

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

FACULTAD MEDICINA

INSTITUTO MEXICANO DE SEGURO SOCIAL

DELEGACION SUR DEL DISTRITO FEDERAL

UMAE HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CMN SIGLO XXI

MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO URINARIO EN DISTINTAS ENTIDADES
NOSOLOGICAS

TESIS QUE PRESENTA

DR. EDUARDO BECERRIL VARGAS

PARA OBTENER EL DIPLOMA

EN LA ESPECIALIDAD EN

MEDICINA INTERNA

ASESORES: DR JUAN MANUEL GALLARDO



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.

HOJA RECOLECTORA DE FIRMAS

DOCTOR
JUAN MANUEL GALLARDO
UNIDAD DE INVESTIGACION MÉDICA EN ENFERMEDADES NEFOLÓGICAS
UMAE HOSPITAL DE ESPECIALIDADES
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI
IMSS

DOCTOR
HAIKO NELLEN HUMMEL
MEDICINA INTERNA
UMAE HOSPITAL DE ESPECIALIDADES CMN SIGLO XXI

DOCTORA
MARIA EUGENIA GALVAN PLATA
MEDICINA INTERNA
MEDICO ADSCRITO AL SERVICIO DE MEDICINA INTERNA



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

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

Dictamen de Autorizado

COMITÉ LOCAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD 3601
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES DR. BERNARDO SEPULVEDA GUTIERREZ, CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO
XXI, D.F. SUR

FECHA 15/11/2011

DR. JUAN MANUEL GALLARDO MONTOYA

P R E S E N T E

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

Marcadores de Estres Oxidativo Urinario en Distintas Entidades Nosologicas

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-2011-3601-119

ATENTAMENTE

DR. CARLOS FREDY CUEVAS GARCÍA
Presidente del Comité Local de Investigación en Salud núm 3601

IMSS

SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL



IMSS

REGISTRO NACIONAL DE TESIS DE ESPECIALIDAD

Delegación	4 SURESTE	Unidad de Adscripción	CMN SXXI UMAE HE
Autor			
Apellido Paterno	BECERRIL	Materno	VARGAS
Matricula	99387549	Especialidad	MEDICINA INTERNA
Fecha Grad.	2012	No. de Registro	R-2011-3601-119

Título de la tesis:

MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO URINARIO EN DISTINTAS ENTIDADES NOSOLOGICAS

Resumen:

La enfermedad cardiovascular es la principal causa de muerte en la población adulta en México y en el mundo occidental y la mayoría de los sujetos que la padecen permanecen, aún hoy en día, sin ser oportunamente diagnosticados. Estos datos epidemiológicos alertan sobre la necesidad de adoptar medidas preventivas y terapéuticas eficaces.

En el Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional "Siglo XXI" del IMSS nos proponemos investigar la frecuencia de marcadores de estrés oxidativo urinario en pacientes con distintas patologías utilizando una metodología que puede ser aplicada a la prevención y detección precoz de la enfermedad cardiovascular y de otras enfermedades crónicas que nos permitan que el paciente sea sometido a una serie de estudios no invasivos.

El incremento del estrés oxidativo es un evento precoz en el desarrollo de la disfunción endotelial, uno de los mecanismos que contribuye a la enfermedad cardiovascular. Dado que el aumento del estrés oxidativo y su impacto sobre la función endotelial son reversibles, su detección precoz podría contribuir con las estrategias preventivas de la enfermedad cardiovascular.

El objetivo de este trabajo es describir un módulo de evaluación de la función endotelial y del estrés oxidativo que puede ser incorporado a la batería de estudios que les son aplicados a los pacientes

Palabras Clave:

- 1). Estrés oxidativo
- 2.) Orina
- 3.) Enfermedades crónicas
- 4). Plasma
- 5.) Biomarcadores

Contenido

Paginas 65

Ilustraciones 17

Tipo de Investigación:

Diseño de estudio:

Tipo de estudio:

AGRADECIMIENTOS

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis padres:

Alejo Becerril Fuentes

María del Carmen Vargas Reyes,

por su amor, apoyo, confianza, comprensión y por estar ahí en cada momento importante
de mi vida.

A mis hermanos

Rodrigo Becerril Vargas

Ivonne Becerril Vargas

por ser mis amigos y la motivación de mi vida.

Gracias al Dr Juan Manuel Gallardo, asesor de este proyecto.

CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
JUSTIFICACION	14
PREGUNTA GENERAL	14
PREGUNTAS ESPECÍFICAS	14
OBJETIVOS GENERAL	15
OBJETIVOS ESPECIFICOS	15
HIPOTESIS	15
MATERIAL Y METODOS	15
CRITERIOS DE SELECCION DEL ESTUDIO	25
METODOLOGIA	25
RECURSOS	28
CONSIDERACIONES ETICAS	29
RESUTADOS	30
ANALISIS	41
CONCLUSIONES	46
BIBLIOGRAFIA	47
ANEXOS	
1 CRONOGRAMA	59
2 HOJA DE RECOLECCION DE DATOS	60
3 CONSENTIMIENTO INFORMADO	65

RESUMEN

DR EDAURDO BECERRIL VARGAS DR JUAN MANUEL GALLARDO MONTOYA

La enfermedad cardiovascular es la principal causa de muerte en la población adulta en México y en el mundo occidental y la mayoría de los sujetos que la padecen permanecen, aún hoy en día, sin ser oportunamente diagnosticados. Esos datos epidemiológicos alertan sobre la necesidad de adoptar medidas preventivas y terapéuticas eficaces.

En el Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional "Siglo XXI" del IMSS nos proponemos investigar la frecuencia de marcadores de estrés oxidativo urinario en pacientes con distintas patologías utilizando una metodología que puede ser aplicada a la prevención y detección precoz de la enfermedad cardiovascular y de otras enfermedades crónicas que nos permitan que el paciente sea sometido a una serie de estudios no invasivos y de forma temprana.

El incremento del estrés oxidativo es un evento precoz en el desarrollo de la disfunción endotelial, uno de los mecanismos que contribuye a la enfermedad cardiovascular. Dado que el aumento del estrés oxidativo y su impacto sobre la función endotelial son reversibles, su detección precoz podría contribuir con las estrategias preventivas de la enfermedad cardiovascular.

El objetivo de este trabajo es describir un modelo de evaluación de la función endotelial y del estrés oxidativo que puede ser incorporado a la batería de estudios que les son aplicados a los pacientes.

Material y Metodo: Estudio prolectivo, transversal, aleatorio. Se incluyeron pacientes del CMN SXXI con diversas patología y pacientes aparentemente sanos. Se realizó obtención de muestras biológicas y cuantificación de biomarcadores de estrés oxidativo.

Resultados:

Conclusiones:

MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO URINARIO EN DISTINTAS ENTIDADES NOSOLÓGICAS

DR EDUARDO BECERRIL VARGAS DR JUAN MANUEL GALLARDO MONTOYA

INTRODUCCION

A comienzos del siglo XXI, la enfermedad cardiovascular todavía sigue siendo la principal causa de muerte en la población adulta de los países occidentales^{1,2}. La hipertensión arterial, la diabetes y la dislipidemia, entre otras, contribuyen de manera decisiva en su patogénesis y, a pesar de los conocimientos actuales, gran parte de los pacientes que padecen dichos factores de riesgo permanecen aún hoy en día sin ser diagnosticados. Estos datos epidemiológicos alertan sobre la necesidad de adoptar medidas preventivas para el diagnóstico precoz y terapéuticas eficaces para evitar la morbimortalidad cardiovascular.

Las enfermedades cardiovasculares ocupan el primer lugar de morbi-mortalidad en casi dos terceras partes de la población mundial. Cada año, mueren alrededor de 17 millones de personas en el mundo por enfermedad cardiovascular y se estima que cada 4 segundos ocurre un evento coronario y cada 5 segundos un evento vascular cerebral

Considerando que, en general, la causa de la enfermedad vascular es multifactorial, resulta de gran utilidad el diagnóstico etiológico. El reconocimiento, control y seguimiento de esta enfermedad en estadios avanzados es clínicamente sencillo, pero durante la etapa asintomática es necesario recurrir a metodologías más sensibles que faciliten el diagnóstico etiológico de la enfermedad cardiovascular

En México, la prevalencia de las enfermedades crónicas no transmisibles, tales como la hipertensión arterial (HTA) y la diabetes mellitus (DM), han demostrado un crecimiento exponencial en las últimas dos décadas, llegando a superar en el adulto a las enfermedades transmisibles. La prevalencia de HTA en México es del 30.1% y es uno de los principales factores de riesgo de enfermedad arterial coronaria y enfermedad cerebrovascular. Se calcula que aproximadamente el 1.5% de todos los pacientes que cursan con HTA mueren cada año por causas directamente relacionadas con dicha enfermedad. La prevalencia está directamente relacionada con la edad³.

En México, el 36.5% de los pacientes con HTA cursan con dislipidemia. Esta enfermedad incrementa el riesgo de enfermedad cardiovascular (ECV).

La prevalencia nacional de diabetes mellitus en adultos mexicanos de 20 a 103 años fue de 7.5% (IC95% 7.1-7.9), lo que representa que poco más de 3.6 millones de adultos padecían esta enfermedad. La frecuencia fue apenas mayor en las mujeres (7.8% en total, 6.2% con diagnóstico médico previo) respecto de los hombres (7.2% en total, 5.5% con diagnóstico médico previo).

El 16.4% de toda la población hipertensa en ENSA (Encuesta Nacional de Salud) 2000, tuvo diagnóstico de DM. Sin embargo, de toda la población diabética (10.8%), el 46.2 % tuvo hipertensión arterial. La prevalencia de DM-2 en la población no hipertensa fue del 8.2%. Mientras que, la prevalencia de hipertensión arterial en la población no diabética fue del 28.1%³

La prevalencia de obesidad (IMC > 30 kg/m²) fue del 24.4%. De éstos, el 46.8% registró hipertensión arterial al momento de la encuesta. Mientras que, la prevalencia de hipertensión arterial en la población no obesa fue del 24.6% (p < .05).. Lo anterior representó un riesgo de 2.6 veces más de ser hipertenso si se es obeso. Además, del total de la población hipertensa en ENSA 2000 el 38% fue obeso, mientras que, de toda la población no hipertensa el 18.6% fue obeso. Hubo un incremento notable en la prevalencia de hipertensión arterial de acuerdo al índice de masa corporal (IMC). Sin embargo, al hacer el desglose por género se encontró que el impacto del sobrepeso para hipertensión arterial es significativamente mayor en el hombre, pese a que la prevalencia de obesidad fue mayor en la mujer. Así, la prevalencia de HTA en aquéllos con IMC > 30 kg/m² fue de 46.1% en el hombre y de 36.0% en la mujer, ambos superaron a la prevalencia global nacional del 30.05%. El ser obeso incrementó la prevalencia de HTA en todos los subgrupos de edad. Fue notable que del 53.1% de las personas encuestadas que se sabían hipertensas y no tomaban medicamento el 71.3% fueron obesos³.

La experiencia clínica y los estudios prospectivos permiten establecer una asociación inequívoca entre el estrés oxidativo y la enfermedad cardiovascular^{4,5}. El estrés oxidativo es un evento precoz en el desarrollo de la disfunción endotelial y de la subsecuente enfermedad cardiovascular. Afortunadamente, el aumento del estrés oxidativo y su impacto sobre la función endotelial son reversibles y/o controlables. Su detección se hace por métodos bioquímicos que pueden ser implementados, por personal idóneo, en cualquier centro de salud, a partir de una muestra de sangre venosa y de orina. Se basa en la detección de marcadores del estrés oxidativo, la biodisponibilidad del óxido nítrico (NO) y la defensa antioxidante celular.

La cantidad y la complejidad de los estudios necesarios para detectar y diagnosticar la enfermedad cardiovascular hace imprescindible la utilización de una metodología que sea barata y eficiente.

Por ello se plantea la utilización en el Hospital de Especialidades, que es una metodología que puede ser aplicada a la prevención y detección precoz de la enfermedad cardiovascular y posibilita que el paciente pueda ser sometido a una serie de estudios en una sola jornada, ahorrándole costo y tiempo en consultas y desplazamientos. Se estima que esta modalidad reduce en más de la mitad el costo total de los estudios cuando se los realiza dentro de las 24 horas, independientemente de la especialidad en la que se aplique^{6,7}.

Por lo tanto, el objetivo de este artículo es describir un modelo de evaluación de la función endotelial y del estrés oxidativo que pueda ser incorporado en la metodología de rutinas bioquímicas de las clínicas y hospitales para optimizar el diagnóstico precoz y disminuir el riesgo implícito de enfermedad cardiovascular promoviendo una estrategia preventiva eficaz.

Existen evidencias que plantean la existencia de una relación entre las enfermedades cardiovasculares (ECV) y el estrés oxidativo (EO)^{8,9}. El EO consiste en un desbalance a corto o largo plazo del equilibrio antioxidantes/pro-oxidantes, que provoca una disrupción de los mecanismos de señalización y control celular, a causa de favorecer los procesos de pro-oxidación u obstaculizar los mecanismos antioxidantes¹⁰. La cadena de transporte de electrones mitocondrial (CTEm) constituye la fuente primaria de obtención de energía en las células cardíacas. A través de ésta se producen una serie de procesos de óxido-reducción y con ello se generan especies reactivas del oxígeno (ERO)¹¹. Además, las células que utilizan el oxígeno como fuente de obtención de energía pueden generar ERO a partir de la reducción enzimática de éste. Estas reacciones se producen por la actividad de enzimas como la NADH/NADPH oxidasa, xantina oxidasa, lipoxigenasa, cicloxigenasa y la óxido nítrico sintasa, entre otras¹².

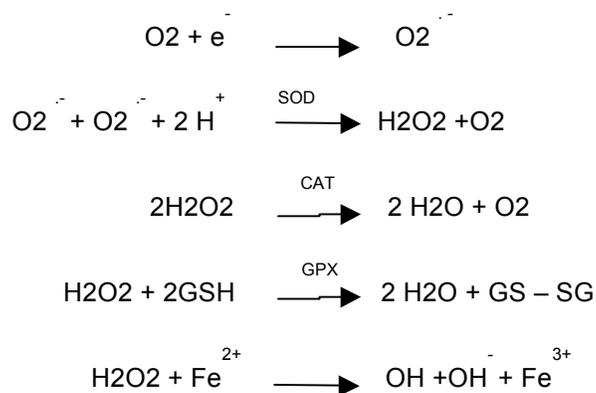
ESTRÉS OXIDATIVO.

La vida de los organismos aeróbicos, requiere de un adecuado aporte de energía, y de la combustión, este último proceso vital es catalizado y regulado por un conjunto de mecanismos metabólicos, susceptibles a ser dañados por reacciones oxidativas incontroladas, asociadas con la producción de energía, por lo que se requiere de la existencia de complejos sistemas antioxidantes para controlar este tipo de reacciones y reparar o reponer los mecanismos metabólicos dañados. A su vez, los sistemas enzimáticos, también se encargan de producir especies reactivas para reacciones biológicas de señalización, biosíntesis, defensa bioquímicas, y de detoxificación. Por lo que la presencia de ambos efectos de estas especies reactivas; benéficos y dañinos nos lleva a aseverar que si bien el oxígeno es esencial para la vida, la sobreproducción de especies reactivas

del oxígeno (EROS), y entre ellas los radicales libres, pueden conducir a la muerte celular por estrés oxidativo¹⁰.

Los radicales libres (RL) son definidos como aquellas moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera una alta inestabilidad. Es una entidad química que contrario a la normal tendencia espontánea de los electrones localizados en los átomos y moléculas a la formación de parejas; esta se encuentra desapareada, lo cual, la hace muy inestable, extraordinariamente reactiva y de vida efímera, con una enorme capacidad para combinarse inespecíficamente en la mayoría de los casos, así como con la diversidad de moléculas integrantes de estructura celular: carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y derivados de cada uno de ellos¹³.

Dicho de otro modo las especies reactivas de oxígeno (ERO), tales como súper oxido (O₂⁻), peróxido de hidrogeno (H₂O₂), radical hidroxilo (OH⁻) son producidos continuamente en el cuerpo bajo condiciones normales. Estos metabolitos intermediarios del oxígeno son altamente reactivos y capaces de infligir citotoxicidad por modificación y daño de varias moléculas estructurales y funcionales tales como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Bajo condiciones normales, las ERO producidas en el transcurso del metabolismo son convertidos a moléculas menos dañinas, tales como agua y oxígeno molecular por un sistema endógeno antioxidante, el cual está compuesto por múltiples enzimas antioxidantes¹⁴. Es así como el súper oxido (O₂⁻) es convertido a peróxido de hidrogeno por la súperoxido dismutasa (SOD). El peróxido de hidrogeno es por su parte convertido a agua y oxígeno molecular por medio de la catalasa o la glutatión peroxidasa (GPx). Sin embargo en presencia de donadores de electrones, tales como el hierro en estado ferroso (Fe²⁺), el excedente de súper oxido y peróxido de hidrogeno pueden ser convertidos al radical hidroxilo el cual es un radical libre altamente reactivo y extremadamente citotóxico¹⁵.



Bajo una variedad de condiciones patológicas, la excesiva generación de ERO, un sistema antioxidante defectuoso o una combinación de estos conduce al estrés oxidativo (EO).

Es decir, se entiende por estrés oxidativo (EO) la condición bajo la cual los mecanismos de defensa antioxidante son rebasados por la sobreproducción de radicales libres.

El primer radical libre de oxígeno producido en el cuerpo es el súperoxido (O_2^-) el cual es una molécula altamente reactiva, producida normalmente en el curso de la respiración celular por la mitocondria y como un producto de ciertas enzimas oxidantes en el citoplasma. Sin embargo, bajo condiciones patológicas, los leucocitos activados y macrófagos generan cantidades masivas de O_2^- y otras Especies Reactivas de Oxígeno (ERO), las cuales, actúan como agresores ubicuos, es decir, una gran variedad de estirpes celulares incluyendo las células endoteliales¹⁶, macrófagos¹⁷, y neuronas¹⁸ producen súperoxido y óxido nítrico; estos RL reaccionan para generar el anión peroxinitrito; este último y su forma protonada ácido perioxinitroso son capaces de oxidar biomoléculas, tales como desoxirribosa¹⁹, lípidos²⁰, metionina²¹ y tioles²². De hecho cabe destacar la evidencia existente sobre la capacidad de estos productos sulfenilos para oxidar al glutatión (GSH) y a la cisteína, los cuales forman parte de los sistemas antioxidantes más importantes. De este modo el peroxinitrito media la oxidación de tioles tanto de alto como de bajo peso molecular a radicales intermedios sulfenilos²³ lo cual conlleva importantes consecuencias biológicas, ya que estos radicales son especies reactivas que pueden desencadenar reacciones en cadena²⁴. En el caso de tioles de bajo peso molecular tales como, el GSH se ha propuesto que los radicales sulfenilo podrían ser removidos por la súper oxido dismutasa, a través de la formación del radical glutatiónil oxidado el cual reacciona con oxígeno formando el anión súper oxido^{25,26}.

Por otro lado a bajas tensiones de oxígeno los radicales sulfenilo podrían conducir a la agregación de proteínas a través de la formación de ligaduras disulfuro intra o intermoleculares^{27,28}.

Así como la oxidación tardía de los radicales sulfenilo a ácido sulfónico o sulfónico puede conducir a la pérdida total o parcial de la actividad biológica de las proteínas^{29,30}. Siendo este tal vez uno de los mecanismos por medio de los cuales el peroxinitrito causa muerte neuronal "in vitro" y por medio del cual se ha encontrado su participación en varios trastornos del sistema nervioso central, tales como la isquemia, esclerosis lateral amiotrófica³¹, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson.

Existen al menos tres mecanismos por medio de los cuales el peroxinitrito ($ONOO^-$) daña los tejidos³²:

- (a) Descomposición al radical hidroxilo ($-OH$) y dióxido de nitrógeno (NO_2^-)³³
- (b) Oxidación directa y eficiente de grupos sulfhidrilo, lípidos, ADN y proteínas^{34,35}

Reacción con la súperoxido dismutasa (SOD) para formar un intermediario nitrado, el cual, Nitrolos los residuos de tirosina y fenilalanina de las proteínas³⁶.

La susceptibilidad del tejido nervioso al daño generado por el EO puede ser explicado por la abundancia de ácidos grasos poliinsaturados, los cuales son especialmente susceptibles a la peroxidación por las ERO³⁷. La lipoperoxidación (LPO) ocurre cuando RL como el ONOO⁻ ó el radical hidroxilo (OH[•]) extraen un hidrógeno de los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana formando un radical alquilo, éste a su vez modifica su estructura y se combina con el oxígeno molecular (O₂) para formar un radical peróxido (ROO[•]), que posee la capacidad de extraer un radical hidrógeno de los ácidos grasos vecinos, convirtiéndose en un radical hidroperóxido lipídico, que se reorganiza y fragmenta en alcanos y aldehídos³⁸. Estos aldehídos pueden causar citotoxicidad por el daño que producen en sistemas enzimáticos mayores, como la Na⁺, K⁺ ATPasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, y transportadores de glucosa^{39,40,41,42}. Uno de los productos de la degradación el dialdehído malónico, puede reaccionar con los grupos tiol (SH) o amino (NH₂). Este proceso se repite incrementando el daño, hasta que dos radicales libres pertenecientes o no a la misma molécula interactúan, o cuando se unen a moléculas captadoras, tales como las proteínas de membrana y el α- tocoferol. De hecho la peroxidación de lípidos juega un papel importante en la progresión del daño tisular⁴³.

La enzima glutatión peroxidasa cataliza la reducción de lipoperóxidos y otros hidroperóxidos orgánicos usando el glutatión reducido (GSH) como un donante de H⁺. De este modo, esta enzima junto con su sustrato GSH, proveen una importante protección contra el daño secundario a la lipoperoxidación⁴⁴.

GLUTATIÓN PEROXIDASA

La glutatión peroxidasa (GPx) es una enzima selenio (Se) dependiente que cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) o lipoperóxido (L-OOH), utilizando como agente reductor el glutatión reducido (GSH). Se conoce que los L-OOH son tóxicos en los tejidos animales y que dan lugar a especies reactivas del oxígeno como los radicales peróxido (L-OO[•])^{45,46}.

La GPx, como parte del mecanismo de defensa antioxidante, evita la oxidación de los L-OOH, reduciéndolos en presencia de GSH^{45,46}.

Estos efectos son catalizados por la GPx a través de la siguiente reacción:

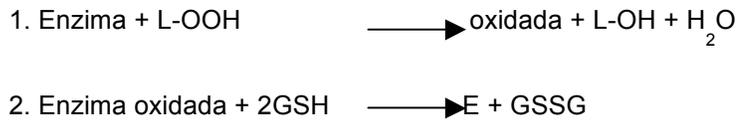


Existen al menos 3 formas de GPx selenio dependientes: una forma intracelular o celular (GPx-c), una extracelular o plasmática (GPx-p) y otra con actividad específica para los fosfolipoperóxidos (GPx-PH) que por lo general está asociada a la membrana y aunque su actividad es la misma, poseen diferencias estructurales^{46,47,48}. La GPx-c y la GPx-p son enzimas tetraméricas; es decir, están compuestas por 4 subunidades idénticas entre sí y cada una de éstas contiene un átomo de Selenio unido covalentemente a una molécula de cisteína. La secuencia de aminoácidos de las subunidades de la GPx-c es diferente a la secuencia de la GPx-p, esta última además es una proteína glicosilada y posee puentes disulfuros intramoleculares.

El peso molecular de la GPx-c es de 22 kD, mientras que el de la GPx-p es de 25 kD, con un total aproximado de 221 aminoácidos por subunidad^{49,50,51,52}. Las subunidades por separado no presentan actividad catalítica, sin embargo, la GPx-PH es una enzima monomérica que también posee un átomo de Se y presenta actividad catalítica; su peso molecular es de 18 kD⁵³.

La GPx-c se puede localizar en la mitocondria y el citosol de la célula hepática, en el citosol de los eritrocitos formando complejos con la hemoglobina y en el lisosoma de neutrófilos, macrófagos y otras células fagocíticas del sistema inmune⁵⁴ en cuanto a SNC se ha localizado en el citosol y mitocondrias de neuronas y células gliales⁵⁵. Esta isoforma tiene una mayor afinidad por el H_2O_2 que por los L-OOH, en tanto la GPx-p tiene una afinidad semejante para los 2 sustratos. La GPx-c y la GPx-p utilizan como sustratos los H_2O_2 y los L-OOH; sin embargo, no son capaces de utilizar los fosfolipoperóxidos (PHL-OOH) que son los sustratos principales para la GPx-PH^{46,50}

En el centro activo de la enzima GPx se encuentra un átomo de Se unido covalentemente a un residuo de cisteína con actividad durante la catálisis. Además se describe en el centro activo un grupo tiol muy cercano al Se que proviene de un residuo de cisteína. En las diferentes GPx se conserva casi intacta la estructura del centro catalítico, lo que refuerza la hipótesis de que el mecanismo de acción para las 3 formas es el mismo^{46,47,48,51}. Mientras que la formación del complejo enzima sustrato se produce debido a que en el sitio activo tienen lugar una serie de transformaciones como resultado de las cuales se forma un puente metálico cíclico, donde:



La catalasa (CAT), al igual que la GPx, se encarga de eliminar el H_2O_2 y su localización celular es similar, pero sus mecanismos de regulación son diferentes.

La GPx y la glutatión reductasa (GRd) se encuentran formando parte de un sistema antioxidante (GPx/GRd), y la CAT de otro (SOD/CAT). Se ha observado que ambos sistemas no actúan a la par; la CAT actúa en presencia de altas concentraciones de H_2O_2 y la GPx lo hace a concentraciones bajas, lo que demuestra una correlación inversa en la actividad de ambas enzimas. Además, algunas citoquinas como el factor de necrosis tumoral (TNF), el interferón (IFN) y la interleucina-1 (IL-1) son capaces de inhibir la actividad de la GPx^{47,48}.

GLUTATIÓN (GSH)

El sistema glutatión oxidado /reducido (GSSG/2GSH) es el principal amortiguador reductor tiol-disulfuro celular⁵⁶. Este tripéptido puede presentarse tanto en su forma reducida (GSH) como en su forma oxidada (GSSG)⁵⁷ y la enzima glutatión reductasa (GR) se encarga de mantener la proporción GSH/GSSG⁵⁸.

El GSH es considerado como el grupo "tiol" intracelular más importante, capaz de interferir con la fase de iniciación de la lipoperoxidación al reducir los niveles de especies reactivas de oxígeno (EROS), lo que incluye al peróxido de hidrógeno y al radical hidroxilo. Dicho efecto limita la propagación de los daños generados por la LPO, al funcionar como cofactor de la glutatión peroxidasa. Otros mecanismos por los cuales el glutatión inhibe la iniciación y propagación de la LPO es a través de la regeneración del ascorbato. Existen diversos estudios que sugieren al contenido de GSH como marcador de la LPO, ya que ésta no se desencadena sino hasta que los niveles de GSH disminuyen por debajo del 15%. Más aún, la inhibición de la síntesis del GSH, incrementa la formación de radicales libres⁵⁹, eleva la actividad de la sintasa del óxido nítrico⁶⁰, disminuye la actividad mitocondrial⁶¹ e incrementa la vulnerabilidad excitotóxica. Además, se ha implicado al GSH en la síntesis y reparación de ADN y en la disminución de los enlaces disulfuro de las proteínas lo cual les confiere o restaura la actividad enzimática dependiente de tioles.

Es por esto que dada su participación a distintos niveles el GSH ha sido considerado como el antioxidante celular mas importante, particularmente a nivel de sistema nervioso, localizándose casi exclusivamente en las células gliales. Otra característica que ha hecho del GSH un factor relevante en el EO es que el SNC posee bajos niveles de catalasa, razón por la cual la Glutación Peroxidasa (GPx), localizada en citosol y mitocondria de neuronas y células gliales⁵⁵ es la principal responsable de la movilización del H₂O₂ y otros peróxidos.

El GSH es sintetizado a través de dos pasos a partir de los aminoácidos glutamato, cisteína y glicina, a través de la acción de la γ - glutamylcisteina-sintetasa y la GSH sintetasa a nivel citosólico⁶². Sin embargo es de importancia resaltar que si bien el citosol intercambia GSH, con los demás compartimientos intracelulares^{63,64,65}, algunos organelos, son capaces de producir su propio GSH y que estos depósitos son independientes de las concentraciones de GSH citosólico, tal es el caso del GSH presente en el núcleo⁶⁶ en el cual mantiene el estado reductor de importantes proteínas sulfhidrilo, las cuales son necesarias para la reparación y expresión del ADN⁶⁷.

ESTRÉS OXIDATIVO Y PATOLOGÍA CARDIOVASCULAR

Las ERO son capaces de oxidar lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, con la consecuente afectación en sus estructuras y funciones⁶⁸. Por otra parte, existen defensas antioxidantes endógenas como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutación peroxidasa (GPx) y el glutación reducido (GSH), los cuales son indispensables para que existan concentraciones basales de ERO y con ello el corazón funcione adecuadamente. Sin embargo, bajas concentraciones de antioxidantes hacen al corazón más susceptible al daño oxidativo⁶⁹.

Los efectos de las ERO sobre la función cardiovascular dependen fundamentalmente de las concentraciones en que éstas son producidas. Durante la generación de EO moderado y controlado se produce la activación de una serie de cascadas de señalización intracelular que compensan la producción de ERO, sin embargo una continua sobreproducción de estas especies provoca la instauración de estados patológicos como las ECV⁷⁰. No obstante, la producción de ERO no es el único aspecto importante en el mantenimiento de la homeostasis redox en el sistema cardiovascular. Existen dos compuestos con propiedades antioxidantes de vital importancia como el glutación (GSH) y la tiorredoxina (Trx)⁷¹. Estos elementos constituyen cofactores de enzimas antioxidantes detoxificadoras de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) como la GPx y la tiorredoxina reductasa (TrxR)⁷² El incremento en estos tioles intracelulares protege a las células de la muerte inducida por EO⁷³, mientras que su disminución conlleva a estados de enfermedad⁷⁴.

El NO, gas muy difusible y lábil, cumple un papel fundamental en la vasodilatación dependiente del endotelio. Se sintetiza a partir de la L-Arginina, por la acción de la enzima NO-sintetasa presente en el endotelio. El NO difunde al músculo liso produciendo su relajación mediante la producción de una enzima citosólica, la guanilato ciclasa, que produce un aumento del 3',5'-guanosina monofosfato cíclico (GMPc). Su importancia in vivo se aprecia cuando, luego de inhibir la NO-sintetasa y disminuir la producción de NO, se observa la aparición de vasoconstricción en casi todos los lechos vasculares, que se asocia con un aumento de la presión arterial sistémica⁷⁵. Por otro lado, las especies oxígeno reactivas también participan en el control del tono vascular. En particular, el radical anión superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$) interacciona con el NO formando peroxinitrito (ONOO^-) disminuyendo la biodisponibilidad del NO y produciendo vasoconstricción^{76,77}.

Bajo condiciones fisiológicas, el sistema de defensa antioxidante es capaz de minimizar los niveles de ROS preservando la biodisponibilidad del NO y manteniendo así el tono vascular normal. La enzima superóxido dismutasa es la responsable de degradar el $\bullet\text{O}_2^-$, reduciendo la formación de ONOO^- , potente oxidante y vasoconstrictor. Por otro lado, las enzimas antioxidantes glutatión peroxidasa y catalasa degradan a los peróxidos, evitando los efectos deletéreos de los mismos. Finalmente, el glutatión junto con la cisteína son los responsables de mantener el equilibrio REDOX intracelular, permitiendo así el funcionamiento normal de las células.

El estrés oxidativo es un hallazgo común y precoz de las patologías cardiovasculares. Estudios experimentales y clínicos concluyeron que el estrés oxidativo es responsable de inactivar rápidamente al NO, formando principalmente ONOO^- ⁷⁸. Diversos trabajos mostraron que el incremento del estrés oxidativo se expresa con un deterioro en la vasodilatación dependiente del endotelio y una mayor sensibilidad del endotelio a la vasoconstricción. Sin embargo, en los estadios tempranos de la enfermedad vascular no se observan dichas alteraciones porque el endotelio es capaz de contrarrestar los efectos del estrés oxidativo y mantener la función endotelial normal.

Por ello, es indispensable estudiar el estrés oxidativo y los mecanismos de defensa antioxidante como marcadores precoces de disfunción endotelial.

Hay una fuerte evidencia de que el óxido nítrico juega un papel importante en la regulación de la homeostasis vascular y de que la biodisponibilidad del óxido nítrico está disminuida en la enfermedad aterosclerótica y las enfermedades con ella relacionadas. La pérdida de la biodisponibilidad del óxido nítrico es atribuible a un incremento del estrés oxidativo causado por una reducción de las defensas antioxidantes, a un aumento de la producción de radical anión superóxido y/o a una acumulación de lipoperóxidos.

DISFUNCIÓN ENDOTELIAL

La disfunción endotelial se considera en la actualidad una de las primeras manifestaciones de la enfermedad vascular y la arteriosclerosis. El endotelio, una monocapa de células que recubre la pared luminal de los vasos sanguíneos, regula la interacción de las células y las proteínas circulantes con las células residentes en la pared vascular, ejerciendo un papel central como sensor y transmisor de señales.

El endotelio protege la pared arterial frente al desarrollo de lesiones y contribuye a la homeostasis vascular a través de ese control continuo de los estímulos que recibe y la adaptación de su estado funcional. Las células endoteliales (CE), mediante un programa de expresión génica y una síntesis y procesamiento de proteínas altamente regulable, son capaces de detectar los cambios tanto físicos (estrés mecánico hemodinámico) como químicos (liberación de moléculas en su entorno) y transformarlos en respuestas funcionales adaptativas. Esta capacidad de adaptación le confiere un papel clave en la regulación de la homeostasis vascular. El endotelio tiene funciones antitrombóticas (inhibe la adhesión plaquetaria y la coagulación, y regula el sistema fibrinolítico), controla la actividad de las células musculares lisas (CML) de la capa media (tono vascular/proliferación) y modula el tránsito de macromoléculas, como las lipoproteínas, y la adhesión de leucocitos (monocitos/linfocitos T) a la pared arterial. Diversos factores pueden modificar las funciones del endotelio y provocar lo que se conoce como disfunción endotelial. La disfunción endotelial puede definirse como un desequilibrio en la biodisponibilidad de sustancias activas de origen endotelial que predispone a la inflamación, la vasoconstricción y el incremento de la permeabilidad vascular, y que puede facilitar el desarrollo de arteriosclerosis, agregación plaquetaria y trombosis.

En las últimas décadas se ha demostrado que factores de riesgo coronario bien conocidos producen disfunción endotelial

La pérdida paulatina de la capacidad del endotelio para controlar el tráfico de macromoléculas hacia el interior de la pared permite un mayor depósito de moléculas circulantes, como el fibrinógeno y las lipoproteínas de baja densidad (LDL), iniciando el proceso de disfunción endotelial. El incremento de la permeabilidad endotelial parece vinculado con un proceso de contracción celular mediado por el calcio y con una desorganización del citoesqueleto celular.

Diversos estímulos protrombóticos, inflamatorios o lipídicos (como la trombina, el lipopolisacárido o las lipoproteínas) producen cambios significativos en la permeabilidad endotelial .

La activación del endotelio conlleva la expresión/secréción de citocinas, como la interleucina 1 (IL-1), los factores de crecimiento derivados de las plaquetas (PDGF), el fibroblasto básico (bFGF) y

los factores quimiotácticos (proteína 1 quimiotáctica para monocitos [MCP-1]), y la exposición proteínas de superficie que actúan como moléculas de adhesión (CAM) para receptores específicos de leucocitos circulantes. El endotelio activado por agentes proinflamatorios y aterogénicos (citocinas, LDLox, etc.) expresa CAM que no se hallan presentes en el endotelio normal, como VCAM-1, y sobreexpresa otras, como ICAM-1. En general, la DM, HAS, dislipidemia producen un aumento de los valores de las formas solubles de algunas de las CAM mencionadas. Se han encontrado valores elevados de las formas solubles de ICAM y selectina P en pacientes con cardiopatía isquémica y de ICAM y VCAM en pacientes con hipertrigliceridemia, enfermedad arteriosclerótica periférica o cerebral.

El óxido nítrico (NO) es una de las moléculas sintetizadas por el endotelio que regula un mayor número de procesos homeostáticos locales. El NO se podría clasificar como una molécula ateroprotectora de origen endotelial (vasodilatador, antiagregante plaquetario, Inhibidor de la proliferación de las CML, antioxidante e Inhibidor de la expresión de CAM y de la adhesión de monocitos)

Por tanto, a través de la alteración de la producción de NO endotelial se perturba profundamente la homeostasis vascular y se potencia el desarrollo de lesiones ateroscleróticas. La disminución de la dilatación dependiente de NO es la manifestación más temprana de la disfunción endotelial.

ORINA Y ESTRÉS OXIDATIVO

La orina es un líquido, amarillento de olor característica, secretado por los riñones. El cual es formado por tres procesos a nivel de las nefronas, filtración, absorción y excreción. Esta compuesta en su gran mayoría por líquido, 96%, y solo el 4% son solutos, el principal componente sólido de la orina es la urea, producto de degradación de aminoácidos, representando hasta un 20g de los solutos. Debido a esto la orina nos permite realizar diagnóstico de diversas enfermedades debido a la excreción de sustancias anormales. Existen múltiples estudios en los cuales se ha demostrado niveles elevados de biomarcadores de estrés oxidativo en sujetos con factores de riesgo cardiovascular. Sebahat Nacıtarhan y colaboradores encontraron aumento en niveles séricos y urinarios de MDA en pacientes diabéticos. Así también es un método no invasivo y fácil de obtener, por lo cual puede ser incorporado en la batería de estudio como marcador temprano de disfunción endotelial

Justificación.

La enfermedad cardiovascular se encuentra dentro de las primeras causas de morbimortalidad. Es sabido que la EVC es multifactorial, siendo la DM2, HAS y dislipidemia los principales factores de riesgo. Debido a la alta prevalencia de dichos factores en nuestro país, es de vital importancia encontrar un método diagnóstico seguro y poco invasivo para el diagnóstico oportuno de EVC. Hay evidencia de la asociación del estrés oxidativo y patología vascular, pudiendo cuantificarse marcadores sérico y urinario para diagnóstico oportuno con la finalidad de realizar intervenciones terapéuticas y así prevenir un desenlace cardiovascular.

Pregunta general

¿Existen diferencias en marcadores de oxidación urinarios en pacientes con diversas enfermedades comparado con sujetos sanos?

Preguntas específicas

¿Los marcadores de oxidación medidos en orina de pacientes con enfermedades crónicas se encuentran elevados comparados con sujetos sanos?

¿Los marcadores de oxidación en orina de sujetos enfermos con factores de riesgo cardiovascular se encuentran elevados comparados con sujetos sanos?

¿Los marcadores de oxidación en orina de pacientes enfermos con factores clásicos de riesgo cardiovascular se encuentran elevados comparados con sujetos enfermos sin factores de riesgo asociados?

Objetivo General.

Estudiar la concentración de diferentes marcadores de oxidación en la orina de pacientes con diferentes entidades nosológicas y compararlos con esos mismos marcadores de sujetos aparentemente normales.

Objetivos Específicos

La concentración de diferentes marcadores de oxidación en orina de pacientes con diferentes enfermedades crónicas se encuentran elevados comparado con sujetos sanos

La concentración de diferentes marcadores de oxidación en orina de pacientes con enfermedades nosológicas y factores de riesgo cardiovascular clásicos se encuentra elevados comparado con sujetos enfermos con dichas comorbilidades

Hipótesis.

Los marcadores de oxidación en muestras urinarias se encuentran aumentados en las enfermedades crónicas

Pacientes, material y métodos

Tipo de estudio: Prolectivo. transversal, aleatorio

Población de estudio: Se incluyeron pacientes con diagnostico de alguna patología crónica

En el grupo control se reclutaron sujetos aparentemente sanos de ambos sexos y edades relacionadas con los pacientes.

Variables.

Independientes

- Edad

Definición conceptual: Tiempo que ha vivido una persona.

Definición Operativa: edad consignada en el expediente.

Tipo de variable: escalar.

Unidad de variable: números arábigos.

- Género

Definición conceptual: Taxón que agrupa a especies que comparten ciertos caracteres.

Definición Operativa: género consignado en el expediente.

Tipo de variable: nominal dicotómica.

Unidad de variable: 1: Hombre, 2: Mujer.

Unidad de variable: 1: Presente, 2: Ausente.

- Índice de Masa Corporal

Definición conceptual: cociente entre el peso de una persona y su altura (expresada en metros) elevada al cuadrado.

Definición Operativa: presencia o ausencia de sobrepeso u obesidad, calculada con los datos consignados en el expediente.

Tipo de variable: nominal.

Unidad de variable: 1: Delgadez severa (<16.0), 2: Delgadez Moderada (16.0-16.99), 3:

Delgadez aceptable (17.0-18.49), 4: Normal (18.5-24.99), 5: Sobrepeso (25.0-29.99), 6:

Obesidad Grado I (30.0-34.99), 7: Obesidad Grado II (35.0-39.99), 8: Obesidad Grado III

(≥40.0)

- Diabetes mellitus

Definición conceptual: Enfermedad metabólica producida por deficiencias en la cantidad o en la utilización de la insulina, lo que produce un exceso de glucosa en la sangre.

Definición Operativa: presencia o ausencia del padecimiento, consignado en expediente y verificado por pruebas de laboratorio.

Tipo de variable: nominal dicotómica.

Unidad de variable: 1: Presente, 2: Ausente.

- Hipertensión Arterial Sistémica

Definición conceptual: Tensión excesivamente alta de la sangre.

Definición Operativa: presencia o ausencia del padecimiento, consignado en el expediente.

Tipo de variable: nominal dicotómica.

- Hipercolesterolemia:

Definición conceptual: Aumento de la concentración de colesterol en la sangre

Definición Operativa. Presencia o ausencia de colesterol sérico elevado, consignado en el expediente, verificado en pruebas de laboratorio

Tipo de variable: nominal dicotómica

Unidad: 1 Presente 2 Ausente

- Insuficiencia renal crónica:

Definición conceptual: Situación clínica debida a diferentes causas, donde el riñón pierde su capacidad de depurar las sustancias tóxicas del organismo, aumentando los niveles de urea y creatinina en la sangre

Definición operativa: ausencia o presencia del padecimiento, consignado en el expediente

Tipo de variable: nominal, dicotómica

Unidad: 1 Presenta 2 Ausencia

- Glomerulonefritis

Definición conceptual: Enfermedad inflamatoria renal que afecta de forma predominante a los glomérulos

Definición operativa: ausencia o presencia del padecimiento, consignado en el expediente

Tipo de variable: nominal, dicotómica

Unidad: 1 Presenta 2 Ausencia

- Carcinoma renal

Definición conceptual: forma de cáncer con origen en células renales

Definición operativa: ausencia o presencia del padecimiento, consignado en el expediente

Tipo de variable: nominal, dicotómica

Unidad: 1 Presenta 2 Ausencia

- Incontinencia Urinaria:

Definición conceptual: Incapacidad para controlar la evacuación de la vejiga, o el recto.

Definición operativa: ausencia o presencia del padecimiento, consignado en el expediente

Tipo de variable: nominal, dicotómica

Unidad: 1 Presenta 2 Ausencia

- Artritis reumatoide

Definición conceptual: enfermedad sistémica autoinmune, caracterizada por provocar inflamación crónica principalmente de las articulaciones, que produce destrucción progresiva con distintos grados de deformidad e incapacidad funcional

Definición operativa: ausencia o presencia del padecimiento, consignado en el expediente

Tipo de variable: nominal, dicotómica

Unidad: 1 Presenta 2 Ausencia

- Lupus eritematosos sistémico

Definición operativa: enfermedad autoinmune crónica que afecta al tejido conjuntivo, caracterizada por inflamación y daño de tejidos mediado por el sistema inmunitario, específicamente debido a la unión de anticuerpos a las células del organismo y al depósito de complejos antígeno-anticuerpo

Definición operativa: ausencia o presencia del padecimiento, consignado en el expediente

Tipo de variable: nominal, dicotómica

Unidad: 1 Presenta 2 Ausencia

- Poliarteritis Nodosa

Definición conceptual: : vasculitis que afecta arterias de mediano calibre. La característica principal es la inflamación necrotizante

Definición operativa: ausencia o presencia del padecimiento, consignado en el expediente

Tipo de variable: nominal, dicotómica

Unidad: 1 Presenta 2 Ausencia

- Granulomatosis de Wegener:

Definición conceptual: vasculitis granulomatosa sistémica de etiología desconocida, que afecta sobre todo al tracto respiratorio superior e inferior y al riñón

Definición operativa: ausencia o presencia del padecimiento, consignado en el expediente

Tipo de variable: nominal, dicotómica

Unidad: 1 Presenta 2 Ausencia

- Cirrosis Hepática

Definición conceptual: enfermedad crónica del hígado, consistente en la muerte progresiva del tejido hepático normal y su sustitución por tejido fibroso.

Definición operativa: ausencia o presencia del padecimiento, consignado en el expediente

Tipo de variable: nominal, dicotómica

Unidad: 1 Presenta 2 Ausencia

- Infección por Virus Hepatitis C:

Definición conceptual: enfermedad del hígado causada por el virus hepatitis C

Definición operativa: ausencia o presencia del padecimiento, consignado en el expediente

Tipo de variable: nominal, dicotómica

Unidad: 1 Presenta 2 Ausencia

- Espasmo difuso esofágico

Definición conceptual: trastorno motor esofágico mas frecuente caracterizado por presencia de ondas peristálticas primarias y secundarias mayores de 180 mmHg

Definición operativa: ausencia o presencia del padecimiento, consignado en el expediente

Tipo de variable: nominal, dicotómica

Unidad: 1 Presenta 2 Ausencia

- Insuficiencia arterial

Definición conceptual: conjunto de signos y síntomas producto de la incapacidad del sistema arterial para lograr un aporte adecuado de sangre para los requerimientos de los tejidos

Definición operativa: ausencia o presencia del padecimiento, consignado en el expediente

Tipo de variable: nominal, dicotómica

Unidad: 1 Presenta 2 Ausencia

- Hipoparatiroidismo

Definición conceptual: disminución en la producción de hormona paratiroidea

Definición operativa: ausencia o presencia del padecimiento, consignado en el expediente

Tipo de variable: nominal, dicotómica

Unidad: 1 Presenta 2 Ausencia

- Acromegalia

Definición conceptual: Enfermedad caracterizada por una mayor producción crónica de la hormona de crecimiento.

Definición operativa: ausencia o presencia del padecimiento, consignado en el expediente

Tipo de variable: nominal, dicotómica

Unidad: 1 Presenta 2 Ausencia

- Pénfigo Vulgar

Definición conceptual: trastorno autoinmune caracterizado por aparición de ampollas en piel y mucosas

Definición operativa: ausencia o presencia del padecimiento, consignado en el expediente

Tipo de variable: nominal, dicotómica

Unidad: 1 Presenta 2 Ausencia

- Dermatomiositis

Definición conceptual: proceso inflamatorio de base autoinmune caracterizado por debilidad muscular proximal y simétrica y lesiones cutáneas características

Definición operativa: ausencia o presencia del padecimiento, consignado en el expediente

Tipo de variable: nominal, dicotómica

Unidad: 1 Presenta 2 Ausencia

- Psoriasis

Definición conceptual: enfermedad crónica de la piel caracterizada por lesiones escamosas

Definición operativa: ausencia o presencia del padecimiento, consignado en el expediente

Tipo de variable: nominal, dicotómica

Unidad: 1 Presenta 2 Ausencia

- Purpura trombocitopenica idiopática

Definición conceptual: enfermedad hemorrágica autoinmune causada por defecto en el número de plaquetas circulantes.

Definición operativa: ausencia o presencia del padecimiento, consignado en el expediente

Tipo de variable: nominal, dicotómica

Unidad: 1 Presenta 2 Ausencia

- Síndrome de Alport

Definición conceptual: enfermedad genética inflamatoria, caracterizada por alteración en la síntesis del colágeno afecta principalmente riñones, oídos y ojos

Definición operativa: ausencia o presencia del padecimiento, consignado en el expediente

Tipo de variable: nominal, dicotómica

Unidad: 1 Presenta 2 Ausencia

- Vértigo vascular:

Definición conceptual: sensación de falta de equilibrio

Definición operativa: ausencia o presencia del padecimiento, consignado en el expediente

Tipo de variable: nominal, dicotómica

Unidad: 1 Presenta 2 Ausencia

- Trasplante renal de donador vivo relacionado

Definición conceptual: trasplante de un riñón en un paciente con enfermedad renal avanzada.

Definición operativa: ausencia o presencia del padecimiento, consignado en el expediente

Tipo de variable: nominal, dicotómica

Unidad: 1 Presenta 2 Ausencia

Dependientes

- Oxido Nítrico

Definición conceptual: gas difusible y lábil, cumple un papel fundamental en la vasodilatación dependiente del endotelio. Se sintetiza a partir de la L-Arginina, por acción de la enzima NO-sintetasa.

Definición operativa: Niveles obtenidos en orina

Tipo de variable: Escalar

Unidad: uM/L

- Definición conceptual: Malonaldehido: producto directo de la acción de los radicales libres sobre los ácidos grasos poliinsaturados.

Definición operativa: Niveles obtenidos en orina

Tipo de variable: Escalar

Unidad: uM/L

- AOPP:

Definición conceptual: producto de oxidación avanzada de proteínas (Advanced Oxidation Protein Products)

Definición operativa: niveles obtenidos en orina

Tipo de variable: escalar

Unidad: 1

- AGEs:

Definición conceptual: producto de la glucosilación avanzada (Advanced Glycated end products)

Definición operativa: Niveles obtenidos en muestra de orina

Tipo de variable: Escalar

Unidad: UAF (Unidades arbitrarias de Flurosceina)

- Tioles

Definición conceptual: compuesto que contiene el grupo funcional formado por un átomo de azufre y un átomo de hidrógeno (-SH).

Definición operativa: Niveles obtenidos en muestra de orina

Tipo de variable: Escalar

Unidad: mM/L

- CAR VC

Definición conceptual: Capacidad Antioxidativa Relativa a la vitamina C

Definición operativa: Niveles obtenidos en muestra de orina

Tipo de variable: Escalar

Unidad: mM/L

Criterios de selección del estudio.

Inclusión.

Mayores de 18 años.

Ambos sexos

Sin distinción de etnias u origen.

Exclusión.

Pacientes que presentaran alguno de los siguientes criterios:

Estados sépticos severos

Embarazo

VIH/SIDA

Cáncer

Antecedentes de alcoholismo o abuso de drogas,

Tratamiento con algún fármaco en etapa experimental

Incapacidad de cooperar con los requerimientos del estudio.

Que decidieron abandonar este estudio por voluntad propia y expresa.

Metodología.

OBTENCION DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

Las muestras biológicas (orina) fueron obtenidas de las muestras que son recogidas en el laboratorio central del HE. Todas las muestras fueron recogidas por micción voluntaria luego de un período de ayuno de al menos 12 h. La orina fue centrifugada sin preservantes a 10,000 g 15 min a 4 °C y el sobrenadante fue separado en los volúmenes requeridos para cada determinación y almacenado a -70 °C hasta el momento del análisis.

El consentimiento informado de todos los participantes (pacientes y voluntarios aparentemente sanos) fue obtenido luego de la explicación verbal y escrita de los métodos, riesgos y beneficios contemplados en el estudio.

RECOLECCIÓN DE DATOS

Se realizó llenado de hoja de recolección de datos posterior a toma de muestras biológicas.

DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS

En este estudio pretendemos evaluar la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y CAT, la concentración de indicadores de daño a biomoléculas como el malonildialdehído (MDA), hidroperóxidos totales (ROOH) y productos avanzados de la oxidación de proteínas (AOPP).

También se determinarán el antioxidantes de bajo pesomolecular como el GSH y los tioles totales. Estos parámetros fueron determinados en orina mediante técnicas espectrofotométricas para lo cual fue utilizado un espectrofotómetro de placas de 96 pozos.

Marcadores de oxidación

Concentración de productos avanzados de la oxidación de proteínas

La concentración de AOPP fue determinada a partir de una curva de calibración utilizando como patrón de referencia cloramina T (Sigma St Louis, MO, EE.UU.). Fueron utilizados 100 μL de orina en 1 mL de solución amortiguadora a los cuales fueron añadidos 50 μL de ioduro de potasio (Sigma St Louis, MO, EE.UU.) y 100 μL de ácido acético glacial (Sigma St Louis, MO, EE.UU.). La absorbancia de la reacción fue determinada inmediatamente a 340 nm contra blanco de reactivo⁸¹. La concentración de AOPP fue expresada como μM de cloramina T.

Concentración de malonildialdehido

La concentración de MDA fue determinada a través del método de . En el ensayo se midió la producción de un cromóforo estable luego de la incubación de las muestras a 95 °C durante 60 min a una longitud de onda de 586 nm^{82,83}. La generación de la curva de calibración fue a través de la utilización de malonildialdehído bis [dimetil acetal] (Sigma St Louis, MO, EE.UU.).

Concentración de hidroperóxidos totales

Para la determinación de ROOH fue utilizado el procedimiento de H_2O_2 - 560. El ensayo 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.

NO: la cuantificación de los niveles de NO consiste en la determinación de sus metabolitos estables: nitritos y nitratos (urinarios o plasmáticos) a través de la reacción de Griess.

Marcadores de antioxidación

Concentración de glutatión

Luego de llevar a cabo una precipitación de grupos tioles proteicos, la concentración de GSH fue determinada mediante el método de Sedlak y Lindsay⁸⁴, que utiliza el reactivo de Ellman (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico) 10⁻² M (Sigma St Louis, MO, EE.UU.). La longitud de onda utilizada fue 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 permitió la extrapolación y el cálculo de la concentración de GSH en la muestra analizada.

Marcadores de defensa antioxidante

Glutathion (GSH): la medición del contenido total de glutathion se determina en sangre entera o, más específicamente, en glóbulo rojo por técnicas espectrofotométricas.

Superóxido dismutasa (SOD): la medición de su actividad se determina en glóbulo rojo⁸⁵.

Glutathion peroxidasa (GPx): la medición de su actividad se determina en glóbulo rojo, de acuerdo con MK Cha y colaboradores (1996)⁸⁶

Otras mediciones

Determinación del índice de masa corporal

El índice de masa corporal fue calculado según el siguiente criterio: se tomó el peso corporal (en kg) y se dividió por la altura (m) al cuadrado. Para ello se utilizaron instrumentos validados por el Comité Estatal de Normalización con el sello apto para su uso.

Determinación de colesterol total, glucosa, urea, creatinina y colesterol

La concentración de colesterol total fue medida enzimáticamente a través de la utilización de un equipo comercial..

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Inicialmente se realizó un análisis exploratorio de los datos para la detección de valores aberrantes (*outliers*). Posteriormente se llevó a cabo el análisis con comparación de medias entre los diferentes parámetros, la cual se realizó a través de la utilización de la prueba t de *Student* de muestras no pareadas. Los datos se expresan como la media \pm la desviación estándar (DE). El nivel de significación estadística se asumió como $p < 0,05$. Se utilizó el paquete estadístico SPSS 17 para la obtención de resultados

Recursos.

Humanos.

Residente de medicina interna.

Médico adscrito a la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Nefrológicas (UIMEN). Hospital de Especialidades. Centro Médico Nacional "Siglo XXI".

Personal de laboratorio UIM-EN, CMN "Siglo XXI" y Laboratorio Central de Análisis Clínicos

Personal de archivo clínico. Hospital de especialidades. CMN "Siglo XXI"

Materiales

Computadora con paquetería Office y base de datos

Papelería variada

Artículos de Oficina

Centrifugas

Balanzas

Pipetas Automáticas

Refrigeradores

Congeladores

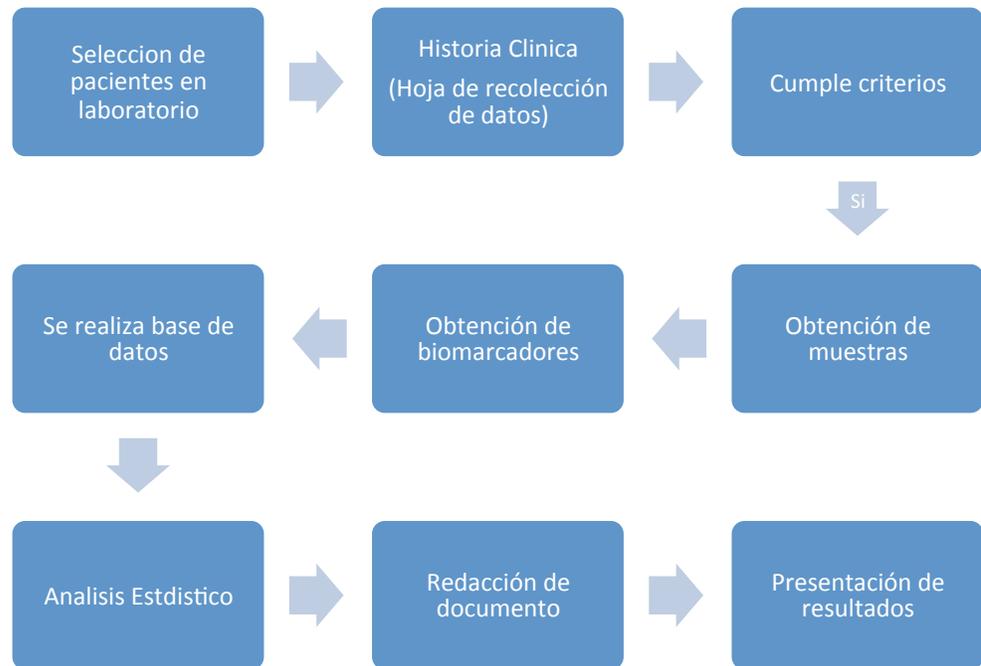
Tubos para muestras de biológicos

Agitadores magnéticos

Espectrofotómetro de placas de 96 pozos

Económicos.

Obtenidos por apoyos del Fondo de Investigación a Salud (FIS) y el Consejo Nacional de Ciencia y tecnología (CONACIT) .



Consideraciones éticas.

El protocolo se revisó y fue aprobado por el comité de ética para las investigaciones en humanos del Hospital de Especialidades del CMN "Siglo XXI" del Instituto Mexicano del Seguro Social.

Resultados.

Se realizó el análisis descriptivo de las características demográficas, con los siguientes resultados; se incluyeron 94 pacientes, de los cuales, 82 eran portadores de patologías crónicas, representando el 87%, y 12 sanos (Figura 1).

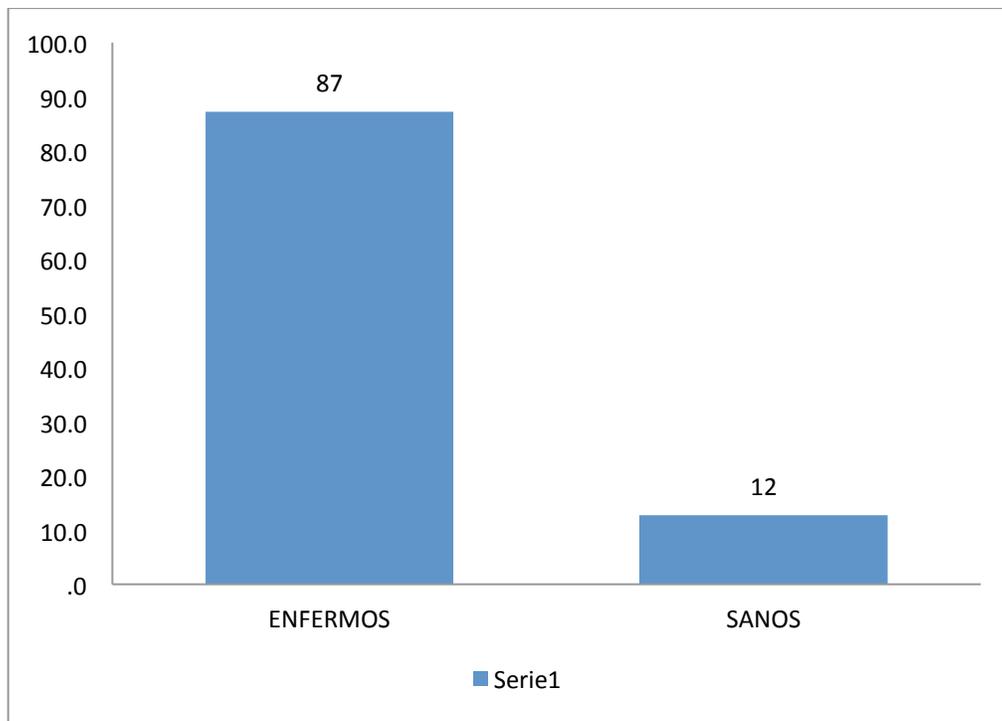


Figura 1. Población del estudio.

Siendo las nefropatías y enfermedades reumatológicas las patologías más frecuentes (figura 2). Representando un 52% y 19 % respectivamente del total de las enfermedades.

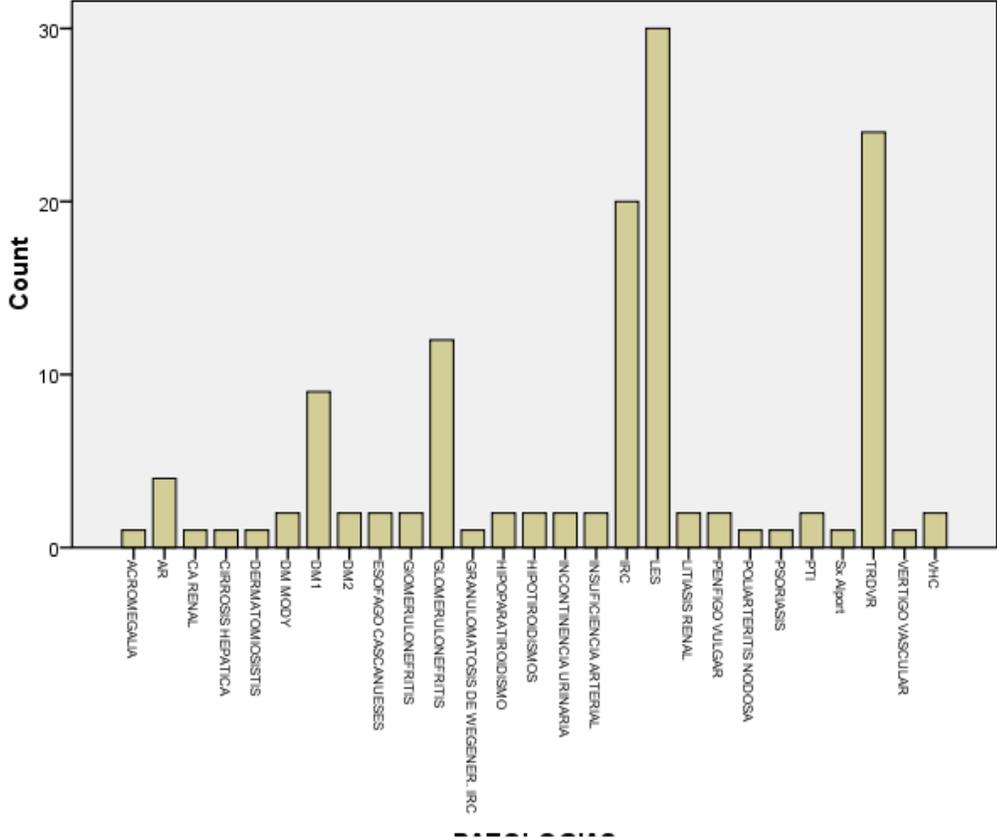


Figura 2 Frecuencia de patología en la población enferma.

La edad se encontró en un rango de los 18 a los 78 años, con un media de 44.61 años y una DS 14.25 (Figura 3).

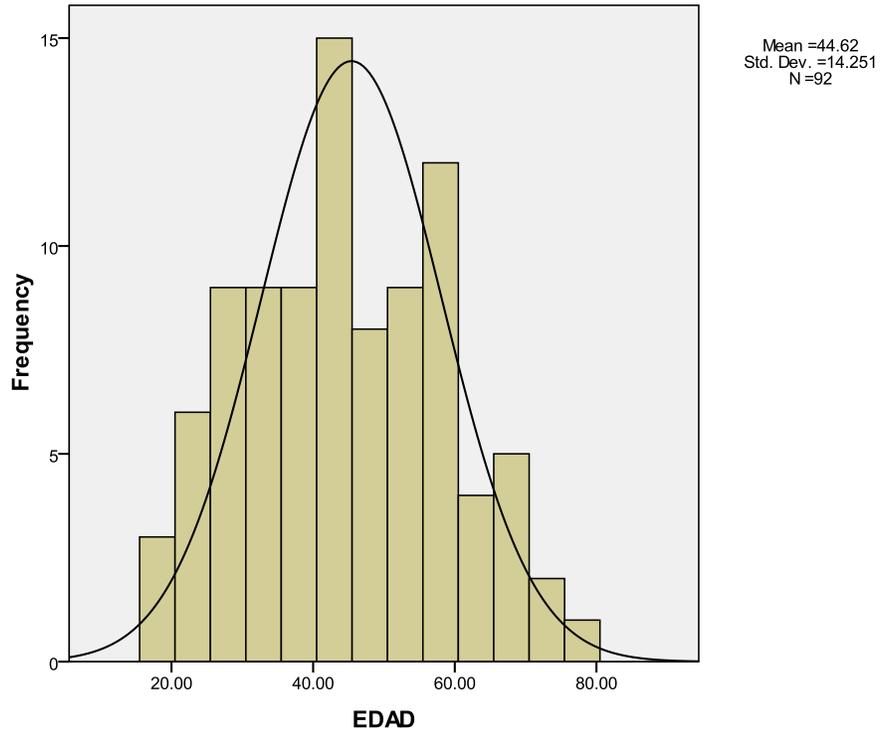


Figura 3. Histograma de edad.

Respecto a la diferencias de género de los pacientes, fueron en su mayoría mujeres, 64 pacientes, representando el 65% (Figura 4).

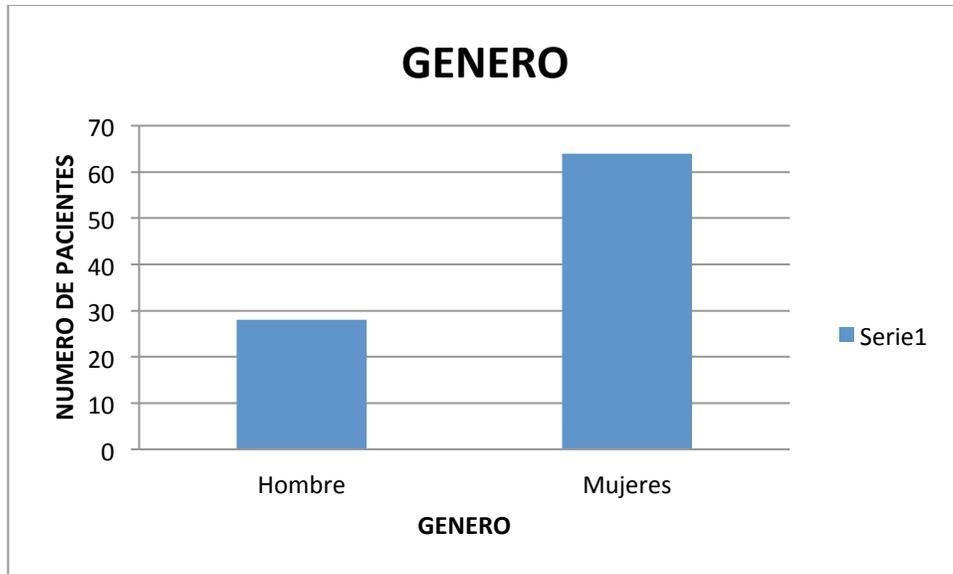


Figura 4. Distribución por género.

En el cuadro 1 se presentan el resto de las características clínicas y bioquímicas expresada en medias \pm DE, encontrar diferencias significativas.

	Sanos (n 12)	Enfermos (n 82)	P
Edad	41.58 \pm 11.98	44.61 \pm 14.62	0.43
Peso	72 \pm 12.99	65.85 \pm 14.03	0.10
Talla	1.60 \pm 0.09	1.57 \pm 0.08	0.15
IMC	27.85 \pm 4.26	26.10 \pm 6.37	0.22
PAS	111.11 \pm 6.00	119.83 \pm 15.99	0.56
PAD	74.44 \pm 8.81	75.52 \pm 11.38	0.39
PAM	98.88 \pm 5.77	105.06 \pm 12.62	0.07
Glucosa	90.00 \pm 10.77	100.65 \pm 38.52	0.22
Creatinina	1.25 \pm 0.10	1.46 \pm 1.27	0.21
Urea	37.4 \pm 8.39	46.9 \pm 23.34	0.10
Colesterol	190.7 \pm 47.05	202.77 \pm 43.68	0.22
Trigliceridos	152.6 \pm 99.82	170.04 \pm 101.10	0.30

Cuadro 1. Características clínicas y bioquímicas de la población en estudio, dividida por grupos

Dentro del análisis de las características demográficas de los pacientes se encontró un alta incidencia de factores de riesgo cardiovascular, predominando la hipercolesterolemia y la HAS en el grupo de pacientes con algún padecimiento crónico (figura 5).

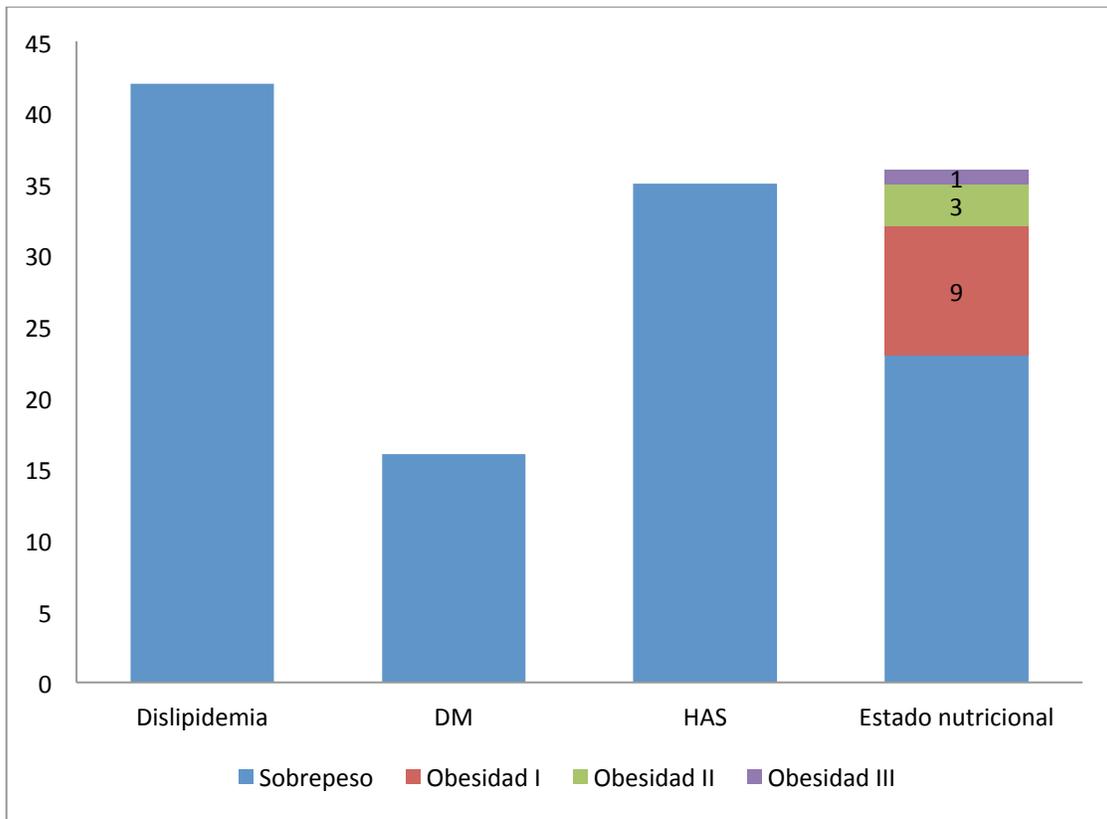


Figura 5. Factores de riesgo cardiovascular asociados

Se realizó el análisis estadístico de los marcadores bioquímicos de estrés oxidativo cuantificados en orina, encontrándose los siguientes resultados.

En cuanto a los niveles de biomarcadores de estrés oxidativo cuantificados en orina de sujetos enfermos comparado con el grupo de sanos, se encontraron elevados, sin embargo existe diferencia significativa al realizar las pruebas estadísticas. Así como disminución del óxido nítrico en el grupo de enfermos sin embargo no fue estadísticamente existió una diferencia estaística significativa; los resultados se muestran en el cuadro 2 y figura 6.

	Enfermos N 82	Sanos N 12	P
Oxido Nitrico	12.8 ± 63.05	16.08 ± 30.81	0.44
MDA	57.09 ± 57.31	30.93 ± 18.82	0.06
AGEs	7.57 ± 4.94	6.06 ± 2.02	0.14
AOPPs	37.41 ± 57.34	18.26 ± 15.66	0.12
Tioles	38.53 ± 45.05	26.42 ± 10.30	0.16
CAE VC	3.7 ± 1.7	3.03 ± 1.2	0.10

Cuadro 2 . Niveles urinarios de marcadores de estrés oxidativo urinarios en pacientes sanos y enfermos.

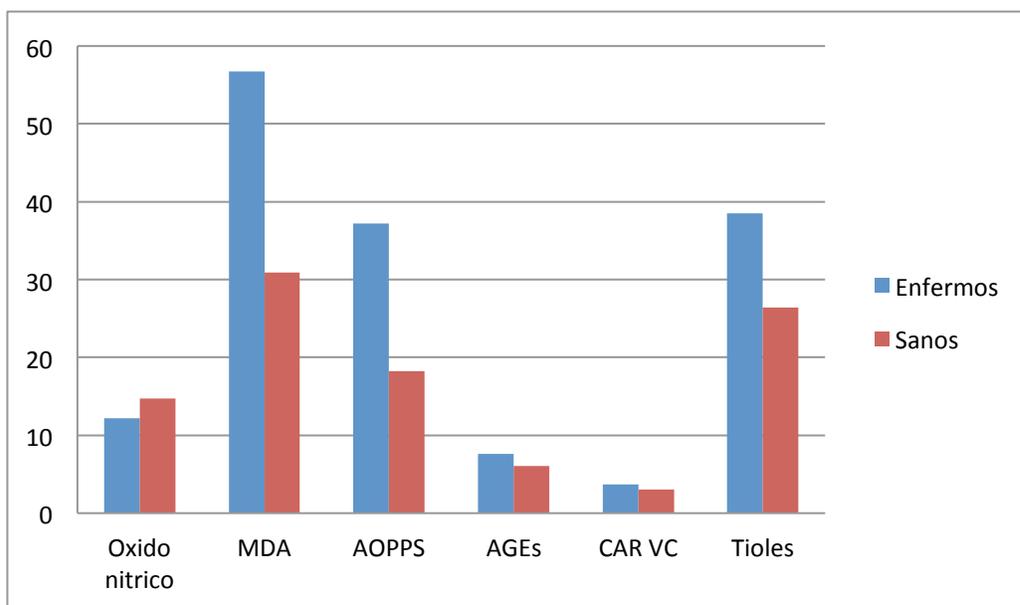


Figura (6) . Marcadores de estrés oxidativo urinarios en pacientes sanos comparado con enfermos

En cuanto a los niveles de biomarcadores en sujetos con alguna enfermedad y DM comparado con enfermos crónicos sin DM se encontraron elevados sin embargo no hubo diferencia significativa entre ambos grupos, los resultados de presentan en la figura 7 y cuadro 3.

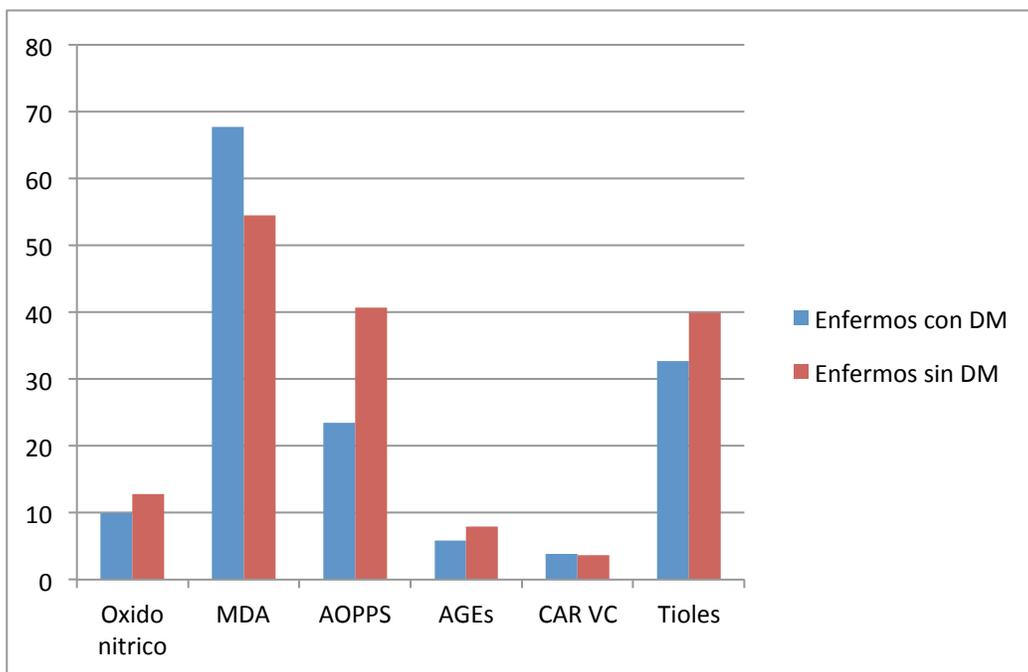


Figura 7 . Niveles urinarios de marcadores de estrés oxidativo en pacientes enfermos con diabetes comparado con enfermos sin DM.

	Enfermos con DM n 16	Enfermos sin DM n 66	P
Oxido Nítrico	9.93 ± 23.44	12.77 ± 69.46	0.43
MDA	67.78 ± 71.33	54.50 ± 53.20	0.20
AGEs	7.98 ± 5.27	5.85 ± 2.77	0.61
AOPPS	23.75 ± 22.36	40.73 ± 62.65	0.46
Tioles	39.95± 47.19	32.67 ± 17.74	0.27
CAE VC	3.80 ± 1.56	3.72 ± 1.84	0.40

Cuadro 3 . Marcadores de estrés oxidativo urinarios en pacientes enfermos con y sin DM

En la figura 8 y cuadro 4 se presentan los resultados de las mediciones urinarios de oxidantes y antioxidantes. Se obtuvo un nivel elevado de AGEs con significancia estadísticas, p de 0.01

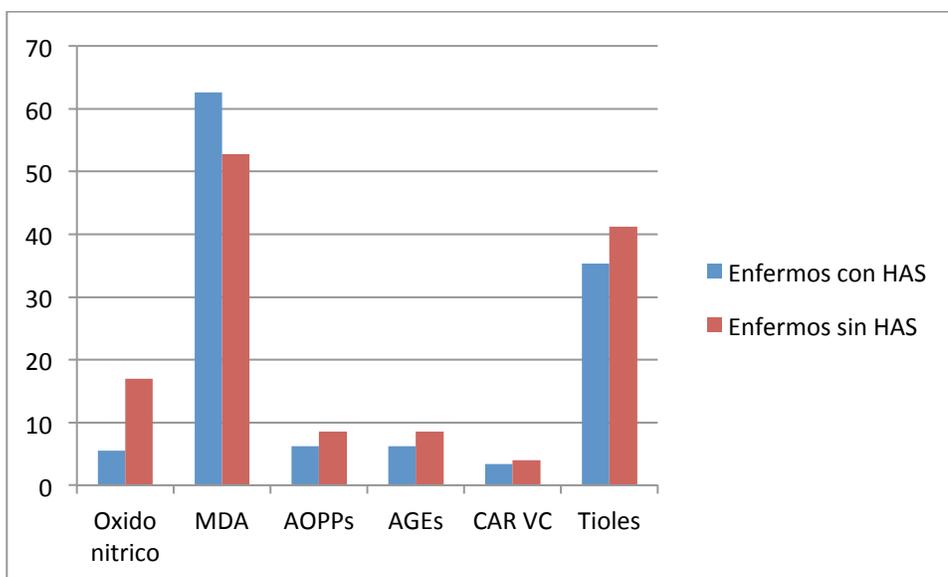


Figura 8. Marcadores de estrés oxidativo urinarios en pacientes enfermos con HAS y sin HAS

	Enfermos con HAS (n 35)	Enfermos sin HAS n (48)	P
Oxido Nitrico	5.05 ± 81.20	16.97 ± 46.54	0.21
MDA	62.59 ± 63.25	52.82 ± 52.24	0.22
AGEs	6.23 ± 2.87	8.56 ± 5.81	0.01
AOPPs	43.75 ± 69.97	38.95 ± 62.86	0.37
Tioles	35.32 ± 32.40	41.23 ± 49.26	0.26
CAR VC	3.38 ± 1.52	4.03 ± 1.92	0.07

Cuadro 4. Marcadores de estrés oxidativo urinarios en pacientes enfermos con HAS y sin HAS

Comparando niveles de biomarcadores entre sujetos enfermos con DM2 y sanos, se encontró una elevación significativa de MDA, con un máximo 289.83 y un mínimo 67.78, encontrándose una media 67.78 de con DE \pm 71.33, en sujetos con DM2, y una media de 30.93 y DE \pm 18.82 de en sujetos sanos, con un p de significativa de 0.04. El resto de resultados se presentan en la figura 9 y cuadro 5.

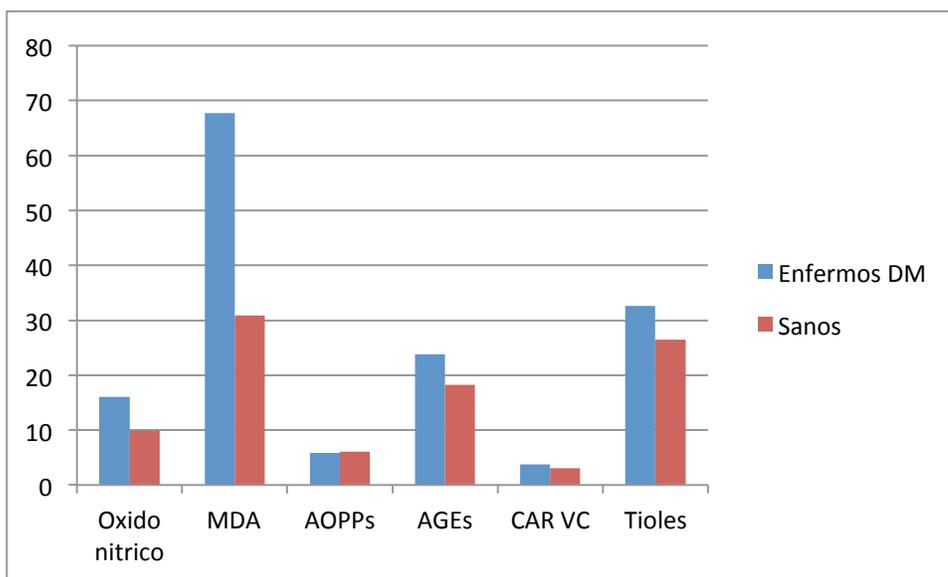


Figura 9. Marcadores de estrés oxidativo urinarios en pacientes enfermos con DM y pacientes sanos

	Enfermos con DM (n 16)	Sanos n (12)	P
Oxido Nitrico	9.93 \pm 23.44	16.08 \pm 30.81	0.28
MDA	67.78 \pm 71.33	30.93 \pm 18.82	0.04
AGEs	5.85 \pm 2.77	6.06 \pm 2.02	0.41
AOPPs	23.75 \pm 22.35	18.26 \pm 15,66	0.23
Tioles	32.62 \pm 17.74	26.42 \pm 10.30	0.14
CAR VC	1.56 \pm 1.56	3.03 \pm 1.28982	0.08

Cuadro 5. Marcadores de estrés oxidativo urinarios en pacientes enfermos con DM y pacientes sanos

La comparación de niveles urinarios de marcadores de estrés oxidativo entre sujetos enfermos con HAS y pacientes sanos, se encontró una elevación significativa de niveles de MDA, encontrándose una media de 62.59 ± 63.25 en pacientes enfermos, comparada con una media de 30.93 ± 18.82 en pacientes sanos, y una P significativa de 0.04. En cuanto al resto de marcadores se encontró una elevación no significativa en el grupo de pacientes con HAS y un nivel urinario menor de oxido nítrico con una P 0.33, no significativa. El resto de los resultados se presentan en el cuadro 6, figura 10.

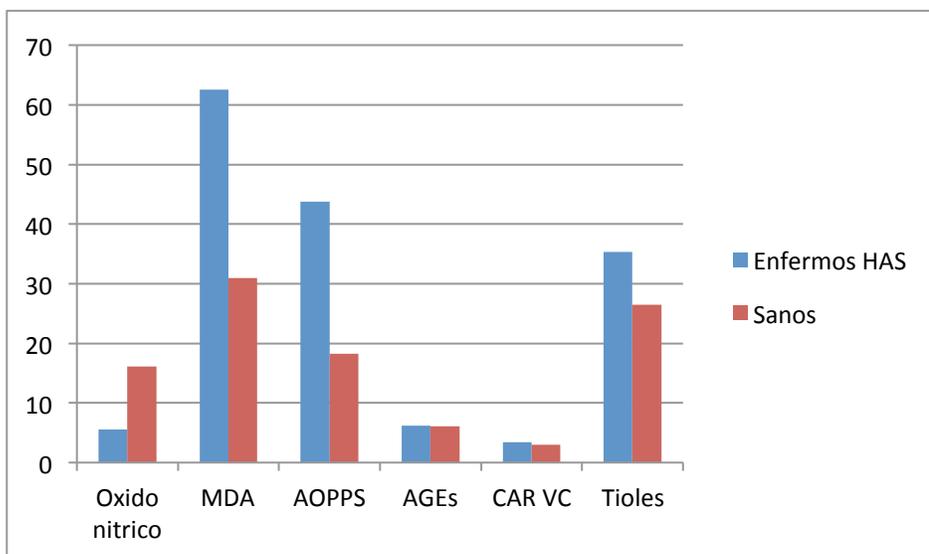


Figura 9 . Marcadores de estrés oxidativo urinarios en pacientes enfermos con HAS y pacientes sanos

	Enfermos con HAS (n 35)	Sanos n (12)	P
Oxido Nítrico	5.50 ± 81.20	16.08 ± 30.81	0.33
MDA	62.59 ± 63.25	30.93 ± 18.82	0.04
AGEs	6.23 ± 2.87	6.06 ± 2.02	0.44
AOPPs	43.75 ± 69.97	18.26 ± 15.66	0.11
Tioles	35.32 ± 32.40	26.42 ± 10.30	0.17
CAR VC	3.39 ± 1.58	3.03 ± 1.28	0.23

Tabla 6. Marcadores de estrés oxidativo urinarios en pacientes enfermos con HAS y pacientes sanos

Análisis.

En el presente estudio Se incluyeron 94 pacientes, de los cuales, 82 presentaban alguna patología crónica, siendo las enfermedades renales y los padecimientos reumatológicos los más prevalentes, constituyendo el 71% de las patologías. En la actualidad, se reconoce que dichas patologías aumentan el riesgo de presentar enfermedades cardiovasculares. La disminución del filtrado glomerular (menor de 70 ml/min) y estadios finales de la enfermedad renal incrementan el riesgo de muerte y eventos cardiovasculares. Sin embargo son pocos los estudios que han evaluado dicha asociación, en NHANES II se encontró incremento del 51% de muerte por causa cardiovascular en pacientes con una filtrado glomerular menor de 70 ml/min, comparado con pacientes con función renal normal (FG de 90 ml/min)^{88,89}. Diversos autores han demostrado un aumento de eventos y muerte por enfermedad cardiovascular en pacientes con enfermedades reumatológicas. Los pacientes con LES y AR presentan una mayor frecuencia y a edades más tempranas que la población general fenómenos de aterosclerosis subclínica, eventos vasculares clínicos y mortalidad de causa cardiovascular^{90,91,92}. En un estudio prospectivo, Manzi y cols. compararon el riesgo de IAM en una población de 498 pacientes con LES verificada con la cohorte tradicional de Framingham y demostraron un riesgo 50 veces mayor de presentar un IAM en las mujeres LES de 35-45 años⁹³

Se encontró, en la población de sujetos enfermos una alta prevalencia patologías crónicas asociadas, consideradas factores de riesgo cardiovascular clásicos. La prevalencia de HAS en los sujetos en estudio fue de 35%, mayor comparada con el 30% de la prevalencia nacional. Así también existe mayor número de pacientes con diagnóstico de DM2 en dicho grupo, comparada con los datos obtenidos en la ENSA 2000, encontrándose una prevalencia de 16%, la cual es mayor comparada con la prevalencia nacional del 7%.

A pesar las prevalencia alta de HAS, DM2 e hipercolesterolemia importante resaltar, el hecho de que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles séricos urea, creatinina, glucosa en ayuno, colesterol, triglicéridos ni clínicas en ambos grupos.

Por lo que resalta de importancia el hecho de que hallamos elevación de los niveles urinarios de MDA en sujetos con DM de 67.78 ± 71.33 comparado con 30.93 ± 18.82 con significancia estadística ($P=0.04$) Estos resultados coinciden con el hecho de que diversos estudios han encontrado niveles elevados séricos y urinarios de productos de oxidación de lípidos en sujetos con DM. G Noberasco y colaboradores encontraron en 67 pacientes con DM1 y 2 niveles elevados de MDA comparada con sujetos sanos. Los pacientes con mal control metabólico mostraron la mayor concentración plasmática de MDA, significativamente respecto al grupo con un mejor control: Hemoglobina glucosilada (GHb) $<10\% = 2.77 \pm 0.28$ MDA nmol / ml - GHb $> 10\% = 4.22 \pm$

0,39 MDA nmol / ml ($z = 2.10$, $\alpha < 0.02$); Glucemia en ayuno < 150 mg / dl = MDA 2.74 ± 0.32 nmol / ml y > 150 mg / dl = MDA 4.15 ± 0.37 nmol / ml ($z = 2.22$, $\alpha < 0.02$). El control glucémico parece influir en MDA plasmático, aumentando la producción de radicales libres. Se encontró una correlación entre el los niveles de hemoglobina glucosilada, así como glucosa de en ayuno independiente de los niveles de lípidos. El aumento de la producción de radicales libres pueden desempeñar un papel en la patogénesis de la vasculopatía del metabolismo⁹⁴ Por otro lado, Sebahat Nacítarhan y colaboradores encontraron aumento en niveles séricos y urinarios de MDA en pacientes diabéticos. Encontrándose niveles significativamente mayores en el grupo de pacientes con DM y dislipidemia. Confirmando así la presencia de trastorno de peroxidación lipídica en pacientes diabéticos⁹⁵.

Asi mismo, en el subgrupo de enfermos con HAS se encontró incremento de los niveles urinarios e MDA, por lo que consideramos que esta determinación, podría ser incorporada en la práctica médica como un prueba no invasiva, para detección disfunción endotelial, y temprana de detección de enfermedades cardiovasculares en sujetos con factores de riesgo cardiovascular clásicos sin embargo se requiere realizar más estudios de correlación de niveles sérico con urinarios de dicho biomarcador, y para determinar valores normales tanto séricos como urinarios en sujetos sanos.

Por otro lado la falta de diferencias estadísticamente significativas en cuanto a los niveles de marcadores antioxidantes podría deberse a la presencia de otras defensas antioxidantes, del grupo de los tioles como las metalotioneinas (MT), dado que hay que recordar que las MT-I y II son poderosos depuradores de radicales libres probablemente como una función de sus residuos de cisteina (sulfhidrilo)⁹⁶. Sin embargo, son varias las proteínas que contienen grupos sulfhidrilo (PSH) debido a su contenido de cisteina. De hecho, la concentración de PSH en células y tejidos es mayor que la de GSH⁹⁷. Estos grupos pueden presentarse como tioles (-SH), disulfuros (PS-SP), o como disulfuros mixtos, por ejemplo, (PS-SG) cuando se conjugan con GSH. Las proteínas pueden fijar GSH, cisteina, homocisteina, y γ -glutamilcisteina para formar disulfuros mixtos pero el GSH es el ligando dominante⁹⁸.

La oxidación del grupo tiol de una enzima o la reducción de su grupo disulfuro, puede dar como resultado la activación o inactivación de esta⁹⁹.

Es importante destacar que la S-tiolización-destiolización es un proceso dinámico que ocurre bajo condiciones fisiológicas en las células. Este proceso es reversible y las distintas proporciones en que este ocurre, es dependiente de la proteína la naturaleza de los grupos tioles y de la naturaleza de los grupos tioles en la proteína¹⁰⁰.

El estado de S- glutatiónización/ desglutatiónización debe en algún modo ser un reflejo del estado reductor del sistema GSH en la célula, es decir, la oxidación de las proteínas sulfhidrilos a disulfuros mixtos es una respuesta celular temprana al estrés oxidativo¹⁰¹. La formación de disulfuros mixtos puede ocurrir por varios mecanismos:

A) oxidación de una proteína tiol, seguido por la reacción con GSH.



B) oxidación de un electrón de la PSH o el GSH, después de la formación de un disulfuro



C) O por reacciones de intercambio de tiol o disulfuro.



Estas reacciones demuestran que las proteínas sulfhidrilo pueden desempeñar un papel en la red antioxidante de las células y de este modo influyen el ambiente reductor. Esto ha sido demostrado durante el estallido respiratorio de los neutrofilos, donde más del 17% del GSH puede venir ligado a proteínas¹⁰². Sin embargo las reacciones 4 y 5 restauran el GSH celular; la reacción 4 no solo restaura GSH, si no que remueve GSSG, manteniendo el potencial reductor de la relación GSSG/2GSH. Esta reacción conservaría el glutatión de la célula y funcionaria como buffer por su potencial reductor. Sin embargo la salida de GSSG para contrarrestar el estrés oxidativo podría resultar en la pérdida de glutatión de la célula, de este modo disminuyendo la capacidad

reductora, la cual podría solo ser restablecida por la síntesis de nuevo GSH. Una vez que el estrés oxidativo se haya controlado y haya ocurrido una adecuada restauración de una apropiada razón de [GSH]/ [GSSG], PSH como la MT pueden retornar a los depósitos celulares por reacción del GSH con PS-SG:



GSH regenerado a partir GSSG a través de la Glutación Reductasa:



La destiolización de las proteínas, como la reacción 7 también aparenta ser un proceso enzima-dependiente. La proteína glutaredoxina disulfuro isomerasa y la tioredoxina reductasa son enzimas candidato que podrían facilitar esta reacción^{102, 103}.

Que tan eficazmente funcionen las proteínas sulfhidrilo como amortiguadores reductores dependerá de su relatividad con el GSH. Un ejemplo de esto se ha encontrado en los eritrocitos, donde se ha visto que la relatividad de PSH depende de la pKa del tiol y de las características estructurales, tales como accesibilidad¹⁰⁰. Del mismo modo, diversos estudios han demostrado que la S-glutatioilización de proteínas es reversible después del estrés oxidativo¹⁰². Dado que el estado reductor de la célula depende tanto de su potencial de reducción y de su capacidad reductora, las proteínas sulfhidrilo podrían ser muy importantes es el mantenimiento del ambiente reductor celular; PSH pueden servir como un amortiguador para mantener el potencial de reducción del GSSG/2GSH; Estos depósitos de PSH en las células mantiene la capacidad del sistema GSH de contener el estrés oxidativo¹⁰⁴.

De hecho, se considera al GSH un transportador "in vivo" del oxido nítrico a través de la formación de grupos S-NO. De hecho se ha demostrado la formación de Complejos con NO con poder antioxidante en la isquemia, generandose nitroso glutatión (GSNO); el cual es 100 veces más potente que GSH y se considera como un modulador de la liberación de metales por parte de la Metalotioneína en ausencia de oxido nítrico^{105,106,107}. Diversos autores reportan un incremento en la liberación de metales por parte de la MT en presencia de GSSG e incluso una ligera pero firme captación de metales bajo la influencia del GSH¹⁰⁶. Además del oxido nítrico es probable que el

ONOO⁻ desempeñe un papel importante en la liberación de metales de las isoformas de la metalotioneína (MT), ya que se ha sugerido que la descomposición del peroxinitrito a un pH fisiológico, constituye el principal componente de la citotoxicidad del óxido nítrico¹⁰⁸. Esto podría ocurrir a través de la ampliación de la señal de transducción de los mecanismos que involucran al NO como la agregación plaquetaria, el control de la presión sanguínea y sus influencias en la neurotransmisión por la estimulación de la vía de la guanilato ciclasa¹⁰⁹. Por el contrario, la bioactivación del glutatión dependiente de peroxinitrito involucra la estimulación de la guanilatociclasa, lo cual podría desempeñar un papel clave del glutatión en la liberación de metales mediada por NO y/o ONOO⁻ por parte de las isoformas de la MT¹¹⁰. Existen algunos reportes que mencionan que la liberación de metales de la metalotioneína II (MT II) inducida por el NO y ONOO⁻ es suprimida por el GSH pero no por el GSSG, probablemente por que el GSH reacciona más rápidamente con el NO, o que el β- dominio de la metalotioneína fija GSH¹¹¹ y de este modo bloquea la nitrosilación de ciertos sitios. El compuesto resultante de esto (el GSNO) funciona como un transportador de NO in vivo y actúa como un donador de NO que sufre una liberación homolítica espontánea de radicales del óxido nítrico (NO)^{112,113,114}. Es por esto que las concentraciones milimolares de GSH presentes en las células, podrían evitar la liberación de los metales contenidos en la metalotioneína, a través de un mecanismo mediado por el óxido nítrico y el peroxinitrito. A su vez, las enzimas que incrementan los niveles de GSSG, (como la GPx) y otro tipo de disulfuros, podrían promover la liberación de metales (particularmente el zinc) por parte de los grupos tiol de la MT^{115,116}. La afinidad de estos grupos por los radicales libres es muy alta¹¹⁷. De este modo como los tioles de las isoformas de MT actúan como blancos para el ONOO⁻, ácido peroxinitroso y NO⁺¹¹⁸, es probable que puedan interceptar radicales libres. Esto porque los grupos Sulfuro son un blanco nucleofílico conocido de nitrosilación. El producto de esta reacción es un S-nitrosotiol (RS-NO) (Stamler et., al. 1992). De esta manera, la MT podría atrapar equivalentes del NO⁺ disminuyendo su lesión oxidativa. La reacción del NO con proteínas no-heme transportadoras de hierro y la inhibición de enzimas con complejos de sulfuro ferroso (FeS), los cuales son blancos celulares importantes de los daños ocasionados por el NO, sugiere que las propiedades antioxidantes de la MT podrían deberse a la formación de complejos hierro- nitrosotiol, de manera secundaria al secuestro de metales de transición por esta proteína¹¹⁹.

Otros han sugerido que los residuos de cisteína de la MT podrían funcionar como un objetivo expandible de las especies reactivas de oxígeno¹²⁰.

Por lo que consideramos de capital importancia continuar con esta línea de investigación con la determinación de proteínas como las MT.

Conclusiones

Existen diferencias estadísticamente significativas en los niveles de MDA en los pacientes con DM2 y HAS, por lo que consideramos que esta determinación, podría ser incorporada en la práctica médica como un prueba no invasiva, para detección disfunción endotelial, y la detección temprana de enfermedades cardiovasculares en sujetos con factores de riesgo, sin embargo se requiere realizar más estudios de correlación de niveles sérico con urinarios de dicho biomarcador, y para determinar valores normales tanto séricos como urinarios en sujetos sanos.

Bibliografía.

1. National Center for Health Statistics. United States, 1990. DHHS Pub. N ° (HS) Washington: US Government Printing Office 1991; pp 91-1232)
2. National Heart, Lung and Blood Institute: Morbidity and Mortality Chartbook on Cardiovascular, Lung, and Blood Diseases, 1990. Washington, US Department of Health and Human Services, 1990
3. Velázquez Monroy O, Rosas Peralta M, Lara Esqueda A, Pastellí Hernández G, Grupo ENSA 2000, Fause Attie, et al. Hipertensión arterial en México: Resultados de la Encuesta Nacional
4. Hua C, Harrison D. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases. The role of oxidant stress. *Circ Res* 2000; 87: 840-844
5. Kodja G, Harrison D: Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res* 1999; 43: 562-571
6. Conrad KJ, Hughes SL, Hanrahan P y col: Classification of adult day care: a cluster analysis of services and activities. *J Gerontol Social Sciences* 1993; 48: S112-S122
7. Forster A, Young J, Langhorne P, on behalf of the Day Hospital Group: Systematic review of Day Hospital care for the elderly. *Br Med J* 1999; 318: 837 -841
8. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 2005; 54: 1615-25
9. Cai L. Suppression of nitrate damage by metallothionein in diabetic heart contributes to the prevention of cardiomyopathy. *Free Radic Biol Med* 2006; 41(6): 851-61
10. Jones DP. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 2006; 8(9-10): 1865-79
11. Griending KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: Basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation* 2003; 108 (16): 1912-6
12. Paim BA, Velho JA, Castilho RF, Oliveira HC, Vercesi AE. Oxidative stress in hypercholesterolemic LDL (low-density lipoprotein) receptor knockout mice is

associated with low content of mitochondrial NADP-linked substrates and is partially reversed by citrate replacement. *Free Radic Biol Med* 2008; 44 (3): 444-51

13. Halliwell B, Gutteridge JMC. (1989) *Free radical in biology and medicine*. Oxford: Clarendon; 1:142.
 14. Nosratola D. Vaziria, Yu-Shang Leeb, Ching-Yi Linb, Vernon W. Linc, Ram K. Sindhua. (2004) NAD(P)H oxidase, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and nitric oxide synthase expression in subacute spinal cord injury *Brain Research* 995 ; 76– 83.
 15. Nosratola D. Vaziria*, Yu-Shang Leeb, Ching-Yi Linb, Vernon W. Linc, Ram K. Sindhua. (2004) NAD(P)H oxidase, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and nitric oxide synthase expression in subacute spinal cord injury *Brain Research* 995 ; 76– 83.
 16. Matsubara, T. and Ziff, M. (1986) Superoxide anion release by human endothelial cells: synergism between a phorbol ester and a calcium ionophore. *J. Cell Physiol.* 127, 207-210.
 17. Hibbs, J.B., Taintor, R.R., Vavrin, Z. and Rachlin, E.M. (1988) Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157, 87-94.
 18. Kiedrowski, L., Costa, E., Wroblewski, J.T. Glutamate Receptor Agonists Stimulate Nitric Oxide Synthase in Primary Cultures of Cerebellar Granule Cells (1992) *J. Neurochem.* 58, 334-341.
 19. Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A. and Freeman, B.A. (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 1620-1624
 20. Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M. and Freeman, B.A. Peroxynitrite Oxidation of Sulfhydryls (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 4244-4250.
 21. Moreno, J.J. and Pryor, W.A. (1992). Inactivation of .alpha.1-proteinase inhibitor by peroxynitrite *Chem. Res. Toxicol.* 5, 425-428
-

22. Augusto, O., Gatti, R.M. and Radi, R. (1994) Spin-trapping studies of peroxynitrite decomposition and of 3-morpholinopyridone N-ethylcarbamide autooxidation: direct evidence for metal-independent formation of free radical intermediates. *Arch. Biochem. Biophys.* 310, 118-125.
 23. Schonreich, C., Asmus, K.-D., Dillinger, U. and v. Bruchhausen, F. (1989) Thiyl radical attack on polyunsaturated fatty acids: a possible route to lipid peroxidation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161, 113-120.
 24. Winterbourn, C.C. (1993) Superoxide as an intracellular radical sink. *Free Radic. Biol. Med.* 14, 85-90.
 25. Koppenol, W.H. (1993) A thermodynamic appraisal of the radical sink hypothesis. *Free Radic. Biol. Med.* 14, 91-94.
 26. Schussler, H. and Delcinee (1983). Reactions of formate and ethanol radicals with bovine serum albumin studied by electrophoresis. *Int. J. Radiat. Biol.* 44, 17-29.
 27. Schussler, H. and Schilling, K. (1984) Oxygen effect in the radiolysis of proteins. Part 2. Bovine serum albumin *Int J. Radiat. Biol.* 45, 267-281.
 28. Clement, J.R., Armstrong, D.A., Klasson, N.V. and Gillis, H.A. (1972). Reactions of O_2^- , H_2O_2 and other oxidants with sulfhydryl enzymes. *Can. J. Chem.* 50, 2833-2840.
 29. Buchanan, J.D. and Armstrong, D.A. (1978). Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase-catalyzed Chain Oxidation of Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotides Yields Peroxyl Radical *Int. J. Radiat. Biol.* 33, 409-418.
 30. Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A. and Freeman, B.A. (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 1620-1624
 31. Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A. and Freeman, B.A. (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 1620-1624
 32. Simonian, N.A., Coyle, J.T., 1996. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann. Rev. Pharmacol.* 36, 83-106.
-

33. Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A. and Freeman, B.A. (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 1620-1624
 34. Hogg, N., Darley-Usmar, M., Wilson, M.T., Moncada, S., (1992). Production of hydroxyl radicals from the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide. *Biochem. J.* 281, 419-424.
 35. Gatti, R.M., Radi, R., Augusto, O., (1994). Peroxynitrite-mediated oxidation of albumin to the protein-thiyl free radical. *FEBS Lett.* 348, 287-290.
 36. Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M. and Freeman, B.A. (1991) Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 288, 481-487
 37. Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A. and Freeman, B.A. (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 1620-1624
 38. Hall E, Braugler J, (1993). Free radical in CNS injury. *Res Pul Assoc Res Nerv Ment Dis*; 71: 81-105
 39. Hexum T.D. Fried R, (1979) Effects of superoxide radicals on transport (Na +K) adenosine triphosphatase and protection by superoxide dismutase, *Neurochem. Res.* 4 73-82.
 40. Friguet B., Stadtman E.R., Szveda L.I., Modification of glucose-6- phosphate dehydrogenase by 4-hydroxy-2-nonenal. Formation of cross-linked protein that inhibits the multicatalytic protease, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 21639- 21643.
 41. Kooy N.W., Royall J.A., Ischiropoulos H., Beckman J.S., (1994) Peroxynitrite- mediated oxidation of dihydrorhodamine 123, *Free Radic. Biol. Med.* 16 149- 156.
 42. Jamme I., Petit E., Divoux D., Gerbi A., Maixent J.M., Nouvelot A., (1995) Modulation of mouse cerebral Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase activity by oxygen free radicals, *NeuroReport* 7 333-337.
-

43. Mark R.J., Lovell M.A., Markesbery W.R., Uchida K., Mattson M.P. (1997). A role for 4-hydroxynonenal, an aldehydic product of lipid peroxidation, in disruption of ion homeostasis and neuronal death induced by amyloid beta-peptide, *J. Neurochem.* 68 255–264
 44. Hall E, Braugler J, (1993). Free radical in CNS injury. *Res Pul Assoc Res Nerv Ment Dis*; 71: 81-105
 45. Nosratola D. Vaziria*, Yu-Shang Leeb, Ching-Yi Linb, Vernon W. Linc, Ram K. Sindhua. (2004) NAD(P)H oxidase, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and nitric oxide synthase expression in subacute spinal cord injury *Brain Research* 995 ; 76– 83.
 46. Maiorino M, Chu F, Ursoni F. (1991) GPx-PH is the 18 KDa seleno proteins expressed in human tumor cell lines. *J Biol Chem*;266(12):7728-32.
 47. Lam KW, Wang L, Hong BS, Treble D. (1993) Purification of phospholipid hydroxiperoxide glutathione peroxidase from bovine retina. *Curr Eye Res*;12(1):9-15.
 48. Zachara BA. (1991) Mamalian selenoproteins. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis*;6(3):137-45.
 49. Esworthy RS, Chu FF, Paxton RJ. (1991)Characterization and partial sequence of human plasma GPx. *Arch Biochem Biophys*;286(2):330-6.
 50. Avissar N, Slemmon JR, Palmer IS. Partial sequence of human plasma GPx and immunologic identification of milk GPx the plasma enzyme (1992). *J Nutr*;12(6):1243-9.
 51. Nakano T, Sato M, Takeuchi M. (1992) Partial purification and properties of GPx from carp hepatopancreas. *Comp Biochem Physiol*;102(1):31-5.
 52. Stepanik TM, Ewing DD. (1993) Isolation of glutathione peroxidase, catalase and superoxide dismutase of human erythrocytes. *J Biochem Biophys Meth*;20:157-69
 53. Takahashi K, Akasaka M, Yamamoto C, Kobayashi C, Mizoguchi J, Koyama J. (1990) Primary structure of human plasma glutathione peroxidase deduced from cDNA. *J Biochem (Tokyo)*; 108(2):145-8.
-

54. Behne D, Scheid S, Kyriakopoulos A. (1990) Subcellular distribution of seleno proteins in the liver of rat. *Biochem Biophys Acta*;26(3):219-25.
55. Panfili,E., Sandri,G, y Ernest, L. (1991) Distribution of Glutathione peroxidase and glutathione reductase in rat brain mitochondrial. *FEBS Lett* 290;35-3
56. Blum. J, y Fridovich(1984) Enzymatic defenses against oxygen toxicity in the hydrothermal vent animals *Riftia pachyptila* and *Calyptogena magnifica*. I. *Arch. Biochem Biophys.*; 228:617-620.
57. Gilbert, H. F. (1990) Meister, A., ed. *Advances in enzymology*. New York: Wiley Interscience;69 –173
58. Takahashi Y, Ogra Y & Suzuki KT (2005) Nuclear trafficking of metallothionein requires oxidation of a cytosolic partner. *J Cell Physiol* 202, 563–569.
59. Merad- Borudia, M., Nicole A., Satiard-Bron, D., Saille, C y Cevallos-Picot, I. (1998) Mitochondrial impairment as an early in the process of apoptosis induced by glutathione depletion in neuronal cells: relevante to Parkinson disease *Biochem. Pharmacol* 56: 645-655.
60. Heales S.J. R., Bolaños,J.P., Clark, J.B. (1996) Glutathione depletion is accompanied by increase neuronal nitric oxide synthase activity. *Neurochem Res* 21:35-39.
61. Heales S.J. R Davies, S.E.C,Beates T:E., Clark,J.B. (1995) Depletion of Brain glutathione is accompanied by impaired mitochondrial function and decrease N-acetyl aspartate concentration *Neurochem Res* 20:31-38.
62. Meister,A. Glutathione, ascorbate, and cellular protection. *J. Can.Res* 1994;54:1969-1975
63. Griffith, O. W.; Meister, A. Origin and turnover of mitochondrial Glutathione. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:4668–4672; 1985.
64. Schnellmann, R. G.; Gilchrist, S. M.; Mandel, L. J. Intracellular distribution and depletion of glutathione in rabbit renal proximal tubules. *Kidney Int.* 34:229–233; 1988.
65. Fernandez-Checa, J. C.; Kaplowitz, N.; Garcia-Ruiz, C.; Colell,A. Mitochondrial glutathione: importance and transport. *Semin.Liver Dis.* 18:389–401; 1998.

66. Bellomo, G.; Vairetti, M.; Stivala, L.; Mirabelli, F.; Richelmi, P.; Orrenius, S. Demonstration of nuclear compartmentalization of glutathione in hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4412–4416; 1992.
 67. Arrigo, A. P. Gene expression and the thiol redox state. *Free Radic. Biol. Med.* 27:936–944; 1999
 68. Martínez-Sánchez G, Popov I, Pérez-Davison G, Al-Dalaen S-M, Horwat-Delaporte R, Giuliani A, et al. Contribution to characterization of oxidative stress in diabetic patients with macroangiopathic complications. *Acta Farm Bonaerense* 2005; 24 (2): 197-203.
 69. Cai L. Suppression of nitrate damage by metallothionein in diabetic heart contributes to the prevention of cardiomyopathy. *Free Radic Biol Med* 2006; 41(6): 851-61.
 70. Kwon SH, Pimentel DR, Remondino A, Sawyer DB, Colucci WS. H₂O₂ regulates cardiac myocyte phenotype via concentration-dependent activation of distinct kinase pathways. *J Mol Cell Cardiol* 2003; 35 (6): 615-21.
 71. Watson WH, Chen Y, Jones DP. Redox state of glutathione and thioredoxin in differentiation and apoptosis. *Biofactors* 2003; 17 (1-4): 307-14.
 72. Das DK, Maulik N. Preconditioning potentiates redox signaling and converts death signal into survival signal. *Arch Biochem Biophys* 2003; 420 (2): 305-11.
 73. Haendeler J, Tischler V, Hoffmann J, Zeiher AM, Dimmeler S. Low doses of reactive oxygen species protect endothelial cells from apoptosis by increasing thioredoxin-1 expression. *FEBS Lett* 2004; 577 (3): 427-33.
 74. Li X, Xu Z, Li S, Rozanski GJ. Redox regulation of Ito remodeling in diabetic rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288 (3): H1417-24.
 75. Li X, Li S, Xu Z, Lou MF, Anding P, Liu D, et al. Redox control of K⁺ channel remodeling in rat ventricle. *J Mol Cell Cardiol* 2006; 40 (3): 339-49.
 76. Vanhoutte PM, Boulanger CM, Mombouli JV: Endothelium-derived relaxing factors and converting enzyme inhibition. *Am J Cardiol* 1995; 76: 3E-12E.
 77. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA: Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol REv* 1991; 43: 109-142.
-

78. Nand SS: Utilization of Partial Hospitalization programs. *Am J Psychiatry* 1990; 147: 1390 -1391.
79. ND, Wang XQ, Oveisi F y col: Induction of oxidative stress by glutathione depletion causes severe hypertension in normal rats. *Hypertension* 2000; 36: 142-146
80. Vaziri ND, Wang XQ, Oveisi F y col: Induction of oxidative stress by glutathione depletion causes severe hypertension in normal rats. *Hypertension* 2000; 36: 142-146.
81. 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): 2524-32.
82. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 1990; 186: 407-21.
83. Erdelmeier I, Gérard-Monnier D, Yadan JC, Chaudière J. Reactions of N-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Mechanistic aspects of the colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chem Res Toxicol* 1998; 11 (10): 1184-94.
84. Boehringer M. *Biochemical Information. Enzymes for routine.* 1st ed., Berlin: Boehringer Mannheim; 1987: 15-6.
85. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 1968; 25 (1): 192-205.
86. Nebot C: Spectrophotometric assay of superoxide dismutase activity based on the activated autoxidation of a tetracyclic catechol. *Anal Biochem* 1993; 214: 442 -451.31.
87. Cha MK, Kim IH: Glutathione -linked thiol peroxidase activity of human serum albumin: a possible antioxidant role of serum albumin in blood plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 222: 619 -625.
88. Muntner P, He J, Hamm L, Loria C, Whelton PK. Renal insufficiency and subsequent death resulting from cardiovascular disease in the United States. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:745-53.

89. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu C-Y. Chronic kidney disease and the risk of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med*. 2004;351:1296-305
 90. Asanuma Y, Oeser A, Shintani A, et al. Premature coronary-artery atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2003; 349(25):2407-15.
 91. Roman M, Shanker B, Davis A, et al. Prevalence and correlates of accelerated atherosclerosis in systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2003; 349(25):2399-406.
 92. Myllykangas-Luosujärvi R, Aho K, Kautiainen H, Isomäki H. Cardiovascular mortality in women with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1995; 22:1065-1067.
 93. Manzi S, Selzer F, Sutton-Tyrrel K, et al. Age-specific incidence rates of myocardial infarction and angina in women with systemic lupus erythematosus: comparison with the Framingham study. *Am J Epidemiol* 1997; 145:408-15.
 94. G Noberasco, P Odetti , D Boeri, M Maiello, L Adezati Malondialdehyde (MDA) levelin diabetic subjectsRelationship with blood glucose and glycosylated hemoglobin. Department of Internal Medicine, University of Genova, Viale Benedetto XV, 6 - 16132 Genova, Italy
 95. Sebahat Nacıtarhan, Tomris Özben, Neşe Tuncer Serum and urine malondialdehyde levels in NIDDM patients with and without hyperlipidemia *Free Radical Biology and Medicine*, Volume 19, Issue 6, December 1995, Pages 893-896
 96. Stankovic RK (2005) Atrophy of large myelinated axons in metallothionein-I, II knockout mice. *Cell Mol Neurobiol* 25, 943–953.
 97. Torchinsky, Y. M. Sulphur in proteins. Oxford, UK: Pergamon;1981.
 98. Seres, T.; Ravichandran, V.; Moriguchi, T.; Rokutan, K.; Thomas, J. A.; Johnston, R. B. Protein S-thiolation and dethiolation during respiratory burst in human monocytes. *J. Immunol.* 156:1973–1980; 1996.
-

99. Watanabe, A.; Tabeta, K.; Kosaka, K. Glutathione-dependent interconversion of microheterogeneous forms of glucose-6-phosphate dehydrogenase in rat liver. *J. Biochem. (Tokyo)* 72:695–701; 1972.
100. Di Simplicio, P.; Cacace, M. G.; Lusini, L.; Giannnerini, F.; Giustarini, D.; Rossi, R. Role of protein -SH groups in redox homeostasis—the erythrocyte as a model system. *Arch. Biochem. Biophys.* 355:145–152; 1998.
101. Thomas, J. A.; Poland, B.; Honzatko, R. Protein sulfhydryls and their role in the antioxidant function of protein S-thiolation. *Arch. Biochem. Biophys.* 319:1–9; 1995.
102. Seres, T.; Ravichandran, V.; Moriguchi, T.; Rokutan, K.; Thomas, J. A.; Johnston, R. B. Protein S-thiolation and dethiolation during respiratory burst in human monocytes. *J. Immunol.* 156:1973–1980; 1996
103. Mustacich, D.; Powis, G. Thioredoxin reductase. *Biochem. J.* 46:1–8; 2000.
104. Freya Q. Schafer and Garry R. Buettner (2001) Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the Glutathione Disulfide/Glutathione couple *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 30, No. 11, pp. 1191–1212,
105. Penkowa M, Camats J, Giralt M, Molinero A, Hernandez J, Carrasco J, Campbell IL & Hidalgo J (2003) Metallothionein-I overexpression alters brain inflammation and stimulates brain repair in transgenic mice with astrocyte-targeted interleukin-6 expression. *Glia* 42, 287–306.
106. Woo ES, Dellapiazza D, Wang AS & Lazo JS (2000) Energy-dependent nuclear binding dictates metallothionein localization. *J Cell Physiol* 182, 69–76
107. Trayhurn P, Duncan JS, Wood AM & Beattie JH (2000) Metallothionein gene expression and secretion in white adipose tissue. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 279, R2329–R2335.
108. West, A. K., Chuah, M. I., Vickers, J. C., & Chung, R. S. (2004). Protective role of metallothioneins in the injured mammalian brain. *Rev. Neurosci.*, 15, 157–166.

109. Ebadi M, Brown-Borg H, El Refaey H, Singh BB, Garrett S, Shavali S & Sharma SK (2005) Metallothionein-mediated neuroprotection in genetically engineered mouse models of Parkinson's disease. *Brain Res Mol Brain Res* 134, 67–75.
 110. Leila Khatai, Walter Goessler, Helena Lorencova and Klaus Zangger (2004). Modulation of nitric oxide-mediated metal release from metallothionein by the redox state of glutathione in vitro *Eur. J. Biochem.* 271, 2408–2416 FEBS.
 111. Carrasco J, Hernandez J, Bluethmann H & Hidalgo J (1998) Interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha type 1 receptor deficient mice reveal a role of IL-6 and TNF-alpha on brain metallothionein-I and -III regulation. *Brain Res Mol Brain Res* 57, 221–234.
 112. Tang CM, Westling J & Seto E (1999) trans repression of the human metallothionein IIA gene promoter by PZ120, a novel 120-kilodalton zinc finger protein. *Mol Cell Biol* 19, 680–689.
 113. Penkowa M, Poulsen C, Carrasco J & Hidalgo J (2002) M-CSF deficiency leads to reduced metallothioneins I and II expression and increased tissue damage in the brain stem after 6-aminonicotinamide treatment. *Exp Neurol* 176, 308–321.
 114. Takahashi Y, Ogra Y & Suzuki KT (2005) Nuclear trafficking of metallothionein requires oxidation of a cytosolic partner. *J Cell Physiol* 202, 563–569.
 115. Hainaur, P., and Milner, J. (1993) Redox modulation of p53 conformation and sequence-specific DNA binding in vitro. *Cancer Res.* 53,4469-447344.
 116. Maret, W. (1994) Oxidative metal release from metallothionein via zincthiol/disulfide interchange. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91,237-241 45.)
 117. Sato, M. & Bremner, I. (1993) Oxygen free radicals and metallothionein. *Free Radic. Biol. Med.* 14, 325–337.
 118. Radi, R., Beckman, J. S., Bush, K. M., and Freeman, B. A. (1991) Peroxynitrite oxidation of sulfurhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Biol. C/rem.* 266, 4244-425039.
 119. Schwarz, M.A., Lazo, J.S., Yalowich, J.C., Allen, W.P., Whitmore, M., Bergonia, H.A., Tzeng, E., Billiar, T.R., Robbins, P.D., Lancaster, J.R. Jr, et al. (1995)
-

Metallothionein protects against the cytotoxic and DNA-damaging effects of nitric oxide.

Proc. Natl Acad. Sci. USA. 92, 4452–4456.

120. Lazo, J. S., Kondo, Y., Dellapiazza, D., Michalska, A. E., Choo, K. H. A., and Pitt, B. R. (1995) Enhanced sensitivity to oxidative stress in cultured embryonic cells from transgenic mice deficient in metallothionein I and II genes. *Biol. Chem.* 270, 5506-5510)

ANEXO 1
CRONOGRAMA

Actividad	M 1	M 2	M 3	M 4	M 5	M 6	M 7	M 8	M 9	M 10	M 11	M 12
Búsqueda y estudio de la bibliografía												
Reclutamiento y toma de muestra												
Procesamiento de las muestras en laboratorio												
Análisis estadístico												
Redacción y presentación de resultados												

M = mes

ANEXO 3

Consentimiento Informado



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO URINARIO EN DISTINTAS ENTIDADES NOSOLOGICAS

Eduardo Becerril Varga (1) y Juan Manuel Gallardo Montoya (2)

Antes de que usted decida tomar parte en este estudio de investigación, es importante que lea, cuidadosamente, este documento.

El suscrito (paciente o usuario, o en su caso, familiar, tutor o representante legal)....., con numero de seguridad social (o identificación oficial)....., en pleno uso de mis facultades y en el ejercicio de mi capacidad legal, DECLARO lo siguiente:

1. Expreso mi libre voluntad de participar en un estudio de investigación para identificar los cambios bioquímicos urinarios, a través de la medición de biomarcadores en una muestra urinaria.
2. Así mismo acepto la toma de una muestra de sangre para medir los niveles de metabolitos del estrés oxidativo.
3. Entiendo que la toma sanguínea es relativamente segura y no me causara más molestias que las del procedimiento habitual. La muestra urinaria es totalmente indolora e inócua ya que al momento de orinar colocare una parte de ella en un recipiente especial.
4. El resultado no influirá en el tratamiento que recibo ni en la evolución o pronóstico de mi enfermedad.
5. Entiendo que participo de manera totalmente voluntaria por lo que no existe ninguna remuneración económica por mi participación en este estudio.
6. Declaro que me ha sido proporcionada la información completa sobre este estudio, en forma amplia, precisa y suficiente con un lenguaje CLARO Y SENCILLO.
7. Que se me ha permitido externar todas las dudas que me han surgido, derivadas de la información recibida, por lo que manifiesto estar enteramente satisfecho(a).
8. Ante la información proporcionada en forma completa sobre este estudio expreso mi CONSENTIMIENTO LIBRE, ESPONTANEO Y SIN PRESION alguna para que se realice el mismo.

México, Distrito Federal a.....de.....2011.

Nombre y firma del paciente, familiar o representante legal.

Nombre completo y firma del testigo

Nombre completo y firma del testigo