidante a nivel membranar ⁽¹⁶⁾.

De los carotenoides, el β -caroteno es el neutralizador más eficiente de los radicales peroxilo y 1O_2 desencadenadores de la lipoperoxidación. Por vía metabólica es precursor de la vitamina A o retinol que contribuye en la función del sistema antioxidante ⁽⁹⁾.

1.4 Ejercicio Agudo, Alteraciones Hematológicas y Antioxidantes

Los efectos de algunas de las sustancias antioxidantes ya han sido estudiados. Senturk Umit *et al*, reportaron los efectos de las vitaminas antioxidantes sobre los parámetros hematológicos, hemorreológicos y las alteraciones oxidativas posteriores a una prueba de esfuerzo aeróbica máxima, en individuos entrenados y sedentarios no obesos. En el grupo de sedentarios, el conteo de granulocitos aumentó a las 2 horas, la lipoperoxidación en los eritrocitos aumentó significativamente a las 12 horas y retornó a niveles basales a las 24 horas; la deformabilidad eritrocitaria disminuyó significativamente a las 2 horas, mientras que la agregabilidad aumentó a las 8 horas y permaneció así al menos 24 horas respecto de los valores basales ⁽⁸⁾.

En el mismo grupo de pacientes Senturk Umit *et al* reportaron la contribución del estrés oxidativo inducido por el ejercicio sobre la hemólisis. Los eritrocitos del grupo de pacientes sedentarios presentaron aumento de la fragilidad osmótica 24 horas posteriores al ejercicio agudo, disminución de la deformabilidad eritrocitaria a las 2 y 24 horas posteriores; la concentración plasmática de hemoglobina aumentó, mientras que la de haptoglobina disminuyó a las 24 horas, tal como se observa en la hemólisis intravascular. El tratamiento con vitaminas A, C y E durante dos meses mostró su efectividad al eliminar todas estas alteraciones agudas en este grupo. También la actividad de la glutatión peroxidasa tuvo un

aumento significativo y se presentó una disminución significativa en el porcentaje de hemólisis inducida por H_2O_2 , después del tratamiento ^(4, 8).

Finalmente, se puede comentar que la conjunción de obesidad, estrés oxidativo y ejercicio, alteran de manera importante los mecanismos de citoprotección antioxidante en el eritrocito y exacerbaban la respuesta inflamatoria que habitualmente se observa cuando se realiza ejercicio agudo ⁽¹⁷⁾.

1.5 Epidemiología de la Obesidad

La obesidad es un grave problema de salud pública que se relaciona con el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas.

De acuerdo a los datos de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006 (ENSANUT 2006), el 69.3% de la población mexicana mayor de 20 años tiene sobrepeso u obesidad considerando el índice de masa corporal (IMC).

La prevalencia de obesidad es de 24.2% en hombres y 34.5% en mujeres mientras que el sobrepeso corresponde 42.5% y 37.4% respectivamente.

La ENSANUT 2006 también mostró que la circunferencia de cintura de acuerdo a los puntos de corte del III Panel de Expertos del Programa Nacional de Educación sobre la Detección, Evaluación y Tratamiento del Colesterol Alto en Sangre del Adulto (NCEP III), es de 24.1% para hombres y 61.9% para mujeres mientras que con los criterios de la Secretaría de Salud, aumenta a 83.6% en hombres y 24.1% en mujeres en el grupo de edad mayor de 20 años; esto significa que el acumulo de tejido adiposo predomina en la parte superior del cuerpo ⁽¹⁸⁾.

1.6 Tratamiento de la Obesidad

El tratamiento de los pacientes con obesidad comienza con cambios en el estilo de vida y puede incluir farmacoterapia o cirugía.

La intervención en el estilo de vida comprende manejo nutricional, intervención conductual y ejercicio ⁽¹⁹⁾.

Con respecto a la prescripción de ejercicio, la determinación del consumo de oxígeno es de suma importancia, ya que a partir de la capacidad funcional (integración de los sistemas que suministran, transportan, entregan y utilizan el oxígeno) del paciente, se determinará la dosificación de ejercicio que le origine beneficios con los menos riesgos posibles ^(20, 21, 22).

2. JUSTIFICACION

Los factores inherentes a la obesidad alteran el sistema antioxidante, exacerbando la respuesta inflamatoria y causan alteraciones en la reología del eritrocito en sujetos que padecen esta patología, aumentando el riesgo de presentar un evento cardiovascular cuando realizan ejercicio. De esta manera, resulta importante evaluar si el tratamiento con α -tocoferol y ácido ascórbico atenúa estas respuestas con la finalidad de considerar su prescripción dentro de las primeras etapas del entrenamiento, tomando en cuenta que el ejercicio aeróbico es una intervención necesaria para el tratamiento de los sujetos con obesidad.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El tratamiento con vitaminas antioxidantes atenúa los cambios en los parámetros de fragilidad osmótica del eritrocito y la respuesta leucocitaria que se presentan posteriores al esfuerzo agudo en sujetos sanos y entrenados. Sin embargo no se ha evaluado el efecto que presenta el tratamiento específico con α -tocoferol y ácido ascórbico sobre estos parámetros en sujetos con obesidad, lo cual incidiría en la prescripción del ejercicio en este tipo de población.

4. HIPOTESIS

El tratamiento conjunto de α -tocoferol y ácido ascórbico, reduce las alteraciones en la fragilidad osmótica del eritrocito y la respuesta leucocitaria, que se presentan posteriores a una prueba de esfuerzo aeróbica en sujetos con obesidad, comparado con el tratamiento único de ácido ascórbico.

5. OBJETIVOS

5.1 General

Evaluar el efecto del α -tocoferol y ácido ascórbico sobre los cambios posteriores a una prueba de esfuerzo aeróbica, en los parámetros de fragilidad osmótica del eritrocito y respuesta leucocitaria en sujetos con obesidad.

5.2 Específicos

5.2.1 Describir y comparar los cambios que se presentan, posteriores a una prueba de esfuerzo aeróbica, en los parámetros de fragilidad osmótica del eritrocito y respuesta leucocitaria en sujetos con obesidad y en sujetos sanos.

5.2.2 Evaluar y comparar el efecto tres semanas de tratamiento con α -tocoferol y ácido ascórbico o ácido ascórbico y placebo, sobre los cambios posteriores a una prueba de esfuerzo, en los parámetros antes mencionados en sujetos con obesidad.

5.2.3 Evaluar la posible relación entre las concentraciones de α -tocoferol (en suero y en la membrana del eritrocito) con respecto a los cambios observadas en las variables estudiadas en ambos grupos con obesidad.

6. SUJETOS, MATERIALES Y METODOS

6.1 Diseño del Estudio

Se llevó a cabo un estudio doble ciego en pacientes con obesidad del género masculino, asignados de forma aleatoria en dos grupos, a quienes se les realizó una prueba de esfuerzo antes y después del tratamiento con α -tocoferol y ácido ascórbico o ácido ascórbico y placebo.

6.2 Sujetos de Estudio

Los sujetos fueron captados en el servicio de Medicina del Deporte del Instituto Nacional de Rehabilitación (INR) y cumplieron con los siguientes criterios: edad de 20 a 35 años, sedentarios, residentes del Distrito Federal, índice de masa corporal (IMC) ≥ 30 kg/m² y ≤ 35 kg/m² (Obesidad Grado I de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud -OMS-), no fumadores, que no hubiesen consumido vitaminas antioxidantes o multivitamínicos 6 meses previos a su participación en éste estudio.

No fueron elegibles aquellos sujetos que se conocieran con hipersensibilidad a los componentes de la fórmula de vitamina E o C, que tuvieran diagnóstico de diabetes mellitus 2, hipertensión arterial, enfermedad cardíaca, renal, hepática o hematopoyética, que estuviesen bajo tratamiento farmacológico para bajar de peso o por otra índole; que presentaran patología músculo-esquelética que les impidiera realizar la prueba de esfuerzo o que tardara más de 15 días en sanar y que tuvieran contraindicaciones absolutas y relativas para la realización de prueba de esfuerzo de acuerdo a lo establecido por el Colegio Americano de Medicina del Deporte (ACSM por sus siglas en inglés).

Fueron eliminados los sujetos que no acudieron al total de las evaluaciones programadas o quienes no cumplieron con el 90% del tratamiento.

Todos los sujetos fueron informados sobre el propósito, los procedimientos, intervenciones y posibles riesgos que implicaba el estudio. Se consideró la participación voluntaria del sujeto mediante la firma de la carta de consentimiento informado. El estudio fue aprobado por el Comité de Investigación del INR.

6.3 Evaluación Clínica Inicial

A todos los sujetos se les realizó historia clínica, exploración física, toma de signos vitales, antropometría y plicometría para determinar el porcentaje de grasa corporal utilizando las fórmulas de Siri y Durning-Womersley^(23, 24). También se les realizó un electrocardiograma en reposo y se tomaron muestras sanguíneas en ayuno para determinación de glucosa, colesterol, triglicéridos, HDL y LDL.

6.4 Modelo de Ejercicio (Prueba de Esfuerzo Aeróbica)

Todos los sujetos realizaron prueba de esfuerzo en banda sin fin (Q710, Quinton instruments co. Bothell, WA USA), utilizando el protocolo de Bruce Modificado. Se registró el trazo electrocardiográfico de manera continua y se tomó la presión arterial con esfigmomanómetro de mercurio 10 segundos antes de cada etapa. El criterio de máximo esfuerzo se estableció cuando el sujeto alcanzó al menos el 85% de la frecuencia cardiaca máxima predicha por fórmula de Tanaka^(21, 25) y mediante la escala de esfuerzo percibido por el sujeto. Al finalizar la prueba se calculó el consumo máximo de oxígeno relativo ($VO_{2\text{ máx}}$ mL·min⁻¹·kg⁻¹).

Antes y después de la prueba de esfuerzo se tomaron muestras sanguíneas de la vena antecubital derecha para la determinación de la fragilidad osmótica del eritrocito, biometría hemática diferencial y niveles de α -tocoferol y ácido ascórbico en suero y α -tocoferol en la membrana del eritrocito.

La primera muestra (T0) se tomó 10 minutos antes de iniciar la prueba. La segunda muestra (T1) a los 5 minutos después de transcurridos 5 minutos de recuperación. Las muestras subsecuentes se tomaron a las 2, 4 y 6 horas después de finalizada la prueba de esfuerzo y correspondieron a los tiempos T2, T3 y T4 respectivamente. Todas las muestras se obtuvieron con el sujeto sentado. Para colectarlas, se utilizaron tubos Vacutainer con heparina de sodio y con EDTA. Las muestras para la determinación de α -tocoferol y ácido ascórbico se transportaron en un contenedor especial a una temperatura de 4 a 6 °C al Laboratorio Nacional de Prevención y Control del Dopaje de la Comisión Nacional de Cultura Física y Deporte (CONADE). Todas las muestras fueron procesadas el mismo día.

6.5 Grupos de Estudio

Después de la prueba de esfuerzo los sujetos fueron divididos en dos grupos. El grupo A recibió tratamiento con ácido ascórbico (vitamina C) 1000 mg/día (tabletas efervescentes, Laboratorios Roche) y 800 mg/día de α -tocoferol (vitamina E)

divididos en dos tomas de 400 mg cada 12 horas (cápsulas, Laboratorios Gelcaps), mientras que el grupo B recibió ácido ascórbico 1000 mg/día (tabletas efervescentes, Laboratorios Roche) y placebo cada 12 horas (cápsulas, Laboratorios Gelcaps).

El tratamiento tuvo una duración de tres semanas para ambos grupos. Todos los sujetos realizaron una segunda prueba de esfuerzo como se describió anteriormente al término de las tres semanas. El apego al tratamiento se evaluó mediante la diferencia en la cantidad de tabletas y cápsulas entregadas y presentadas por el sujeto en la consulta de seguimiento.

Con la finalidad de valorar los cambios observados antes y después de la intervención en los grupos de estudio, se evaluó a un grupo de cinco sujetos del género masculino, sedentarios, no obesos, sin problemas de salud diagnosticados hasta el momento del estudio. A este grupo de sujetos sanos se les realizaron todas las pruebas descritas para los pacientes con obesidad antes del tratamiento. Los datos solo se consideraron con fines de referencia.

6.6 Determinación de la Fragilidad Osmótica del Eritrocito

La fragilidad osmótica se determinó en los tiempos T0 a T4, utilizando el método de Beutler y referido por Senturk ^(4, 26). Brevemente, se tomaron 50 μ L de sangre total heparinizada perfectamente mezclada y se agregaron a tubos que contenían solución de cloruro de sodio (NaCl) en diferentes concentraciones (pH 7.4, NaCl%; 0, 0.3, 0.35, 0.40, 0.45, 0.50, 0.55, 0.60, 0.75 0.90). Los tubos se mezclaron de manera gentil y se incubaron a temperatura ambiente por 30 minutos. Después, se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 minutos y se tomó la lectura del sobrenadante en un espectrofotómetro (RA-50 de Bayer Diagnostic, Ltd Sword Co. Dublin Ireland) a 546 nm. La hemólisis en cada tubo se expresó como una cifra porcentual, tomando como 100% el valor máximo de absorbancia del tubo con agua destilada (0% de concentración de NaCl). La concentración a la que se presentó el 50% de hemólisis (H_{50}) se calculó a partir de los porcentajes de hemólisis en las diferentes concentraciones de NaCl mediante ajuste de la curva obtenida con el programa de GraphPad Prism 5.0.

6.7 Determinación de α -Tocoferol y Acido Ascórbico

Los niveles α -tocoferol y ácido ascórbico se midieron en T0 y T1; las muestras de sangre se colectaron en tubos con heparina y se conservaron a temperatura de 4 a 6 °C, hasta su análisis. El suero se separó del paquete celular por centrifugación

y se depositó en microviales. El paquete celular se lavó 3 veces con solución de NaCl 0.9 %, centrifugando a 2500 rpm durante 7 minutos y eliminando el sobrenadante con ayuda de pipeta Pasteur; se preparó una solución al 50% (v:v), utilizando como diluyente solución salina y se conservó en microviales. Posteriormente se realizó extracción, derivación y análisis de α -tocoferol y ácido ascórbico en suero, así como la extracción de α -tocoferol en eritrocitos de acuerdo a los métodos descritos para tal propósito ^(15, 27, 28).

El análisis para la cuantificación de vitaminas se realizó por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (Cromatógrafo de gases modelo 6890 acoplado a espectrómetro de masas modelo 5973 de Agilent Technologies, USA).

6.8 Respuesta Leucocitaria

La cuantificación de leucocitos se obtuvo de T0 a T4, y se determinó mediante biometría hemática utilizando el método establecido para tal efecto en el laboratorio central del INR (Hematology System, Adnia 120, Siemens, USA).

6.9 Análisis Estadístico

Los valores se expresaron como promedio \pm error estándar (ES). La comparación entre los grupos de tratamiento y de referencia se realizó mediante ANOVA simple con prueba *post hoc* de Tukey. Las comparaciones entre los grupos de estudio A y B, se realizaron mediante t de Student. Se estableció que existía diferencia estadística cuando el valor de $p < 0.05$ a un nivel de confianza del 95%.

Se evaluaron correlaciones entre las variables concentración de vitaminas y H_{50} a los tiempos T0 y T1, antes y después del tratamiento, mediante correlación de Pearson. Se consideró una correlación significativa cuando el valor de $p < 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1 Características Clínicas de los Sujetos de Estudio

Participaron doce sujetos con obesidad, de los cuales dos fueron eliminados por no haber acudido a la segunda evaluación; los diez restantes completaron el estudio con un apego del 98% en la ingesta del tratamiento. Los cinco sujetos sanos cumplieron con todas las evaluaciones programadas.

El total de los sujetos con obesidad y los sujetos sanos completaron la prueba de esfuerzo sin ningún problema.

Se observaron algunas diferencias entre las características clínicas de los sujetos con obesidad y el grupo de sanos, las cuales se indican en la *Tabla 1*. La edad y peso fueron menores en el grupo de sanos comparados con los grupos de sujetos con obesidad. Hubo diferencia entre los grupos con obesidad y el de sanos con respecto a IMC, porcentaje de grasa corporal y el perímetro de cintura; los valores fueron significativamente menores en el grupo de sujetos sanos ($p < 0.01$).

La prueba de esfuerzo fue máxima (85% de la FCMP) tanto en los grupos A y B como en el grupo de sanos; no hubo diferencia entre grupos. Sin embargo, el VO_2 máx relativo fue significativamente mayor en el grupo de sanos en comparación con los sujetos obesos. Los sujetos sanos presentaron concentraciones de HDL significativamente mayores que los pacientes con obesidad.

Tabla 1. Características clínicas de los sujetos con obesidad grupo A (ácido ascórbico y α -tocoferol), grupo B (ácido ascórbico y placebo) y sujetos sanos.

	A	B	Sanos
Edad (años)	31.2 ± 2.70	32.2 ± 2.35*	23.6 ± 0.97
Peso (Kg)	88.4 ± 5.31	91.4 ± 6.08*	71.7 ± 2.40
Talla (m)	1.7 ± 0.01	1.7 ± 0.03	1.7 ± 0.01
IMC (Kg·m ⁻²)	31.6 ± 1.48 [‡]	31.2 ± 0.84 [‡]	24 ± 0.50
Perímetro de cintura (cm)	104.2 ± 4.68 [‡]	106.6 ± 3.87 [‡]	81.5 ± 2.90
Grasa corporal (%)	29.6 ± 1.16*	31.6 ± 0.74 [‡]	22.6 ± 1.93
Glucosa (mg·dL ⁻¹)	82.6 ± 4.22	97 ± 7.79	85.2 ± 1.09
Colesterol Total (mg·dL ⁻¹)	173.8 ± 8.06	184 ± 14.89	136.6 ± 12.50
Triglicéridos (mg·dL ⁻¹)	63.6 ± 10.20	229 ± 71.41	80.3 ± 16.04
LDL (mg·dL ⁻¹)	130.5 ± 8.02	111.5 ± 22.78	84.6 ± 10.98
HDL (mg·dL ⁻¹)	30.5 ± 1.49*	26.7 ± 0.76 [‡]	37.9 ± 2.68
VO_2 máx (mL·min ⁻¹ ·Kg ⁻¹)	37.5 ± 2.32 [‡]	37.5 ± 2.31 [‡]	52 ± 3.23
FCMP alcanzada (%)	93.2 ± 2.48	93 ± 2.22	93 ± 3.56

Valores expresados como promedio ± ES, IMC: índice de masa corporal, VO_2 máx: consumo máximo de oxígeno, FCMP: frecuencia cardiaca máxima predicha. * $p < 0.05$, [‡] $p < 0.01$ diferencia con respecto al grupo de sanos.

7.2 Alteraciones en la Fragilidad Osmótica del Eritrocito

Antes del tratamiento, la fragilidad osmótica del eritrocito (H_{50}) en el grupo de sanos fue menor a la que presentó el conjunto de sujetos con obesidad, sin ser ésta significativa. (Datos no presentados)

Al comparar el valor de H_{50} entre los grupos A y B antes del tratamiento, el comportamiento fue homogéneo en los diferentes tiempos; sin embargo después de tres semanas de tratamiento, la comparación de los grupos mostró que el grupo A presentó una disminución significativa de la fragilidad osmótica, en los tiempos T0 a T2 (*Figura 1*, $p < 0.05$).

7.3 Determinación de la Concentración de α -Tocoferol y Acido Ascórbico

La determinación de vitaminas se presenta en la *Tabla 2*. Se muestran los valores de los sujetos sanos solo con fines de referencia. Antes del tratamiento, no hubo diferencias en la concentración de ácido ascórbico, entre el grupo de sanos y los sujetos con obesidad (A y B).

Tabla 2. Concentraciones de ácido ascórbico y α -tocoferol en sujetos con obesidad (A y B) antes y después del tratamiento. Comparación con sujetos sanos.

Vitaminas ($\mu\text{mol/L}$)	Antes del tratamiento		Después del tratamiento		Sanos
	A	B	A	B	
Ac. A suero	122.9 \pm 17.25	115.5 \pm 10.78	176.7 \pm 22.21	183.8 \pm 11.93	131.3 \pm 8.45
α T suero	14.1 \pm 1.10	16.1 \pm 1.64*	29.4 \pm 2.16 [‡]	16.3 \pm 1.28 [‡]	11.1 \pm 0.91
α T eritrocito	2.73 \pm 0.20 [‡]	2.7 \pm 0.07 [‡]	5.3 \pm 0.29	2.7 \pm 0.09 [‡]	4.6 \pm 0.36

Valores expresados como promedio \pm ES, A: Tratamiento con ácido ascórbico (Ac. A) y α -tocoferol (α T), B: Tratamiento con ácido ascórbico (AA) y Placebo. * $p < 0.05$, [‡] $p < 0.01$ diferencia con respecto al grupo de sanos.

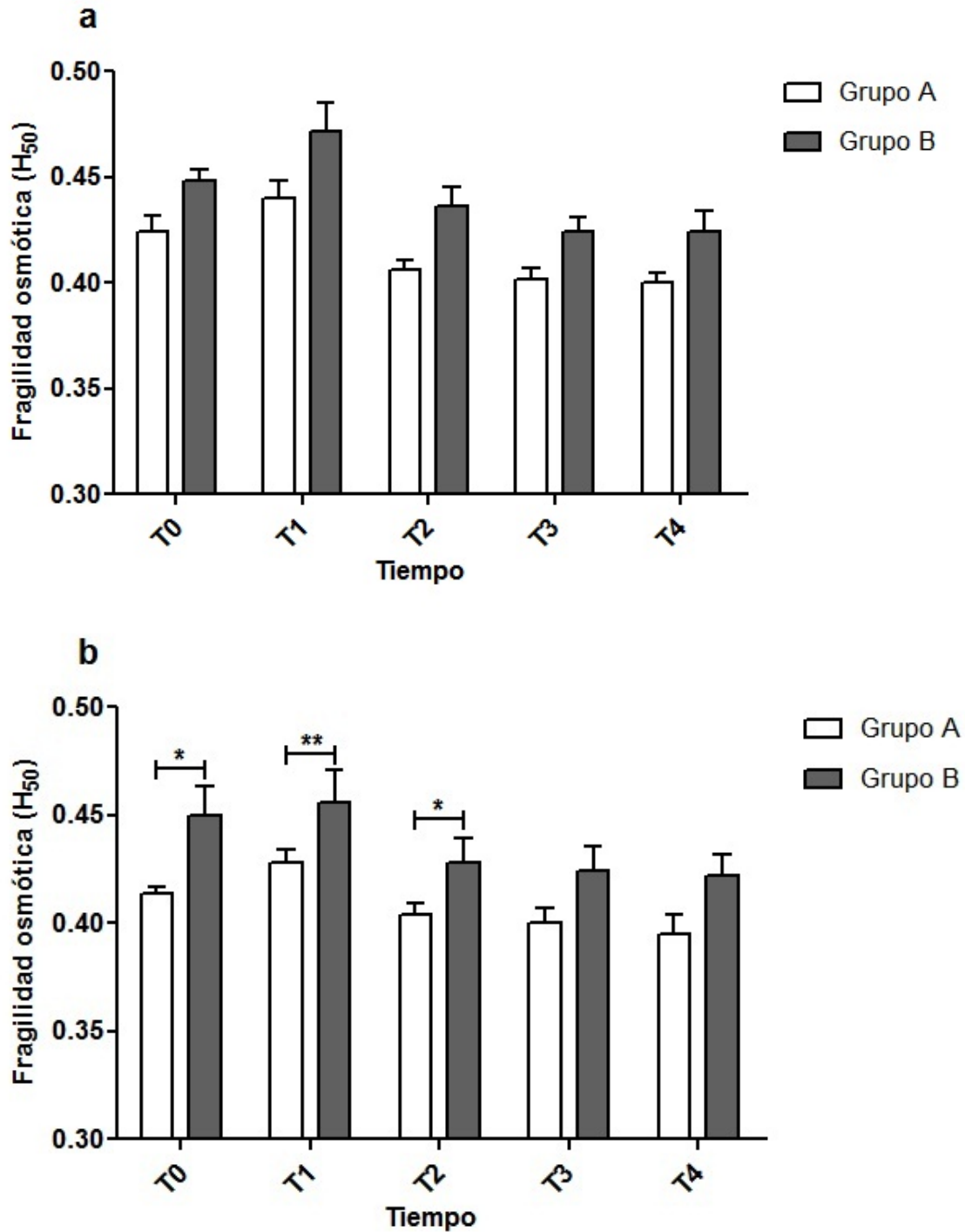


Figura 1. Fragilidad osmótica en sujetos con obesidad con respecto al tiempo (T 0,1,2,3,4: tiempo basal, post-esfuerzo, 2, 4 y 6 horas respectivamente); a. Antes del tratamiento, b. Después del tratamiento; Grupo A: tratamiento con ácido ascórbico y α -tocoferol; Grupo B: tratamiento con ácido ascórbico y placebo; H₅₀: concentración de NaCl en la que se presenta el 50% de hemólisis. Valores expresados como promedio \pm ES. * $p < 0.05$, diferencia A vs B.

Es interesante resaltar que la concentración de α -tocoferol en suero, antes del tratamiento, en los grupos de sujetos con obesidad (A y B) es mayor que lo observado en el grupo de sujetos sanos (14.1 ± 1.10 , 16.1 ± 1.64 vs 11.1 ± 0.91 , respectivamente), mientras que en eritrocito los sanos presentan una concentración significativamente mayor de α -tocoferol que los sujetos con obesidad (4.6 ± 0.36 vs 2.73 ± 0.20 A, 2.7 ± 0.07 B; $p < 0.01$).

Después del tratamiento el nivel de α -tocoferol en suero fue significativamente mayor en el grupo A, comparado con el grupo de sujetos sanos (29.4 ± 2.16 vs 11.1 ± 0.91 ; $p < 0.01$). El aumento en la concentración sérica de α -tocoferol influyó en la concentración que se presentó en la membrana del eritrocito, la cual alcanzó la concentración promedio observada en los sujetos sanos (5.3 ± 0.29 vs 4.6 ± 0.36). En el grupo B no se presentaron cambios.

Los niveles de ácido ascórbico después del tratamiento aumentaron en ambos grupos con obesidad pero no se observó diferencia significativa en relación con el grupo de sanos.

7.4 Respuesta Leucocitaria

Antes del tratamiento los sujetos con obesidad (A y B) presentaron un aumento significativo de los leucocitos en T1 con respecto a su valor en T0 (*Figura 2*, $p < 0.05$). Se observó un comportamiento similar en el grupo de sujetos sanos, sin que esto alcanzara un nivel estadísticamente significativo (valores presentados solo con fines de referencia).

La respuesta leucocitaria obtenida en T1 en los grupos A y B, disminuyó después del tratamiento y cuando se comparó con el grupo de sujetos sanos no se obtuvieron diferencias significativas.

El conteo de leucocitos de los sujetos de los grupos A y B presentó una tendencia más tardía para regresar a su nivel basal comparado con los sujetos sanos, aún después del tratamiento y se observó una tendencia al incremento de estas células a partir de las dos horas.

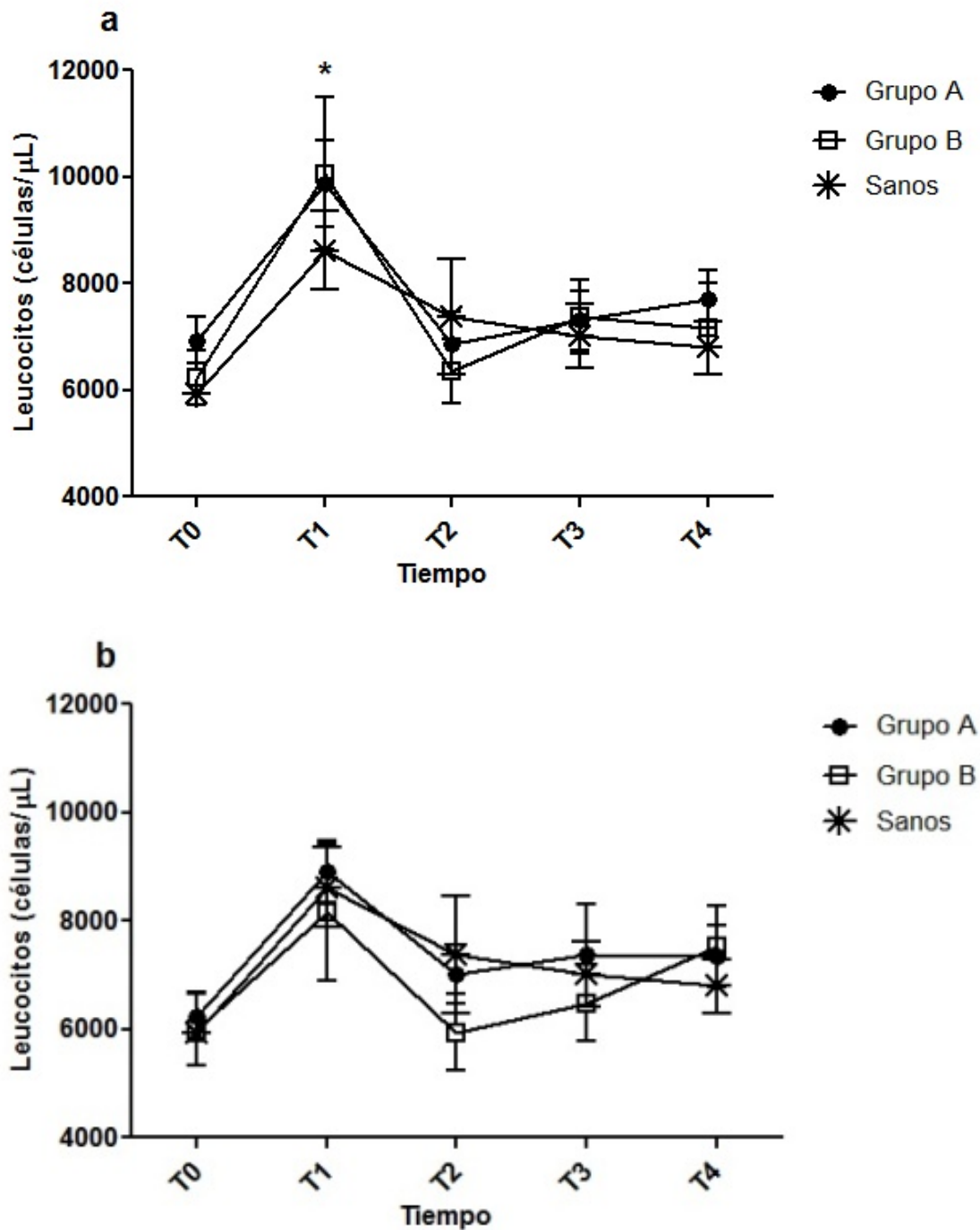


Figura 2. Cantidad de leucocitos en sujetos con obesidad con respecto al tiempo (T 0,1,2,3,4: tiempo basal, post-esfuerzo, 2, 4 y 6 horas respectivamente); a. Antes del tratamiento, b. Después del tratamiento. Grupo A: tratamiento con ácido ascórbico y α -tocoferol; Grupo B: tratamiento con ácido ascórbico y placebo; datos de sujetos sanos presentados con fines de referencia. Valores expresados como promedio \pm ES. * $p < 0.05$, diferencia de los grupos A y B, respecto de T0.

La *Figura 3*, muestra el aumento en el porcentaje de neutrófilos; antes y después del tratamiento se observó un aumento no significativo a las dos horas (T2) en los grupos A y B respecto a su valor basal. El grupo de sujetos sanos presentó un aumento no significativo del porcentaje de neutrófilos a las cuatro horas (valores presentados solo con fines de referencia).

Al comparar el aumento de los neutrófilos entre grupos antes del tratamiento, el porcentaje fue mayor en el grupo de sujetos sanos a las cuatro horas (T3), que en los grupos A y B ($p < 0.05$). Después del tratamiento el comportamiento del grupo A permaneció sin cambio, mientras que el grupo B tuvo una tendencia a la disminución desde T2.

7.5 Relación entre las Concentraciones de α -Tocoferol en Suero y Eritrocito respecto a la Fragilidad Osmótica (H_{50})

Antes del tratamiento, se encontró una correlación positiva ($r = 0.710$; $p < 0.05$) entre la concentración de α -tocoferol en suero y H_{50} en el tiempo basal (T0). Esta correlación fue mayor inmediatamente después del esfuerzo (T1) ($r = 0.807$; $p < 0.005$).

Después del tratamiento hubo una correlación positiva ($r = 0.772$; $p < 0.009$) entre la concentración de α -tocoferol en suero y α -tocoferol en eritrocito en T0. A su vez, el aumento de la concentración de α -tocoferol en eritrocito se correlacionó de manera negativa con el valor de H_{50} en el mismo tiempo ($r = -0.686$; $p < 0.028$).

Es interesante mencionar que la correlación entre la concentración de α -tocoferol en suero y α -tocoferol en eritrocito fue mayor inmediatamente después del esfuerzo (T1) ($r = 0.860$; $p < 0.001$) que en el tiempo basal (T0) y ya no se encontró correlación de la concentración de α -tocoferol en suero con el valor de H_{50} en este tiempo.

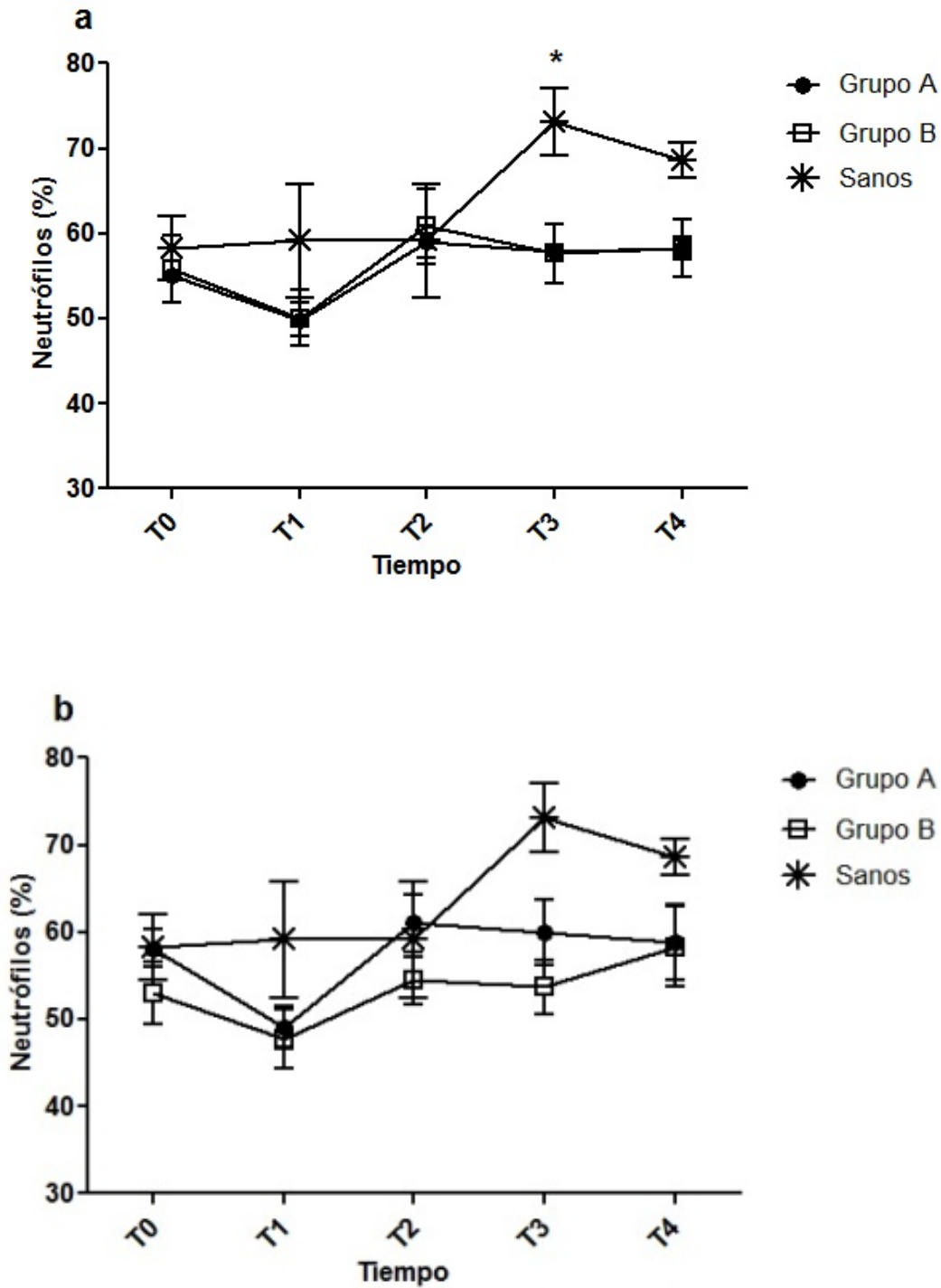


Figura 3. Cantidad de neutrófilos en sujetos con obesidad con respecto al tiempo (T 0,1,2,3,4: tiempo basal, post-esfuerzo, 2, 4 y 6 horas respectivamente); a. Antes del tratamiento, b. Después del tratamiento. Grupo A: tratamiento con ácido ascórbico y α -tocoferol; Grupo B: tratamiento con ácido ascórbico y placebo; datos de sujetos sanos presentados con fines de referencia. Valores expresados como promedio \pm ES. * $p < 0.05$, diferencia del grupo sujetos sanos respecto de A y B.

8. DISCUSION

La obesidad ha sido descrita como una enfermedad inflamatoria crónica que aumenta el desequilibrio entre los mecanismos oxidantes y antioxidantes, el efecto de los radicales libres producto de ese desequilibrio ocasionan alteraciones en las membranas celulares, comprometiendo la función específica de la célula dañada. El eritrocito es un tipo de célula que al ser afectada por estos mecanismos oxidantes compromete su función principal que es transportar y entregar el oxígeno, necesario para el metabolismo aeróbico. También se ha reportado que el ejercicio agudo aumenta la producción de radicales libres aún en personas entrenadas, por tanto es entendible que algunos estudios reporten que la conjunción de obesidad y ejercicio agudo alteran de manera importante los mecanismos de citoprotección antioxidante y exacerbaban la respuesta inflamatoria (1-3, 17, 29).

Aunque en el presente estudio no se midieron marcadores de estrés oxidativo, niveles de enzimas antioxidantes, alteraciones en la viscosidad y deformabilidad del eritrocito como lo reportado en estudios similares ⁽⁴⁾, es lógico pensar que las alteraciones encontradas en la fragilidad osmótica del eritrocito y la respuesta leucocitaria puedan ser atribuidas de manera teórica al estado de obesidad.

Las características clínicas y físicas de los sujetos estudiados podrían explicar en parte, las alteraciones en las variables estudiadas y su relación con la menor capacidad aeróbica que presentaron los sujetos con obesidad cuando se les comparó con sujetos sanos. Esto es evidente si se analizan los datos presentados en la Tabla 1, que muestra que los sujetos con obesidad tuvieron una menor capacidad física. Lo anterior está en concordancia con la población estudiada por Senturk UK et al ⁽⁴⁾, en donde los sujetos entrenados tuvieron mejor capacidad física que los sedentarios; si consideramos que el grupo de sujetos sanos para ese estudio no presentaba obesidad, se observa que el nivel de capacidad física (representado por el VO_2 máx) fue mayor que el obtenido en la población con obesidad que aquí se presenta. Aunque estas diferencias pudieran deberse a las características y tipo de población, método de obtención del valor de VO_2 (directo vs indirecto) y protocolo utilizado (Bruce vs Bruce Modificado), es innegable que el nivel de capacidad física es resultado de la integración de los sistemas que suministran, transportan, entregan y utilizan el oxígeno y que la obesidad al interferir con el funcionamiento de estos sistemas propicia una menor capacidad aeróbica reflejada como un nivel más bajo de VO_2 máx ⁽³⁰⁾.

La mayor fragilidad osmótica que presentaron los sujetos con obesidad se observó desde el tiempo basal (T0) y aumentó después del esfuerzo (T1). Esto puede

explicarse por un lado, considerando que la obesidad *per se* causa alteraciones en la dinámica circulatoria y por otro, que las alteraciones en la membrana del eritrocito son secundarias al daño por el estrés oxidativo exacerbado en estos pacientes ⁽¹⁷⁾.

Se ha reportado en sedentarios no obesos, un aumento de hemoglobina plasmática y disminución de haptoglobina (indicativo de hemólisis intravascular) hasta 24 horas posteriores al ejercicio agudo. Estos cambios se relacionaron con disminución en la deformabilidad y aumento de la agregabilidad en el periodo posterior al esfuerzo. Además, a las 12 horas, un aumento en los derivados carbonilo y en las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS por sus siglas en inglés), considerados como marcadores de peroxidación de proteínas y lípidos respectivamente ^(4,8). En el caso de sujetos con obesidad, el grado de lipoperoxidación es directamente proporcional con el IMC debido a que presentan disminución en la actividad enzimática antioxidante y menor grado de poliinsaturación lipídica, que aunado al aumento de colesterol hacen de la membrana del eritrocito una estructura más rígida y susceptible de hemólisis ^(3, 29). Si además se toma en cuenta que el ejercicio agudo ocasiona alteraciones en la reología sanguínea ⁽⁶⁾, es de esperarse que las personas con obesidad sometidas a un ejercicio agudo (prueba de esfuerzo), presenten un aumento en la fragilidad eritrocitaria tal como se observó en el presente trabajo.

El tratamiento con α -tocoferol, β -caroteno y ácido ascórbico durante dos meses disminuyó la fragilidad eritrocitaria, la agregabilidad, el estrés oxidativo y aumentó el nivel de respuesta antioxidante en sujetos entrenados y sedentarios sin obesidad ^(4,8). En el presente estudio solo se administraron, α -tocoferol considerando sus características lipofílicas y su función antioxidante en las membranas celulares y ácido ascórbico con el fin de favorecer la regeneración del α -tocoferoxil a tocoferol ^(14, 31). Se encontró que tres semanas de tratamiento fueron suficientes para lograr una disminución significativa en la fragilidad eritrocitaria en los sujetos con obesidad que recibieron ambas vitaminas (grupo A) comparado con el grupo que recibió ácido ascórbico y placebo (grupo B). La disminución significativa en el índice de fragilidad se presentó desde el tiempo basal y hasta las 2 horas posteriores al ejercicio.

Dentro de las limitaciones del presente estudio se encuentran la ausencia de medición de marcadores de estrés oxidativo, índice de deformabilidad, agregabilidad o viscosidad sanguínea. Sin embargo, la disminución en la fragilidad eritrocitaria indica una mejoría en esos factores y puede explicarse por los niveles

de vitaminas antioxidantes medidos antes y después del tratamiento, tal como ha sido reportado ⁽⁸⁾.

Previo al tratamiento la concentración de α -tocoferol en la membrana del eritrocito de los sujetos obesos fue menor que el medido en los sujetos sanos y los niveles de α -tocoferol en suero fueron mayores en los sujetos obesos; lo anterior sugiere que la concentración limitada de α -tocoferol en la membrana del eritrocito no ejerce su actividad antioxidante propiciando un mayor grado de hemólisis. Posterior al tratamiento, en el grupo A ocurrió lo contrario, observándose que la administración de α -tocoferol incrementa los niveles séricos e incide en el aumento de su concentración a nivel de la membrana del eritrocito, alcanzando niveles semejantes a los encontrados en sujetos sanos. Se puede decir que la membrana del eritrocito fue más resistente, ya que a medida que aumentó el nivel de α -tocoferol en membrana el valor de H₅₀ disminuyó significativamente.

A pesar de que los sujetos con obesidad presentaron antes del tratamiento una mayor concentración de α -tocoferol en suero, éste no pudo ser movilizado hacia la membrana eritrocitaria cuando fue requerido, como lo muestra la correlación positiva entre la concentración de α -tocoferol en suero y H₅₀ después del esfuerzo (T1). La falta de movilización puede entenderse en parte, si se considera que los sujetos con obesidad presentaron mayores niveles de colesterol LDL y que la vitamina E al ser liposoluble permanece como componente de las lipoproteínas, de las cuales la LDL liga de 6 a 12 moléculas de α -tocoferol ⁽³¹⁾.

Se ha reportado disminución en los niveles de α -tocoferol en plasma y membrana del eritrocito inducidos por el ejercicio agudo en sujetos sanos que no recibieron tratamiento; se menciona que la concentración de α -tocoferol en el eritrocito está determinada por la concentración plasmática de α -tocoferol y por la duración e intensidad del ejercicio ⁽³²⁾. En el presente estudio por el contrario, antes del tratamiento no se observó disminución de α -tocoferol en suero o membrana eritrocitaria después del ejercicio (T1; datos no presentados), lo cual puede deberse a las características de la población. No obstante, después del tratamiento en el mismo tiempo (T1), existió una mayor correlación entre la concentración sérica de α -tocoferol y la membrana del eritrocito; lo cual sugiere que la administración exógena de α -tocoferol, mejora su concentración sérica en forma libre incidiendo sobre el depósito en la membrana del eritrocito y que existió una mejoría en los depósitos α -tocoferol en hígado y tejido graso, además de haber aumentado la movilización del α -tocoferol de hígado y tejido graso hacia el plasma y entre éste y la membrana del eritrocito, el cual utilizó el α -tocoferol como

antioxidante con la consecuente disminución de la fragilidad osmótica observada en este grupo de sujetos. Esto es teóricamente posible, ya que se ha sugerido al hígado como el órgano regulador de la homeostasis de α -tocoferol tanto en reposo como en ejercicio ⁽³²⁾.

El efecto del ácido ascórbico pudo haber contribuido en la disminución de la fragilidad osmótica del grupo A. Se ha descrito que el ácido ascórbico es un agente sinérgico excelente del α -tocoferol; el efecto antioxidante que ejerce de manera inicial en la fase acuosa (plasma) mejora el efecto del α -tocoferol a nivel de la fase lipídica (membrana), resultando un menor índice de peroxidación lipídica ⁽³³⁾. Esto no se reflejó sobre la fragilidad osmótica en el grupo B; que solo recibió ácido ascórbico.

Los resultados muestran que la prueba de esfuerzo también indujo una respuesta inflamatoria representada por el aumento en el número de leucocitos después del esfuerzo. El aumento fue mayor en los sujetos con obesidad que en los sanos. El tratamiento asignado para los grupos A y B, atenuó significativamente esta respuesta y se aproximó a la respuesta que presentaron los sujetos sanos. Lo anterior es concordante con el estudio de Senturk el cual muestra que el tratamiento con vitaminas antioxidantes disminuye la respuesta leucocitaria posterior al esfuerzo ⁽⁸⁾. El aumento en el número de leucocitos ha sido reportado en diferentes estudios ^(8, 34) y al parecer el tiempo en el que se presenta el pico de leucocitosis depende del protocolo de ejercicio utilizado, la intensidad, la duración, el tiempo en que se tomaron las muestras y el nivel de capacidad física de los participantes. En el presente estudio, el pico de leucocitosis se presentó después del esfuerzo (T1). El aumento del número de leucocitos es indicativo de una verdadera respuesta inflamatoria ⁽⁸⁾; en éste estudio la neutrofilia se presentó 2 y 4 horas posteriores al esfuerzo en los sujetos obesos y sanos respectivamente, tiempo suficiente para que los cambios en la biometría hemática diferencial no se pudieran explicar por la hemoconcentración.

El aumento en el número de neutrófilos se relaciona de manera directa con su activación inducida por el ejercicio, la consecuente producción de ERO, el aumento de la actividad fagocítica, el daño celular; como resultado de los mecanismos anteriores se presenta un aumento en la fragilidad osmótica del eritrocito ^(8, 35, 36). Si bien, los resultados de este estudio muestran discordancia, ya que primero se presentó el aumento en la fragilidad osmótica y posteriormente el pico de neutrófilos, no significa que la neutrofilia sea el único factor que contribuya a la fragilidad eritrocitaria. Las diferencias pueden deberse en parte a que los sujetos con obesidad presentan desde el reposo alteraciones en las propiedades

reológicas de los eritrocitos y un mayor nivel de estrés oxidativo ^(17, 37-39) factores que pueden ser exacerbados cuando realizan un esfuerzo físico. Por otra parte, algunos grupos de estudio mencionan que después de un episodio de ejercicio máximo existe una disminución en la activación los neutrófilos, mientras que otros reportan un aumento ⁽⁴⁰⁾.

El entendimiento de los mecanismos involucrados en la fragilidad del eritrocito toma relevancia si se considera que ésta célula transporta el oxígeno necesario para el metabolismo aeróbico y que funciona como sensor de oxígeno contribuyendo a la regulación del flujo sanguíneo local ⁽⁷⁾. Las alteraciones en las propiedades reológicas del eritrocito representan un factor independiente de riesgo cardiovascular, debido a que modifican la perfusión tisular principalmente en vasos que tiene una reserva limitada de flujo como en el miocardio y que se relaciona con problemas cardiovasculares durante o después del ejercicio ⁽⁶⁾.

El deterioro en la membrana del eritrocito es un reflejo del daño celular a nivel sistémico, relacionado con la respuesta inflamatoria y el estrés oxidativo. Además, cuando la hemoglobina libre es oxidada se convierte en una sustancia citotóxica que puede lesionar a otros eritrocitos y al endotelio aumentando el proceso de aterosclerosis y vasculitis ⁽⁴¹⁾. También el grupo hem se relaciona con la oxidación de proteínas de membrana y con la formación de antígenos de superficie en eritrocitos senescentes causando más hemólisis y perpetuando el ciclo hemólisis, hipoxia, riesgo cardiovascular ⁽⁴²⁾.

A lo largo del día un individuo con obesidad puede realizar esfuerzos físicos mayores de los que habitualmente está acostumbrado a realizar y las alteraciones que se mencionaron anteriormente pueden ocurrir dado el riesgo inherente que presenta el paciente. El tratamiento con vitaminas antioxidantes contribuye a reducir estas alteraciones y puede ser de beneficio en las primeras etapas de tratamiento en donde el ejercicio físico es parte de la estrategia de intervención. Asimismo, las mediciones realizadas en este trabajo pueden servir en población físicamente activa, como parte del modelo de seguimiento y control del entrenamiento.

9. CONCLUSIONES

La administración conjunta de α -tocoferol y ácido ascórbico por tres semanas disminuye la fragilidad osmótica del eritrocito y la respuesta inflamatoria en sujetos con obesidad posterior al ejercicio agudo.

El tratamiento con vitaminas antioxidantes reduce la respuesta inflamatoria en sujetos con obesidad y tiende a ser semejante a la respuesta presentada en sujetos sanos, contribuyendo en la disminución de los factores relacionados con el riesgo cardiovascular.

La administración conjunta de α -tocoferol y ácido ascórbico, tiene un mejor efecto en la reducción de las alteraciones hematológicas estudiadas comparada con la administración única de ácido ascórbico.

Es recomendable la administración de α -tocoferol y ácido ascórbico en sujetos con obesidad que realizan ejercicio aeróbico como parte del tratamiento terapéutico.

Las evaluaciones hematológicas realizadas en el presente estudio pueden ser de utilidad para el seguimiento y control del entrenamiento de población físicamente activa.

10.- BIBLIOGRAFIA

1. Hosagai N, Fukuhara A, Oshima K, Miyata Y, Tanaka S, Segawa K, et al. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes*. 2007;56:901-911
2. Evans WJ. Vitamin E, vitamin C and exercise. *Am J Clin Nutr*. 2000;72 (suppl):647S-652S.
3. Cazzola R, Rondanelli M, Russo-Volpe S, Ferrari E, Cestaro B. Decreased membrana fluidity and altered susceptibility to peroxidation and lipid composition in overweight and obese female erythrocyte. *J Lipid Res*. 2004;45:1846-1851
4. Sentürk UK, Gündüz F, Kuru O, Kocer G, Özkaya YG, Tesilkaya A, et al. Exercise-induce oxidative stress leads hemolysis in sedentary but no trained humans. *J App Physiol*. 2005;99:1434-1441
5. Yalcin O, Erman A, Muratli S, Bor-Kucukatay M, Baskurt OK. Time course of hemorheological alterations after heavy anaerobic exercise in untrained humans subjects. *J Appl Physiol*. 2003;94:997-1002.
6. El-Sayed MA, Ali N, Ali EA. Haemorheology in exercise and training. *Sports Med*. 2005;35(8):649-670.
7. González-Alonso J, Olsen DB, Saltin B. Erythrocyte and the regulation of human skeletal muscle blood flow and oxygen delivery role of circulating ATP. *Circ Res*. 2002;91:1046-1055
8. Sentürk UK, Yalcin O, Gündüz F, Kuru O, Meiselman HJ, Baskurt OK. Effect of antioxidant vitamin treatment on the time course of hematological and hemorheological alterations an exhausting exercise episode in human subjects. *J Appl Physiol*. 2005;98:1272-1279
9. Vincent HK, Morgan JW, Vincent KR. Obesity exacerbates oxidative stress levels after acute exercise. *Med Sci Sports Exerc*. 2004;36(5):772-779.
10. Clarkson PM, Thompson HS. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health?. *Am J Clin Nutr*. 2000;72(suppl):637S-46S
11. Ji LL. Antioxidants and oxidative stress in exercise. *PSEBM*. 1999;222:283-292
12. May JM. Is ascorbic acid an antioxidant for the plasma membrane?. *FASEB J*. 1999;(13):995-1006
13. Berry EM, Maso LD, Franceschi S. Synergism between vitamins E and C: biological implications for future research. *Int J Cancer*. 1999;83:288 (letter to the editor)
14. Takahisa D, Burton G, Ingold K. Antioxidant and co-antioxidant activity of vitamin C. The effect of vitamin C, either alone or in the presence of vitamin E or a water-soluble vitamin E analogue, upon the peroxidation of aqueous multilamellar phospholipid liposomes. *Biochim Biophys Acta*. 1985;835:298-303
15. Brown KM, Morrice PC, Duthie GG. Erythrocyte vitamin E and plasma ascorbate concentrations in relation to erythrocyte peroxidation in smokers and

- nonsmokers: dose response to vitamin E supplementation. *Am J Clin Nutr.* 1997;65(2):496-502
16. Abella A, Messaoudi C, Laurent D et al. A method for simultaneous determination of plasma and erythrocyte antioxidant status. Evaluation of the antioxidant activity of vitamin E in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol.* 1996;42:737-741.
 17. Burton G, Joyce A, Ingold K. Is vitamin E the only lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood and erythrocyte membranes?. *Arch Biochem Biophys.* 1983;221(1):280-290
 18. Olaiz FG, Rivera DJ, Shamah LT, Rojas R, Villalpando HS, Hernández AM, et al. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública 2006
 19. Kushner RF. Obesity Management. *Gastroenterol Clin N Am.* 2007;36:191–210
 20. ACSM's Guidelines for Exercise Testing and Interpretation. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2006. p. 216-220
 21. Katch FI, Katch VL, McArdle W. Fundamentos de fisiología del ejercicio. 2ª edición. Madrid: McGraw-Hill. Interamericana, 2000
 22. Fletcher GG, Balady GJ, Amsterdam EA, Chaitman B, Eckel R, Fleg J, et al. Exercise standards for testing and training. A statement for health care professionals from the American Heart Association. *Circulation* 2001;104:1694-1740
 23. Heyward V.H. and Wagner D.R. Body composition and metabolic diseases. En "Applied body composition assessment". Second Edition (2004), Human Kinetics. Pag 185 – 193.
 24. Sociedad Internacional para el Avance de la Kinantropometría. Estándares Internacionales para la Valoración Antropométrica (ISAK). Primera Edición (2001), Manual traducido al Español.
 25. Tanaka H, Monahan KD, Seals DR. Age-predicted maximal heart rate revisited. *J Am Coll Cardiol.* 2001;37(1):153-156
 26. Sentürk UK, Gündüz F, Kuru O, Aktekin MR, Kipmen D, Yalcin O, et al. Exercise-induced oxidative stress affects erythrocytes in sedentary rats but not exercise-trained rats. *J Appl Physiol.* 2001;91:1999-2004
 27. Zhao B, Tham SY, Lu J, et al. Simultaneous determination of vitamins C, E and β -carotene in human plasma by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *J Pharm Pharmaceut Scie.* 2004;7(2):200-204.
 28. Liebler DC, Burr JA, Phillips L and Ham JL. Gas chromatography-mass spectrometry analysis of vitamin E and its oxidation products. *Anal Biochem.* 1996;236:27-34.
 29. Olusi SO. Obesity is an independent risk factor for plasma lipid peroxidation and depletion of erythrocytes cytoprotective enzymes in humans. *Int J Obes.* 2002;26:1159-1164.

30. Jones AM, Poole DC. Oxygen Uptake Dynamics: From Muscle to Mouth. *Med Sci Sports Exerc.* 2005;37 (9):1542–1550.)
31. Wang X, Quinn PJ. Vitamin E and its function in membranes. *Progress in Lipid Research.*1999;38:309-336.
32. Hütler M, Woweries S, Leithäuser R, et al. Exercise-induced changes in blood levels of α -tocopherol. *Eur J Appl Physiol.* 2001;85:151-156.
33. Doba T, Burton GW, Ingold KU. Antioxidant and co-antioxidant activity of vitamin C. The effect of vitamin C, either alone or in the presence of vitamin E or a water-soluble vitamin E analogue, upon the peroxidation of aqueous multilamellar phospholipid liposomes. *Biochim Biophys Acta.*1985;835:298-303.
34. McCarthy DA, Grant M, Marbut M, et al. Brief exercise induces an immediate and a delayed leucocytosis. *Br J Sp Med.* 1991;25(4):191-195.
35. Nieman DC, Immune response to heavy exertion. *J Appl Physiol.* 1997;82(5):1385-1394.
36. Quindry JC, Stone WL, King J, et al. The effects of acute exercise on neutrophils and plasma oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc.* 2003;35(7):1139-1145.
37. Weiwiora M, Slowinska L, Wylezol L, et al. Rheological properties of erythrocytes in patients suffering from morbid obesity. Examination with LORCA device. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2006;34(4):499-506.
38. Levy Y, Elias N, Cogan U, et al. Abnormal erythrocyte rheology in patients with morbid obesity. *Angiology.* 1993;44(9):713-717.
39. Devehat L, Khodabandehlou T, Dougny M. Haemorheological parameters in isolated obesity. *Diabete Metab.* 1992;18(1):43-47. Abstract.
40. Peake J, Suzuki K. Neutrophil activation, antioxidant supplements and exercise-induced oxidative stress. *Exer Immunol Rev.* 204;10:129-141.
41. Balla J, Vecelloti G, Nath K. et al. Haem, haem oxygenase and ferritin in vascular endothelial cell injury. *Nephrol Dial Transplant.* 2003;18:8.12.
42. Comporti M, Signorini C, Buonocore G, et al. Iron release, oxidative stress and erythrocyte ageing. *Free Radic Biol Med.* 2002;32:568-576.

ANEXO. CONSENTIMIENTO INFORMADO

FICHA INFORMATIVA

Título del estudio:

“Cambios inducidos por el ejercicio agudo en la fragilidad osmótica del eritrocito y la respuesta leucocitaria en sujetos con obesidad tratados con vitaminas E y C”

Número de protocolo: 23/09

Nombre del (los) investigador(es) M. en C. Andrea Pegueros Pérez.
Dr. Salvador Sánchez Serrano R3MAFyD.
Dr. José Gilberto Franco Sánchez.

Institución: Instituto Nacional de Rehabilitación, Subdirección de Medicina del Deporte, División Clínica de Medicina del Deporte.

Dirección: Av. México-Xochimilco 289, Col. Arenal de Guadalupe. C. P. 14389, Del. Tlalpan, México D. F.

Teléfono: 59 99 10 00, extensiones: 13120 y 13124

Se le ha invitado a participar en un estudio de investigación para evaluar **los cambios inducidos por el ejercicio agudo en la fragilidad osmótica del eritrocito y la respuesta leucocitaria en sujetos con obesidad tratados con vitaminas E y C**. La Obesidad es un problema de salud y nos interesa abordarlo desde el punto de vista de Medicina del Deporte para establecer las condiciones que disminuyan el riesgo cardiovascular cuando usted realice ejercicio como parte del tratamiento.

A continuación se le proporciona información más clara, acerca de este proyecto de investigación, por favor lea este documento detenidamente y tómese el tiempo necesario para formular todas las preguntas que desee. Si hay algo que no esté claro, no dude en preguntar al personal responsable, quienes le explicarán con más detalle.

Propósito del estudio

La Obesidad se caracteriza por la acumulación excesiva de tejido graso en el cuerpo y es una enfermedad que padecen muchos mexicanos. El tejido graso que se acumula puede afectar a órganos como el corazón, los vasos sanguíneos y la sangre entre otros; esto sucede porque al existir grasa en exceso se producen ciertas sustancias oxidantes (llamados radicales libres), que afectan la función de las células. Las células rojas de la sangre ó eritrocitos al ser afectados por los radicales libres, se convierten en estructuras más frágiles y disminuye su función que consiste en transportar oxígeno a todo el cuerpo. El hecho de que el oxígeno no se transporte en cantidad suficiente, aumenta el riesgo de presentar enfermedades del corazón, sobre todo al realizar esfuerzos físicos.

Nuestro **propósito** es conocer qué cambios sufren estas células rojas como resultado de una prueba de ejercicio en sujetos con obesidad y si estos cambios se pueden disminuir cuando se administra vitamina E ya que la vitamina E contrarresta el efecto de los radicales libres. Además, nos interesa conocer también la respuesta de las células blancas (leucocitos), que son productoras de radicales libres. .

Esta información nos ayudará a valorar la respuesta aguda al ejercicio y tomar mejores decisiones al iniciar un plan de tratamiento integral en pacientes con Obesidad.

Para este estudio se espera que participen 20 personas con Obesidad y 10 personas sanas. Su participación es absolutamente voluntaria, no remunerable y es libre de participar o abstenerse, sin que se afecte su derecho a recibir atención médica subsecuente.

Procedimiento

Antes del tratamiento

Se le realizará las siguientes intervenciones: historia clínica completa, electrocardiograma en reposo, prueba de ejercicio y toma de muestras sanguíneas.

Las muestras serán tomadas previas al ejercicio, inmediatamente después del ejercicio, a las 2 horas, a las 4 horas y a las 6 horas.

Para facilitar la obtención y disminuir las molestias durante la toma de las muestras, se le colocará un catéter en la vena del antebrazo derecho. Durante este tiempo permanecerá en el área médica y el personal responsable estará en contacto continuo con usted.

Tratamiento para pacientes con obesidad

Terminada la evaluación inicial, el personal responsable le entregará el tratamiento de manera gratuita, que consistirá en cápsulas de gelatina blanda de vitamina E. El tratamiento tendrá una duración de 3 semanas. Durante este tiempo usted podrá realizar su vida cotidiana habitual.

Seguimiento médico técnico para pacientes con obesidad

Usted será citado una vez al terminar la segunda semana de tratamiento, para verificar el apego al tratamiento, así como para evaluar su estado de salud hasta el momento. Es importante que acuda a su cita. Una vez terminado el período de tres semanas de tratamiento, se realizará nuevamente la prueba de ejercicio con toma de muestras sanguíneas.

Riesgos y/o incomodidades

La colocación del catéter intravenoso y la toma de las muestras se harán bajo condiciones de estricta limpieza y se usará material nuevo y desechable para minimizar los riesgos de posibles infecciones. Durante el procedimiento de colocación del catéter puede presentarse un poco de dolor o quedar un pequeño moretón que se resolverá sin tratamiento en las próximas dos semanas.

La cantidad total de sangre necesaria para el estudio será de 50 mL lo que es una cantidad mínima de la que se extrae en una donación sanguínea y no representa un riesgo para la salud.

Una vez que le sea colocado el catéter, permanecerá con el mismo, un tiempo no mayor a 6 horas, esto puede originar una leve molestia que disminuirá si usted sigue las indicaciones del médico. Podrá deambular si lo requiere, a menos que el médico le indique lo contrario.

El riesgo de presentar reacciones secundarias a la ingesta de vitaminas es nulo, sobre todo si las dosis son las adecuadas como las que se prescribirán en este estudio. Sin embargo, en caso de que presentar alguna molestia o síntoma, es importante que lo haga saber al personal responsable.

Beneficios

La información obtenida podrá darnos un diagnóstico de su estado de salud, para que al término del estudio podamos emitir recomendaciones que permitan controlar y mejorar su salud, así como prevenir las posibles complicaciones relacionadas con la Obesidad, en caso de que la presente.

La información obtenida por su participación en esta investigación, puede ser útil y de beneficio para otras personas que presentan esta enfermedad.

Participación voluntaria

Su participación en este estudio es totalmente voluntaria. Usted puede negarse a participar y puede abandonar el estudio en cualquier momento. Lo único que debe hacer es informar esta decisión al responsable del estudio.

Su retiro no le ocasionará ninguna penalidad, ni tampoco sufrirá algún perjuicio en relación con la atención médica que proporciona la institución.

Sus registros médicos durante la investigación serán tratados confidencialmente.

Se le identificará con un código y la información personal de sus archivos no será entregada a nadie. Usted no resultará identificado personalmente en ninguna publicación sobre el estudio.

Usted tiene la responsabilidad de conocer su historial clínico y de revelar al médico si ha presentado molestias aún con esfuerzos leves o de cualquier información que permita minimizar los riesgos.

Los riesgos directos relacionados con el estudio son prácticamente nulos. Pero, si como consecuencia directa de los procedimientos de este estudio usted presentara algún daño físico, se le otorgará el cuidado médico necesario.

Los costos de algunos estudios de laboratorio, evaluaciones y consultas médicas contempladas para este estudio serán cubiertos por usted. Otros procedimientos no tendrán costo. Se le otorgará el nivel socioeconómico de acuerdo al reglamento vigente.

En caso que presente obesidad, la vitamina E le será entregada de manera gratuita por el equipo responsable, sólo debe seguir y cumplir el tratamiento conforme le sea indicado.



INR

Declaración de consentimiento informado

México, D.F. a _____ de _____ de 20__

A quien corresponda.

Yo _____ declaro **LIBRE** y **VOLUNTARIAMENTE** que acepto participar en el estudio “Cambios inducidos por el ejercicio agudo en la fragilidad osmótica del eritrocito y la respuesta leucocitaria en sujetos con obesidad tratados con vitaminas E y C”, que tendrá una duración de 3 semanas.

Estoy consciente de que los procedimientos y pruebas para realizar el protocolo de estudio son:

- Historia clínica, que consiste en recabar antecedentes médicos (incluyendo antecedentes familiares y personales, tratamientos farmacológicos y quirúrgicos), medición de peso, talla, frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria y presión arterial. Así como una revisión física general y toma de electrocardiograma en reposo.
- Evaluación de ergometría que consiste en una prueba de esfuerzo en banda sin fin, con monitoreo cardíaco y aumento progresivo de velocidad e inclinación.
- Colocación de catéter estéril en la vena del antebrazo para la toma de muestras sanguíneas.
- Contacto continuo con el personal responsable para el control y toma de muestras, por un período no mayor a 6 horas.
- Tratamiento con vitamina E, que deberé ingerir por un período de tres semanas en el caso de que presente obesidad.

Estoy enterado que en caso de presentar alguna anomalía relevante detectada en las evaluaciones programadas seré informado por parte del (los) responsable (s) del estudio.

Estoy consciente que deberé asistir a las evaluaciones iniciales y subsecuentes durante el tiempo que dure el estudio, cuando el médico me lo programe.

Estoy enterado que los costos serán cubiertos en parte por mi y que otros procedimientos no tendrán costo.

Estoy consciente que si sigo las recomendaciones del médico al pie de la letra durante el desarrollo de los procedimientos del estudio, los riesgos e incomodidades que pudieran presentarse son mínimos.

Comprendo el beneficio que mi participación tendrá en mi salud y en la generación de información que pueda ser útil para la población que padece Obesidad.

Mi participación en este estudio es VOLUNTARIA y SIN REMUNERACIÓN. Es de mi conocimiento que puedo negarme a participar y abandonar el estudio en el momento que yo así lo desee siempre que informe al responsable del estudio.

Entiendo que mi retiro no me ocasionará ninguna penalidad, ni tampoco sufriré algún perjuicio en relación con la atención médica que me proporcione la institución.

Estoy enterado de que mis registros médicos durante la investigación serán tratados confidencialmente y que la información personal en archivos no será entregada a nadie. No seré identificado personalmente en ninguna publicación sobre el estudio.

Es de mi conocimiento que en caso de presentarse alguna molestia o duda por mi parte, puedo contactar al (los) investigador (es) responsable (s) del estudio.

Es de mi conocimiento que los riesgos directos relacionados con el estudio son prácticamente nulos. Pero, si como consecuencia directa de los procedimientos de este estudio presento algún daño físico, se me otorgará el cuidado médico necesario. Por lo que estoy consciente que los investigadores no serán responsables de lesiones físicas que sean consecuencia de circunstancias ajenas al diseño y metodología del protocolo en cuestión.

Declaro que he leído y entendido esta carta de consentimiento informado en presencia del Dr(a)._____, y del Sr(a)._____, y que su contenido me ha sido explicado. Mis preguntas han sido respondidas. Consiento voluntariamente participar en este estudio de investigación y recibiré una copia firmada y fechada de esta carta de consentimiento informado para mi registro.

No estoy participando en otro proyecto de investigación en este momento, no lo he hecho en días anteriores y he tratado las implicaciones de tal participación con el (los) responsable (s) del estudio.

Firma	del paciente	Dirección	Teléfono
-------	--------------	-----------	----------

Nombre y Firma del Médico Responsable	Fecha	Teléfono
---------------------------------------	-------	----------

Nombre y firma del testigo	Fecha	Teléfono
----------------------------	-------	----------

Nombre y firma del testigo	Fecha	Teléfono
----------------------------	-------	----------

Nota: este formulario de consentimiento informado, con las firmas originales debe formar parte del archivo de la investigación. Se debe entregar una copia al voluntario y colocar una copia en los registros médicos del mismo.