



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
DELEGACIÓN REGIONAL EN MICHOACÁN
HGR NO. 1 DE CHARO



TESIS QUE PRESENTA:

OCTAVIO CALDERÓN BUSTOS

PARA OBTENER EL GRADO DE

ESPECIALISTA EN MEDICINA DE URGENCIAS

TÍTULO:

**EVALUACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LOS PACIENTES
CON ENFERMEDAD VASCULAR CEREBRAL**

ASESOR

DR. JUAN MANUEL GALLARDO MONTOYA

INVESTIGADOR ASOCIADO "B"

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN ENFERMEDADES NEFROLÓGICAS

HOSPITAL DE ESPECIALIDADES. CENTRO MÉDICO NACIONAL "SIGLO XXI".

IMSS. MÉXICO, D.F.

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

COASESORES

DR. CARLOS ETVINO AÑORVE GALLARDO

ESPECIALISTA EN MEDICINA DE URGENCIAS MÉDICO-QUIRÚRGICAS

COORDINADOR AUXILIAR MÉDICO DE EDUCACIÓN EN SALUD

DR. SERGIO GUTIERREZ CASTELLANOS

JEFE DEL LABORATORIO HGR NO. 1

INVESTIGADOR PRINCIPAL

Dr. Octavio Calderón Bustos

Médico Residente RIII del curso de Especialización en Medicina de Urgencias

Hospital General Regional (HGR) No. 1 IMSS, Charo, Michoacán.

INVESTIGADORES ASOCIADOS

Dr. Sergio Gutiérrez Castellanos

Doctor en Ciencias Químico-Biológicas área de hematología

Jefe del Laboratorio Clínico del HGR No. 1. Charo Michoacán.

Dr. Carlos Etvino Añorve Gallardo

Médico Especialista en Urgencias Médico-Quirúrgicas del

HGR No. 1 en Charo, Michoacán.

Dr. Juan Manuel Gallardo Montoya

Maestro en Ciencias (Fisiología)

Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Nefrológicas. Hospital de

Especialidades. Centro Médico Nacional "Siglo XXI". IMSS. México, D.F.

IDENTIFICACION DE LOS INVESTIGADORES

DR. OCTAVIO CALDERON BUSTOS

Médico General

RIII del curso de Especialización en Medicina de Urgencias.

Hospital General Regional No. 1 IMSS Morelia Michoacán.

e-mail: ocbcbo@hotmail.com

Tél: 44-33-90-93-39

DR. SERGIO GUTIERREZ CASTELLANOS

Doctor en Ciencias Químico-Biológicas área de hematología

Jefe del Laboratorio Clínico del HGR No. 1.

e-mail: sergutica@yahoo.com.mx

Tel. (443) 312-48-49

Dr. CARLOS ETVINO AÑORVE GALLARDO

Médico Especialista en Urgencias Médico-Quirúrgicas del

HGR No. 1 en Charo, Michoacán.

e-mail: carlosaorve@gmail.com

Tél. 44-31-88-00-15

Dr. JUAN MANUEL GALLARDO MONTOYA

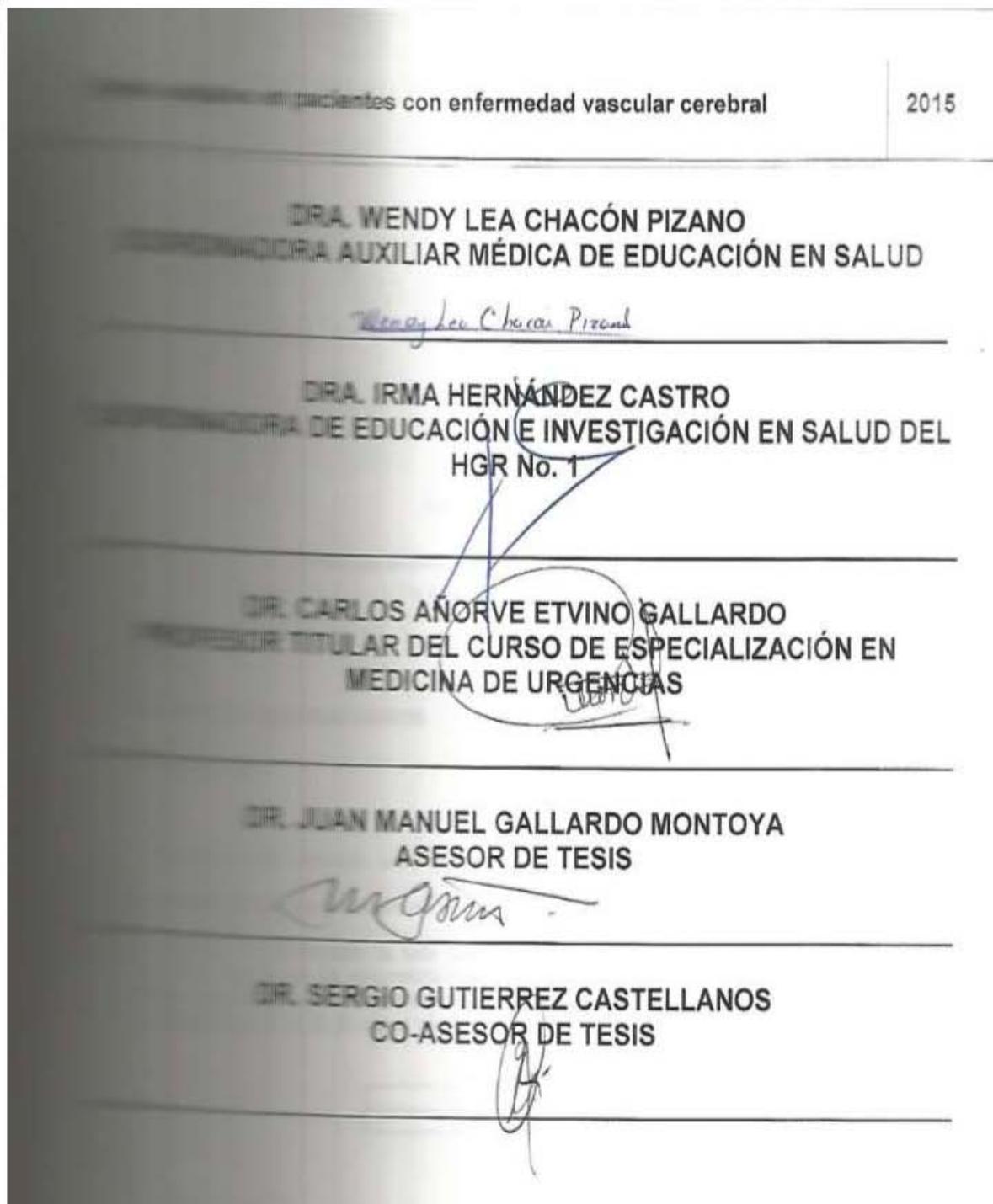
Maestro en Ciencias (Fisiología).

Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Nefrológicas, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional "Siglo XXI". México, D.F.

Correo-e: jmgallardom@gmail.com

Tél. +(55) 56276900 x 21371

DRA. WENDY LEA CHACÓN PIZANO



Carta Dictamen

Página 1 de 1

MÉXICO



Dirección de Prestaciones Médicas
Unidad de Educación, Investigación y Políticas de Salud
Coordinación de Investigación en Salud



IMSS, Hon. del Gobernador José María Morelos y Pavón

Dictamen de Autorizado

Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud 1603
H GRAL ZONA NUM 8, MICHOACÁN

FECHA 01/06/2015

DR. OCTAVIO CALDERÓN BUSTOS

PRESENTE

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

Evaluación del estrés oxidativo en los pacientes con Enfermedad Vascular Cerebral

que sometió a consideración de este Comité Local de Investigación y Ética en 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-2015-1603-11

RESULTAMENTE

AGRADECIMIENTOS

A mi madre Leonor, a mis hermanos María Elena, Marco Antonio y Marco Aurelio por el ejemplo de superación y profesionalismo que me han demostrado y por todo su apoyo incondicional para realizar mi especialidad.

A mis hijos; Marco Tulio y Santiago por su paciencia y apoyo que siempre me han brindado.

A mis amigos; García Rodríguez (QPD), Añorve, Sergio Gutiérrez, J.L.Cortés, Joel Nicolás, Domínguez, M. Sánchez Primo, Umbilia, Santos, Elisa, Kinday, Julio César, Castillo, Molina, Bravo, Miriam García, J.L.G.Merchán, Abrego, Arreola, Méndez, Alejandro Martínez, Wendy Chacón, Olmedo, Jiménez, Adriana y Cornejo por sus consejos, apoyo y enseñanzas.

Y especialmente a los Doctores: Juan Gabriel Paredes S., Cleto Alvarez y Juan Manuel Gallardo Montoya, quienes hicieron posible el llegar a esta meta y me enseñaron que con la perseverancia y el trabajo todo es posible.

ÍNDICE

CONTENIDO	PÁGINA
Resumen	1
Abstract	2
Marco teórico	3
Planteamiento del problema	18
Hipótesis	19
Justificación	20
Objetivos:	22
- General	22
- Particulares	22
Material y Métodos	23
- Diseño del estudio	23
- Población de estudio	23
- Tamaño de muestra	23
- Criterios de selección:	25
- Inclusión	25
- Exclusión	25
- Variables	25
- Descripción operativa del estudio	32
- Análisis estadístico	42
- Aspectos éticos	43

- Recursos financieros y factibilidad	44
Referencias bibliográficas	62
Anexos	74

ABREVIATURAS

ADN	Ácido deoxinucleico
AGEs	Productos avanzados de la glucosilación
AOPPs	Productos avanzados de la oxidación de proteínas
ATP	Adenosintrifosfato
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BHE	Barrera hemato-encefálica
Ca²⁺	Calcio citosólico
CAT	Catalasa
EO	Estrés oxidativo
ER	Especies reactivas
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
EROs	Especies reactivas de oxígeno
EVC	Enfermedad vascular cerebral
GTP	Glutathionperoxidasa
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
HNO₂	Ácido nitroso
HO₂	Hidroperóxido
HOBr	Ácido hipobromoso
HOCl	Ácido hipocloroso
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
MDA	Malondialdehído
N₂O₃	Trióxido de dinitrógeno

N_2O_4	Tetraóxido de dinitrógeno
NO^+	Catión hidroxilo
NO^-	Anión nitrosilo
NO_2^+	Catión nitrosilo
NO_2^-	Nitrito
NO_2	Dióxido de nitrógeno
NO_3^-	Nitrato
NUS.....	Sintasa del óxido nítrico
O_2	Anión superóxido
O_3	Ozono
OH.....	Radical hidroxilo
$ONOO^-$	Anión peroxinitrito
$ONOOH$	Ácido peroxinitroso
OOR.....	Peroxilo
OR.....	Alcoxilo
RL.....	Radicales libres
$RONOO$	Alquilperoxinitritos
SNC.....	Sistema nervioso central
SOD.....	Superóxidodismutasa

GLOSARIO

Enfermedad vascular cerebral	Grupo de enfermedades que afectan al sistema nervioso central cuyo origen es de tipo vascular.
Estrés oxidativo	Se define como la condición que ocurre cuando el balance fisiológico entre oxidantes y antioxidantes es alterado en favor de los primeros con potencial daño al organismo.
Oxidación	La oxidación es un proceso en el cual una sustancia química pierde (cede) electrones.
Reducción	La reducción es un proceso en el que la sustancia química gana (recibe) electrones.
Colesterol total	Tipo de grasa en sangre y que sus niveles altos es considerado factor de riesgo para ECV. (se mide en mg/dL)
Excitotoxicidad	Es una secuencia de eventos inducidos por un excesivo acúmulo de aminoácidos excitatorios llevando a incrementos tóxicos el calcio intracelular.
Cascada isquémica	Proceso que se presenta durante la isquemia cerebral y que cesa la producción celular de energía, con reducción de los niveles celulares de ATP y fosfocreatina. Fenómeno complejo que se presenta como resultado de la supresión o disminución del flujo sanguíneo cuyo resultado final es la pérdida irreversible de la viabilidad

	celular.
Productos avanzados de la oxidación de proteínas	Clase de moléculas derivadas de proteínas que contienen ditirosina formadas por el ESTRÉS OXIDATIVO.
Productos avanzados de la glicosilación	La acción de los azúcares reductores produciendo alteraciones permanentes en características físicas y en su función biológica.
Glicación	Es el resultado de la unión de una molécula de azúcar a una proteína o molécula lipídica sin la participación de ningún enzima.
Glucosilación	La unión de azúcares a proteínas o moléculas lipídicas, con la participación de enzimas.
Edad	Lapso de tiempo que transcurre desde el nacimiento hasta el momento de referencia (años).
Peróxidos	Los peróxidos son sustancias que presentan un enlace oxígeno-oxígeno y que contienen el oxígeno en estado de oxidación= -1. Generalmente se comportan como sustancias oxidantes.
Tioles	Un tiol es un compuesto que contiene el grupo funcional formado por un átomo de azufre y un átomo de hidrógeno. Siendo el azufre análogo de un grupo alcohol, este grupo funcional es llamado grupo tiol o grupo sulfhidrilo.

Oxido nítrico	Es un importante efector fisiológico y mensajero molecular en muchos sistemas biológicos, incluidos los inmunológicos, neuronales y cardiovasculares.
Genero	Sexo biológico con el que se nace.
Barrera hematoencefálica	La barrera hematoencefálica es una barrera entre los vasos sanguíneos y el sistema nervioso central. La barrera impide que muchas sustancias tóxicas la atraviesen, al tiempo que permite el pasaje de nutrientes y oxígeno.

1. RESUMEN

Introducción. La Enfermedad Vascular Cerebral (EVC) es la principal patología de las enfermedades del sistema nervioso con alta frecuencia de hospitalizaciones, causa de muerte e incapacidad. El estrés oxidativo es un mecanismo fisiopatológico que se desencadena con la supresión o disminución del riego sanguíneo al cerebro.

Objetivo. Evaluar algunos marcadores bioquímicos relacionados con el estrés oxidativo en pacientes con EVC en comparación a un grupo de sujetos con los factores de riesgo relacionados pero sin el evento isquémico.

Material y Métodos. En un estudio prospectivo, longitudinal, comparativo, se evaluaron los cambios bioquímicos del estrés oxidativo en pacientes con EVC. El análisis estadístico se realizó con ANOVA de una vía y una prueba a posteriori de Tukey.

Resultados. Los pacientes con EVC tuvieron valores mayores de marcadores bioquímicos pro-oxidantes y concentraciones menores de antioxidantes en comparación a los pacientes con los factores de riesgo pero sin el evento isquémico.

Conclusiones. En este estudio, se presentan evidencias entre la asociación de los antioxidantes particularmente la vitamina C y la SOD así como el óxido nítrico y el Malondialdehído como mediadores del estrés oxidativo. Se deberá, en estudios por venir, evaluar la acción de la vitamina C como una posible intervención farmacológica en la fase aguda del ictus para que atenúe o apague la cascada de generación de radicales libres y sus efectos nocivos.

Palabras clave. Estrés oxidativo, Evento vascular cerebral.

II. ABSTRACT

Introduction: The vascular cerebral disease (EVC) is the principal pathology of the diseases of the nervous system with high frequency of hospitalizations, cause of death and incapacity. The oxidative stress is a mechanism pathophysiological that is unchained with suppression or decrease of the blood flow to the brain.

Objective. Evaluating some biochemical markers related with the oxidative stress in patients with EVC comparatively to a group of subjects with the related risk factors but without the ischemic event.

Material and methods. It is a prospective, longitudinal, comparative study, biochemical changes in oxidative stress were evaluated in stroke patients. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA and Tukey test post.

Results. EVC patients had higher values of biochemical markers pro lower concentrations of oxidants and antioxidants compared to patients with risk factors but not the ischemic event.

Conclusions. In this study, evidence of the association between antioxidants particularly vitamin C and SOD and nitric oxide and malondialdehyde as mediators of oxidative stress are presented. It should, in studies to come evaluate the action of vitamin C as a posible pharmacological intervention in the acute phase of stroke to dim or turn off the cascade off free radical generation and its harmful effects.

Keywords. Oxidative stress, cerebral vascular event.

III. MARCO TEORICO

La Enfermedad vascular cerebral (EVC) es un síndrome clínico caracterizado como un déficit neurológico atribuido a un daño focal agudo del sistema nervioso central (SNC) de causa vascular incluyendo el infarto cerebral, la hemorragia intracerebral, la hemorragia subaracnoidea y el ataque isquémico transitorio (1). Ocupa el primer lugar dentro de las patologías del SNC, representando aproximadamente el 50% de las enfermedades neurológicas que requieren hospitalización (2), es la tercera causa de muerte en los países industrializados (3) y es la primera causa de invalidez. Se estima que aproximadamente 20% de los sobrevivientes requieren cuidados especiales durante 3 meses después del evento y casi el 30% quedan en una discapacidad grave permanente (4). La EVC es definida por la Organización Mundial de la Salud como la disminución brusca o pérdida de la conciencia, sensación y movimiento voluntario causado por la rotura u obstrucción de un vaso sanguíneo del cerebro (5). Entre 85 y 87 % de los casos son de tipo isquémico (aterotrombótico y/o cardioembólico) y del 10 al 15 % son de tipo hemorrágico (hemorragia cerebral y/o subaracnoidea), asociándose a una mortalidad global del 30 % aproximadamente; también es la segunda causa de demencia en el mundo (6,7,8). Las manifestaciones clínicas corresponden al área afectada y a la extensión del daño. La EVC isquémica el 80 % corresponden a un infarto cerebral caracterizado por una persistencia del déficit neurológico por más de 24 horas, y el 20 % a ataques de isquemia cerebral transitoria cuya característica es la recuperación del estado neurológico *al integrumen* un periodo de tiempo menor a 24 horas y sin evidencia de lesión neurológica comprobada preferentemente por Imagen

de Resonancia Magnética) (9). Sin embargo, pacientes con antecedente de ataques de isquemia cerebral transitoria tienen un mayor riesgo de padecer infartos cerebrales.

La EVC tiene una incidencia mundial de 150 a 200 por 100 mil habitantes/año, con una prevalencia de 5 millones, En México ocupa el sexto lugar como causa de mortalidad general, durante 2009 se reportaron un total de 25 836 defunciones con una tasa de 26,3 casos por 100 000 habitantes, se encuentra dentro de las 10 primeras causas de mortalidad en el grupo de edad productiva (15-64 años) con un total de 6 352 casos y una tasa de 10,5 por 100 000 habitantes, sin embargo, la mayor mortalidad la ocasiona en el grupo de edad post-productiva (mayores de 65 años) con un total de 19 192 defunciones y una tasa de 417,4 por 100 000 habitantes (10).

La causa más común de EVC es la repentina oclusión de un vaso sanguíneo por un trombo o un embolo, resultando la perdida casi inmediata de oxígeno y glucosa en el tejido cerebral. Aunque diferentes mecanismos están involucrados en la patogénesis de la EVC evidencias muestran que el daño isquémico y la inflamación se relacionan de manera directa en su progresión (11). La isquemia cerebral dispara las vías patológicas de la cascada de la isquemia causando finalmente daño neuronal irreversible a los pocos minutos de iniciado el evento isquémico (12). Sin embargo, en la zona de lesión iniciada por el evento isquémico, existe un gran volumen del tejido cerebral que cubre al núcleo isquémico, conocido como penumbra isquémica (zona de penumbra) que puede ser salvado si el flujo sanguíneo cerebral es rápidamente restaurado. Así, la definición de penumbra isquémica se refiere a áreas del cerebro que fueron dañadas pero no muertas, ofreciendo la oportunidad de que si se encontraran las terapias

apropiadas, se podría rescatar el tejido cerebral después de un evento isquémico y disminuir la discapacidad después del mismo.

Dentro de segundos a minutos después de iniciado el evento isquémico por una disminución o pérdida del flujo sanguíneo a una región del cerebro, la cascada isquémica se inicia rápidamente. La cascada isquémica comprende una serie de eventos bioquímicos subsecuentes que puede llegar a la desintegración de la membrana celular y muerte neuronal consecutiva si la isquemia es de suficiente intensidad y se prolonga por el tiempo necesario. Inicialmente se produce una depleción energética y se liberan moléculas que producen excitotoxicidad y estrés oxidativo en el tejido isquémico (cascada isquémica); al mismo tiempo, se pone en marcha una respuesta inflamatoria local, más prolongada en el tiempo, que puede amplificar el daño cerebral isquémico (cascada neuroinflamatoria). Por la interrelación que existe entre los diferentes elementos del SNC estas alteraciones no se pueden contemplar de forma aislada. Con el propósito de mantener un adecuado funcionamiento, las células del sistema nervioso interactúan entre sí y con la matriz extracelular. La neurona, los astrocitos y las células endoteliales representan una “Unidad neurovascular”(13). La “Unidad neurovascular” es un concepto que busca integrar los cambios que se producen en el tejido cerebral durante la isquemia, tales como la alteración de la barrera hematoencefálica por efecto de la activación de las metaloproteasas de matriz y los efectos que, a su vez, esta disrupción causa en los elementos de la unidad neurovascular.

Cascada Isquémica

Durante la isquemia cerebral cesa la producción celular de energía, con reducción de los niveles celulares de ATP y fosfocreatina. El fallo energético condiciona una despolarización de membrana, cuyo potencial depende de las bombas intercambiadoras de iones que, para mantener la homeostasis iónica, precisan ATP. Entre otros efectos, la despolarización anóxica determina un flujo de Ca^{2+} extracelular al interior de la célula, y una movilización del Ca^{2+} que se encuentra en el retículo endoplásmico hacia el citosol. Además la acidosis láctica provocada por el metabolismo anaeróbico de la glucosa desplaza el Ca^{2+} de su unión a proteínas intracelulares, aumentando aún más la concentración de Ca^{2+} libre intracelular (14). El aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} es decisivo en el proceso de daño celular que induce: a) liberación de neurotransmisores como el glutamato, responsable en gran parte de los fenómenos de excitotoxicidad, con síntesis y liberación de radicales libres en el tejido cerebral isquémico, b) inhibición de la producción de energía y c) activación de enzimas que intervienen en la degradación de proteínas, ácidos nucleicos y fosfolípidos.

Excitotoxicidad del glutamato.

La excitotoxicidad es una secuencia de eventos inducidos por un excesivo acúmulo de aminoácidos excitatorios llevando a incrementos tóxicos el calcio intracelular (15). El Ca^{2+} activa múltiples vías de señalización que llevan a necrosis o apoptosis por mecanismos mediados por enzimas con efecto sobre el receptor a glutamato como la

enzima $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ dependiente de energía, el ácido 1-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole propionico, y el ácido N-metil-D-aspartico que llevan a una alteración en el balance de los electrolitos como el Na^+ , Cl y Ca^{2+} , mayor actividad excitatoria en el cerebro que lleva a más influjo de Ca^{2+} , más liberación de glutamato y que finalmente causan la muerte celular.

Inflamación post-isquemia (cascada neuroinflamatoria)

Por muchos años se consideró que el SNC era un órgano inmune privilegiado. Sin embargo en la actualidad este concepto ha cambiado radicalmente pues la información disponible sustenta que existe una estrecha relación entre el sistema nervioso y el sistema inmune y que en el cerebro, como un órgano periférico, las células inflamatorias participan en la remodelación tisular después de daño cerebral. Las microglías son los macrófagos residentes en el cerebro y tienen un papel crítico como células fagocíticas en el SNC, como fue demostrado en un modelo de isquemia de la arteria cerebral media (16). Similarmente se ha demostrado que las microglías tienen un efecto neuroprotector al producir moléculas neurotróficas como el Factor Neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el Factor-1 de crecimiento similar a la insulina (IGF-1) y otros factores de crecimiento con potente efecto en la liberación de citosinas proinflamatorias como el Factor de necrosis Tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$) la Interleucina 1β ($\text{IL-1}\beta$) y la IL-6 entre otras, en respuesta a la isquemia cerebral (17). Los astrocitos, son capaces de secretar factores inflamatorios como son las citosinas, quemoquinas (18). El papel de las citosinas es el favorecer un aumento en la expresión

de las moléculas de adhesión. Este efecto es observado después de 4 a 6 horas de iniciado el evento isquémico observándose una adhesión de los leucocitos circulantes a la pared de los vasos, una migración hacia el cerebro con posterior liberación de mediadores pro-inflamatorios y daño secundario con afección en la zona de penumbra. Los cambios neuroinflamatorios post-isquémicos descritos llevan a una disfunción de la barrera hemato-encefálica, edema cerebral y muerte celular neuronal.

Disfunción de la barrera hemato-encefálica (BHE)

La alteración de la BHE en la isquemia aguda varía considerablemente (19). Los radicales libres y la inflamación son los dos factores que contribuyen al daño de la BHE. La matriz de metaloproteasas y las serinas proteasas son muy importantes en el tejido cerebral y son esenciales en la degradación de la matriz extracelular alrededor de los vasos sanguíneos cerebrales. Esta acción lleva a la destrucción de la BHE, edema, hemorragia y muerte celular (20). En la EVC además de la reacción pro-inflamatoria, los radicales libres también pueden afectar la actividad de la matriz extracelular por afectación de las metaloproteasas de forma directa e indirecta (21).

Estrés oxidativo (EO).

El estrés oxidativo (EO) contribuye en la patogénesis de un número importante de condiciones neurológicas incluyendo la EVC. El EO se define como la condición que ocurre cuando el balance fisiológico entre oxidantes y antioxidantes es alterado en favor de los primeros con potencial daño al organismo. Ese daño incluye la muerte

celular en el ataque isquémico por la formación de especies reactivas de oxígeno (EROs) a través de varios mecanismos como es la inhibición mitocondrial, sobrecarga de Ca^{2+} , el fenómeno de isquemia-reperfusión y la inflamación (22). Las EROs son generadas durante el ataque isquémico agudo siendo una evidencia importante que el EO es un mediador de daño tisular en el ataque isquémico agudo (23). La isquemia cerebral genera superóxido (O_2^-) que es el radical primario de donde el peróxido de hidrógeno es formado. El peróxido de hidrógeno es la fuente de radical hidroxilo (OH). El óxido nítrico (ON) es un radical libre soluble en agua y lípidos que es producido de la L-arginina por los diferentes tipos de sintasa de óxido nítrico (NOS). La isquemia causa un incremento en la actividad de las NOS tipo I y tipo III en las neuronas y en el endotelio vascular respectivamente (24,25), convirtiéndose en un blanco terapéutico de la EVC.

A pesar del papel fundamental biológico del oxígeno como un productor eficiente de la energía, una forma alterada del oxígeno - con modificaciones en los enlaces químicos clave que potencialmente pueden dar lugar a alteraciones en la estructura y función celular - contribuye a la aparición y progresión de varias enfermedades. Las especies reactivas de oxígeno (EROs) incluyen a los radicales libres (RL), ambos (que típicamente tienen un oxígeno o nitrógeno con un electrón desapareado en sus orbitales externos), y otras especies no precisamente radicales libres pero que se comportan como tales (por ejemplo, peróxido de hidrógeno) que actúan como potentes oxidantes (26).

Las oxidasas de las membranas mitocondriales y celulares (por ejemplo, la NADPH oxidasa) son fuentes importantes de EROs. Los subproductos asociados con el metabolismo del ácido araquidónico por la ciclooxigenasa, la lipoxigenasa, y el citocromo P-450 dan también como resultado la producción de EROs (27,28).

Casi todas las moléculas son susceptibles de ser dañadas por las EROs. Así, un grupo importante de moléculas son los lípidos (por ejemplo, ácidos grasos poliinsaturados en las membranas celulares y las lipoproteínas de baja densidad [LDL]), pero también se pueden dañar las proteínas, los carbohidratos y los ácidos nucleicos. Los productos de la peroxidación de lípidos reaccionan intensamente con diversos sustratos biológicos que conducen al daño celular (29). El daño oxidativo de los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos de la membrana conducen a la desestabilización en sus características intermoleculares de empaquetado, y la pérdida de integridad de la membrana. Los peróxidos de lípidos se descomponen en moléculas más pequeñas de forma covalente que permanecen ligados a la cadena principal del glicerol y los fosfolípidos o son liberados en el citosol. Además, las partículas de LDL oxidada no se unen con alta afinidad al receptor de LDL, induciendo así su circulación sanguínea e incrementando la captación por los macrófagos (30).

Además de los lípidos, otras moléculas constituyentes de la célula son vulnerables a los daños inducidos por EROs, especialmente los ácidos nucleicos que están relacionadas con el ácido deoxinucleico (ADN) mitocondrial y nuclear, y las proteínas citosólicas o plasmáticas. El daño inducido a los ácidos nucleicos se clasifica como roturas de la cadena, o por modificaciones de sus bases. En el caso de roturas de cadena, la modificación de ácido nucleico conduce a la mutagénesis como resultado de

la incorporación errónea de bases en el molde de ADN durante la reparación o replicación. Por otro lado, la oxidación de los aminoácidos asociados a las proteínas celulares también es vulnerable al daño inducido por EROs, lo que lleva a una pérdida de la función normal de las mismas. Los efectos de los productos de oxidación de proteínas (por ejemplo, residuos específicos alterados, productos de fragmentación, y productos reticulados reaccionan con otras moléculas intracelulares) pueden ser muy perjudiciales para la célula, por ejemplo perturbar las proteínas implicadas en el transporte o la regulación celular (31).

Concepto de oxidación

La oxidación es un proceso en el cual una sustancia química pierde (cede) electrones, y la reducción es un proceso en el que la sustancia química gana (recibe) electrones. La oxidación y la reducción ocurren simultáneamente y el número total de electrones cedidos es igual a los ganados. La sustancia química que cede electrones es el agente reductor y la sustancia química que recibe electrones es el agente oxidante (32,33).

Oxidación de sistemas biológicos

En el ser humano la oxidación es un proceso dinámico que se lleva a cabo constantemente, de tal manera, que los agentes causantes de la oxidación son los llamados oxidantes, como oxidantes se encuentran las especies reactivas de oxígeno (EROs) y las especies reactivas de nitrógeno (ERN). Estas especies reactivas (ER) se

generan principalmente dentro del organismo (intracelularmente y que actúan tanto dentro como fuera de la célula) y también son estimuladas por agentes del medio ambiente. Las ER que se producen en el organismo son causados por: el metabolismo normal (en la cadena de respiración a nivel mitocondrial), por eventos de hipoxia, agentes biológicos, modificaciones inmunológicas, alteraciones genéticas. Las ER que se producen en el organismo por agentes externos son originadas por: agentes físicos y químicos, además de que algunos déficits nutritivos pueden ocasionar que se produzca mayor oxidación a nivel sistémico (cuadro 1).

Cuadro 1. Agentes causantes de la oxidación en humanos.

Hipoxia	<p>Especialmente en el período de reperfusión (paradoja del oxígeno)</p> <p>Por isquemia o hipoperfusión sanguínea</p> <p>Por bloqueo del transporte de oxígeno</p> <p>Por interferencia en la cadena de transporte de electrones</p> <p>Por disminución del transportador</p>
Agentes biológicos	<p>La fagocitosis y posterior destrucción del agente agresor se acompañan de la formación del radical superóxido, peróxido de hidrógeno y oxidantes halogenados como el hipoclorito por la acción de la mieloperoxidasa</p>
Modificaciones inmunológicas	<p>Destrucción de las propias células por ERO en las patologías por autoagresión</p>

Alteraciones genéticas	Deficiencia de la oxidasa de la membrana del neutrófilo conduce a granulomatosis crónica; deficiencia de adenilato deaminasa; entre otras deficiencias.
Agentes físicos (radiación)	Radiolisis del agua y generación de radicales libres H· y ·OH Transferencia de un electrón a la molécula de oxígeno y generación de O ₂ ⁻
Agentes químicos	Ingesta de precursores de radicales libres (RL): - Fármacos - Aditivos químicos en alimentos procesados Inhalación voluntaria o accidental: - Tetracloruro de carbono - Tabaco
Déficits nutritivos	Sustancias que colaboran con la eliminación de RL - Vitamina C en fumadores - Glutación reducido - Vitamina E - Vitamina A - Flavonoides - Aminoácido (histidina, triptófano, cisteína, tirosina)

Tabla adaptada de Li YS, et al, 2012 (34); Narayanan A, et al., 2011 (35); Israel N,y Gouquerot-Pocidaló, 1997 (36); Lesser MP, 1996 (37); Deavall GD, et al., 2012 (38);Butterfield DA, et al., 2002 (39).

Las especies reactivas que se producen en el ser humano, ERO y ERN pueden ser benéficas o tóxicas, dependiendo de la concentración y de la continuidad en que se produzcan; y se pueden clasificar como radicales y no radicales (cuadro 2).

Los organismos están dotados de un sistema enzimático formado por varias enzimas, entre ellas la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GTP) (43), las cuales intervienen en la reducción de los intermediarios citotóxicos de oxígeno, entonces ocurre la reducción completa de oxígeno, que es el mecanismo fisiológico normal de defensa antioxidante. El grado de daño celular por estrés oxidativo también puede ser cuantificado fielmente por la determinación del malonildialdehído (MDA), que constituye un producto terminal de la peroxidación de lípidos de las membranas celulares.

Cuadro 2. Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.

	EROs	ERN
RADICALES	Anión superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) Hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) Peróxido($\cdot\text{OOR}$) Hidroperóxido(HO_2) Alcoxilo ($\cdot\text{OR}$)	Óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) (monóxido de nitrógeno) Dióxido de nitrógeno ($\text{NO}_2\cdot$)
NO RADICALES	Peróxido de hidrogeno(H_2O_2) Ácido hipocloroso (HOCl) Ozono (O_3) Oxígeno en singulete ($^1\text{O}_2$ forma $^1\Delta$) Ácido hipobromoso (HOBr)	Ácido nitroso (HNO_2) Ácido peroxinitroso (ONOOH) Alquilperoxinitritos (RONOO) Cation nitrosilo (NO^+) Cation nitronio (NO_2^+) Anión nitrosilo (NO^-) Tetraóxido de dinitrógeno (N_2O_4) Trióxido de dinitrógeno (N_2O_3) Aniónperoxinitroso(ONOO^-) Nitrito (NO_2^-) Nitrato (NO_3^-)

Tabla adaptada de Halliwell and Gutteridge 1989 (33); Docampo R, 1995 (400); Rice-Evans CAD,y Gopinathan UV, 1995 (41) y Evans MD, 2004 (42).

Daño isquemia-reperfusión

La cascada isquémica generalmente se prolonga por horas, aunque puede durar días, incluso después de que es restaurada la circulación sanguínea. Aunque la reperfusión del tejido cerebral isquémico es crítico para restaurar la función normal. Paradójicamente ello puede resultar en daño secundario, llamado daño por isquemia-reperfusión.

El mecanismo fisiopatológico con respecto al fenómeno de isquemia-reperfusión permanece poco comprendido; sin embargo, los mediadores del EO como las EROs liberadas por las células inflamatorias alrededor de las áreas dañadas por el proceso de isquemia-reperfusión, se ha sugerido tiene un papel crítico (44). El incremento en los radicales libres de oxígeno favorece la expresión de un número importante de genes pro-inflamatorios por inducir la síntesis de factores de transcripción, que incluyen el *Nf-kB*, el factor-1 inducible por isquemia, el factor-1 regulador de interferón, y la STAT3. Como resultado, se observa un incremento en la liberación de citosinas en el tejido cerebral y consecuentemente, la expresión de moléculas de adhesión en la superficie de las células endoteliales es inducida, incluyendo las moléculas 1 de adhesión intercelular (ICAM-1) y P-selectina y F-selectina que median la adhesión de los leucocitos al endotelio en la periferia de la zona infartada (45). Además la cascada del complemento se ha demostrado tiene también un rol importante en el daño por la isquemia-reperfusión (46). Además al daño celular directo, regionalmente el cerebro induce en el fenómeno de isquemia-reperfusión una respuesta inflamatoria que

comprende la activación del complemento y la generación de fragmentos activos como las anafilotoxinas C3a y C5a.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La EVC es un problema de salud pública. De acuerdo con la organización mundial de la salud, la EVC constituye la segunda causa global de muerte (9.7%), de las cuales 4.95 millones ocurren en países con ingresos medios y bajos (50). Su tasa de recurrencia a 2 años, va del 10 al 22%, pero puede reducirse hasta en 80% con la modificación de factores de riesgo (51). De no existir intervenciones de prevención adecuadas, se calcula que para el año 2030, su incidencia se incrementará hasta 44% (52). Datos de la Secretaría de Salud de México muestran que en nuestro país la tasa de mortalidad por EVC se ha incrementado a partir del año 2000, particularmente en menores de 65 años (53). Durante el 2007 del total de egresos en hospitales públicos el 1% fue atribuido a EVC, mientras que en el 2008, la tasa de mortalidad fue de 28.3/100,000 habitantes (54). La EVC es la principal causa de morbilidad y mortalidad atribuida a las enfermedades neurológicas, y una de las principales causas de ingreso a las Unidades de Urgencias. Se ha encontrado que el proceso de estrés oxidativo se altera en esta patología motivo por lo cual consideramos de interés el estudiar cómo se encuentran los marcadores oxidantes y antioxidantes en los pacientes con EVC que son atendidos en el servicio de Urgencias del HGR No. 1 de Charo, Michoacán, por lo que nos hacemos la siguiente pregunta:

¿Cómo se encuentran algunos de los marcadores pro y antioxidantes en los pacientes con EVC?

V. HIPÓTESIS

Existe mayor concentración plasmática de los marcadores pro-oxidantes en los pacientes con EVC en comparación con sujetos con factores de riesgo para EVC pero sin el evento isquémico.

VI. JUSTIFICACION

Actualmente, las enfermedades cardiovasculares ocupan una de las primeras causas de morbilidad y mortalidad en la población general (47, 48). De ellas la cardiopatía isquémica donde se incluye el IAM es una de las principales patologías de la población adulta y son la primera causa de mortalidad entre ellos (49) (Programa General de Salud 2007-2012). No menos importante es la EVC siendo la patología más frecuente del SNC con tasas altas de mortalidad y cuando el paciente no muere, altamente incapacitante. Ambas patologías se relacionan con cambios muy profundos en la función celular atribuido principalmente a la necrosis celular y que lleva a una alteración en el proceso oxidativo. En el ser humano la oxidación es un proceso dinámico que se lleva a cabo constantemente, de tal manera, que los agentes causantes de la oxidación son los llamados oxidantes entre los que destacan las EROs y las ERN. En condiciones de estrés como la EVC estos marcadores de estrés oxidativo se ven alterados lo que favorece mayor daño celular. Las causas de daño celular posteriores a una isquemia son multifactoriales; sin embargo, existe una creciente evidencia que sugiere que las especies reactivas de oxígeno, aniones superóxido, peróxido de hidrogeno y radical hidroxilo altamente reactivo pueden jugar un papel importante en su patogénesis. El EO resultado de la generación de especies reactivas de oxígeno que está implicado en el daño neuronal inducido por reperfusión isquémica, y la actividad antioxidante del plasma, pueden ser un factor importante para la protección contra el daño neurológico causado por el estrés oxidativo asociado al EVC. La formación incrementada de RL junto con una reducción de la defensa antioxidante genera el estrés oxidativo. Lo

anterior, ha llevado a diversos grupos de investigación búsqueda de diversas innovaciones terapéuticas entre otras la trombolisis, fármacos neuroprotectores y terapias invasivas, introducidas durante las últimas dos décadas para el manejo de los pacientes con EVC. Los reportes de estas estrategias son alentadoras en cuanto a disminución de morbimortalidad y una elevada tasa de recuperación ha originado un cambio de actitud en relación a la atención tanto extrahospitalaria como hospitalaria de este padecimiento. Basados en la idea y en el hecho de que el tiempo en que se inicia el tratamiento es muy importante para proteger al cerebro, se considera que la atención de los pacientes con EVC constituye una urgencia en medicina y que por tanto su atención debe ser priorizada.

VII. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar algunos de los marcadores bioquímicos relacionados con el estrés oxidativo en los pacientes con EVC en comparación con sujetos con factores de riesgo para EVC pero sin el evento isquémico.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Cuantificar los siguientes marcadores de oxidación (óxido nítrico y Malondialdehído) en pacientes con EVC y compararlos con sujetos con factores de riesgo para EVC pero sin el evento isquémico.
2. Cuantificar los siguientes marcadores de antioxidación (vitamina C, y superóxido de dismutasa) en pacientes con EVC y compararlos con sujetos con factores de riesgo para EVC pero sin el evento isquémico.

VIII. MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño del Estudio

Estudio prospectivo, longitudinal, observacional y comparativo.

Población de estudio

Se incluyeron todos los pacientes que llegaron al servicio de Urgencias del Hospital General Regional No. 1 (HGR No.1) de Charo Michoacán, con manifestaciones clínicas que sugerían EVC del tipo de Ataque de isquemia cerebral transitorio, infarto cerebral oclusivo o infarto cerebral hemorrágico. Se recabaron los resultados que fueron obtenidos de los estudios ordinarios de laboratorio que se les realizaron a los pacientes con esas características en el servicio de urgencias como fueron la BH, la QS-6 (glucosa, urea, creatinina, ácido úrico, colesterol total, triglicéridos) y los ES (NA, K, Ca, Cl, P y Mg) por los métodos de laboratorio de rutina. Se le tomó una muestra adicional de aproximadamente 7 mL de sangre la cual fue centrifugada y el suero obtenido fue alicuotado en tubos Eppendorf de 1.5 mL y fue almacenado a congelación a -20 °C hasta el momento de su utilización para la determinación de los marcadores pro y antioxidantes.

Tamaño de muestra:

El tamaño de muestra se obtuvo mediante la ecuación de dos proporciones (55).

$$n = \left[\frac{Z_{\alpha} \sqrt{2 \pi_1(1 - \pi_1)} - Z_{\beta} \sqrt{\pi_1(1 - \pi_1) + \pi_2(1 - \pi_2)}}{\pi_1 - \pi_2} \right]^2$$

Donde:

$$Z_{\alpha} = (\alpha = 0.05) = 1.96$$

$$Z_{\beta} = (\beta = 0.10) = -1.645$$

π_1 (P1) = proporción de pacientes con diagnóstico de EVC que acuden al servicio de urgencias del HGR No. 1 de Charo, Michoacán que en el 2014 fueron 243 egresos con diagnóstico de EVC, y que se estima tienen alteración en los parámetros bioquímicos de estrés oxidativo = 0.8

π_2 (P2) = proporción de pacientes con factores de riesgo para ECV pero sin el evento isquémico = 0.2

$\pi_1 - \pi_2$ (P1-P2) = Diferencia entre la proporción del grupo de pacientes con EVC y sin el evento isquémico, que sea clínicamente significativa.

$$N = \left[\frac{1.96 \sqrt{2 (0.8) (1 - 0.8)} - (-1.645) \sqrt{0.8(1 - 0.8) + 0.2(1 - 0.2)}}{(0.8 - 0.2)} \right]^2$$

N= 41.38 Pacientes por grupo.

Criterios de selección:**Criterios de inclusión**

- Pacientes con manifestaciones clínicas de EVC que llegaron al servicio de urgencias del HGR No. 1 de Charo, Michoacán.
- Ambos sexos
- Que dieron su consentimiento informado verbal y por escrito ellos, su familiar o su representante legal.

Criterios de no Inclusión

- Pacientes que reunían los criterios de inclusión pero que no aceptaron participar en el estudio.
- Pacientes que se les haya diagnosticado hipoglucemia y su recuperación haya sido *al integrum*.

Variables de estudio**Variable dependiente.**

- Enfermedad Vascular Cerebral

Variables independientes

- Marcadores bioquímicos pro oxidantes y antioxidantes
- Edad
- Sexo
- antecedente de hipertensión arterial
- Antecedente de diabetes

OPERACIONALIZACION DE VARIABLES**Marcadores de oxidación y antioxidación**

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Unidad de medida
Óxido nítrico	Medición total. Control de calidad por curva de calibración	Marcador de radicales libres	Cuantitativa continua	($\mu\text{mol/L}$)
Malondialdehído (MDA)	Medición total. Control de calidad por curva de calibración	Marcador de lipoperoxidación	Cuantitativa continua	($\mu\text{mol/mL}$)
Dienos conjugados	Medición total. Control de calidad por curva de calibración	Marcador de la oxidación de los lípidos	Cuantitativa continua	($\mu\text{mol/L}$)
Productos de la oxidación tardía de la proteínas (AOPP)	Medición total. Control de calidad por curva de calibración	Marcador de oxidación de las proteínas	Cuantitativa continua	(nmol/mL)
Productos avanzados de la glucosilación de las proteínas AGES (UAF)	UAF: unidades arbitrarias de fluorescencia	Marcador de la glucosilación de proteínas y otras moléculas biológicas	Cuantitativa continua	($\mu\text{mol/L}$)
Peróxidos totales	Medición total. Control de	Marcador de radical libre.	Cuantitativa continua	($\mu\text{mol/L}$)

	calidad por curva de calibración.	Producto obtenido como resultado de la peroxidación del grupo hemo. Se determinan los hidroperóxidos.		
Tioles (GSH)	Medición total. Control de calidad por curva de calibración.	Marcador de antioxidación	Cuantitativa continua	($\mu\text{mol/mL}$)
Vitamina C	Medición total. Control de calidad por curva de calibración.	Se utiliza para determinar la capacidad antioxidante del suero. Se determina en términos de ácido ascórbico	Cuantitativa continua	($\mu\text{mol/mL}$)
Superóxidodismutasa	Medición total. Control de calidad por curva de calibración.	Actividad enzimática de una enzima antioxidante	Cuantitativa continua	(U/mL)

Variables clínicas y demográficas

Variable	Definición	Definición	Tipo de	Unidad de
----------	------------	------------	---------	-----------

	conceptual	operacional	variable	medida
Sexo	Sexo biológico	Hombre o mujer	Categórica	
Edad	Edad cronológica	Número de años cumplidos	Cuantitativa continua	(años)
Estatura		Altura en metros	Cuantitativa continua	(m)
Peso		Peso en kilogramos	Cuantitativa continua	(kg)
Superficie corporal		Calculada con base en la estatura y el peso	Cuantitativa continua	(m ²)
Índice de masa corporal		Calculada con base en la estatura y el peso	Cuantitativa continua	(kg/m ²)
Presión arterial sistólica (PAS)	Fuerza que ejerce la sangre que circula contra las paredes de las arterias	Medida en milímetros de mercurio	Cuantitativa continua	(mm/Hg)
Presión arterial diastólica (PAD)	Fuerza que ejerce la sangre que circula contra las paredes de las	Medida en milímetros de mercurio	Cuantitativa continua	(mm/Hg)

	arterias			
Presión arterial media (PAM)	Fuerza que ejerce la sangre que circula contra las paredes de las arterias	Calculada con base en las PAS y PAD en milímetros de mercurio	Cuantitativa continua	(mm/Hg)

Variables bioquímicas generales

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Unidad de medida
Urea en suero	Substancia tóxica resultante de la degradación de sustancias nitrogenadas	Medición total. Control de calidad por curva de calibración	Cuantitativa continua	(mg/dL)
Creatinina sérica	Producto del catabolismo de las proteínas	Medición total. Control de calidad por curva de calibración	Cuantitativa continua	(mg/dL)
Ácido úrico en suero	Producto de la degradación de las purinas, puede servir de marcador de daños renal y también de anti oxidación	Medición total. Control de calidad por curva de calibración	Cuantitativa continua	(mg/dL)

Hemoglobina	Proteína constitutiva de los eritrocitos utilizada para evaluar pérdida de sangre	Medición total. Control de calidad por curva de calibración	Cuantitativa continua	(g/dL)
Glucosa en suero	Carbohidrato relacionado con el metabolismo de los azúcares glucemia: definición conceptual: determinación del nivel de glucosa en sangre. Definición operacional: nivel de glucosa en sangre, con el paciente en ayunas y medido en mg/dL.	Medición total. Control de calidad por curva de calibración	Cuantitativa continua	(mg/dL)
Fosforo	Ion sérico	Medición total. Control de calidad por curva de calibración	Cuantitativa continua	(mq/dL)
Calcio	Ion sérico	Medición total. Control de calidad por curva	Cuantitativa continua	(mq/dL)

		de calibración		
Cloro sérico	Ion sérico	Medición total. Control de calidad por curva de calibración	Cuantitativa continua	(mEq/L)
Sodio sérico	Ion sérico	Medición total. Control de calidad por curva de calibración	Cuantitativa continua	(mEq/L)
Potasio sérico	Ion sérico	Medición total. Control de calidad por curva de calibración	Cuantitativa continua	(mEq/L)
Magnesio sérico	Ion sérico	Medición total. Control de calidad por curva de calibración	Cuantitativa continua	(mg/dL)
Colesterol en suero	El colesterol es un esterol (lípid) que se encuentra en los tejidos corporales y en el plasma sanguíneo. En altas concentraciones promueve la formación de placas	Medición total. Control de calidad por curva de calibración	Cuantitativa continua	(mg/dL)

	ateromatosas.			
Triglicéridos en suero	Acilgliceroles, un tipo de lípidos, formados por una molécula de glicerol, que tiene esterificados sus tres grupos hidroxílicos por tres ácidos grasos, ya sean saturados o insaturados. Los triglicéridos forman parte de las grasas de origen animal	Medición total. Control de calidad por curva de calibración	Cuantitativa continua	(mg/dL)

DESCRIPCION OPERATIVA DEL ESTUDIO

Se incluyeron a todos los pacientes de ambos sexos, que acudieron o fueron llevados al servicio de urgencias del HGR No. 1 de Charo Michoacán, durante el periodo de Marzo a Mayo del 2015, que presentaron manifestaciones clínicas sugestivas de EVC tipo oclusivo o hemorrágico, a los cuales en caso de estar en condiciones mentales lúcidas y a sus familiares o responsable legal, o en caso contrario de no estar en condiciones mentales lúcidas a su familiar o responsable legal para participar en el

estudio y que consistió en tomarles una muestra de sangre adicional a las que se les toman para el protocolo de estudio de estos pacientes en los servicios de urgencias de aproximadamente 7 ml en un tubo seco que se utilizó para la medición de los marcadores bioquímicos pro y antioxidantes. Se les explicó que el motivo de este estudio es para evaluar cómo está el EO en los pacientes afectados de una EVC ya que reportes previos sugieren que en estos procesos vasculares cerebrales existe la posibilidad de un imbalance en este fenómeno de EO y que puede ocasionar mayor daño al organismo. A los pacientes y/o sus familiares o representante legal que den su consentimiento informado (Anexo 1) para participar en el estudio se les realizará una historia clínica (Anexo 2) con el propósito de identificar sus antecedentes más importantes, cuadro clínico actual, y resultado de los estudios de laboratorio realizados al ingreso similarmente fueron registrados los resultados de los estudios de gabinete que se les realizaron (radiográfica de tórax y Tomografía computarizada Cerebral) al ingreso y a las 24 horas de su estancia en el servicio de urgencias por lo que se hizo especial énfasis en que comprendieran y les quedara claro que solo se tomaría una muestra adicional de sangre de aproximadamente 7 ml en un tubo seco. La evaluación clínica se realizó al momento del ingreso al servicio de urgencias. La muestra de sangre adicional que se tomó fue centrifugada y el suero obtenido congelado a -20°C en tubos Eppendor de 1.5 ml y se utilizó para la medición de los biomarcadores bioquímicos pro y antioxidantes.

Desproteínización de la muestra

Es el paso previo para hacer la determinación de MDA, NOx, peróxidos. La finalidad que se tiene, es evitar interferencias por los sedimentos que forman las proteínas al desnaturalizarse y evitar errores al momento de pipetear. En tubos de 600 uL, se colocan 200 µL de la muestra y se añaden 200 µL de ácido tricloroacético (TCA) al 20%, se agita en vortex y se incuba a 4 °C por 10 minutos, posteriormente se centrifuga a 11000 rpm durante 3 minutos. El sobrenadante obtenido está libre de proteínas y será utilizado para varias de las mediciones bioquímicas especiales.

Métodos bioquímicos para la determinación de los marcadores pro y antioxidantes

Para la valoración del estrés oxidativo nos hemos propuesto determinar tanto los productos de oxidación molecular como algunos de las moléculas de los sistemas antioxidantes.

En el primer grupo de parámetros seleccionaremos los marcadores más indicativos de estrés oxidativo como son el óxido nítrico (NOx), Malondialdehído (MDA), dienosconjugados (DC), productos tardíos de la oxidación de las proteínas (AOPP), productos tardíos de la glucosilación (AGEs) y peróxidos totales (H₂O₂).

En el segundo grupo de parámetros analizaremos los antioxidantes como el glutatión total (GSH), vitamina c (VitC) y superóxido de dismutasa (SOD).

Determinación de óxido nítrico (NOx)

La reacción de Griess fue descrita en 1879. En este método, el nitrito producido reacciona con sulfanilamida, en medio ácido para formar una sal temporal de diazonio. Este intermediario reacciona con un agente acoplante N-naftilendiamino (NED), para formar un compuesto azo estable. La absorbancia de este aducto se lee a 540 nm es directamente proporcional a la concentración de nitritos en la muestra (56).

El ON es un importante efector fisiológico y mensajero molecular en muchos sistemas biológicos, incluidos los inmunológicos, neuronales y cardiovasculares (57,58).

La medición de NOx se realizará mediante la determinación de la cantidad total de nitritos (NO₂⁻), que son los productos estables del metabolismo de ON. Se utilizará el reactivo de Griess (solución acuosa de sulfanilamida y naftilenetilendiamina en H₃PO₄, JT Baker), el cual forma un cromóforo estable con NO₂⁻, y que absorbe a 546 nm. La curva de calibración se hará con diferentes concentraciones de nitrito de sodio disuelto en NaCl al 0.9%.

Para la medición de NOx se utiliza el método indirecto de Green y cols, (59) que se describe a continuación: Se utilizan 20 uL del estándar o sobrenadante de la muestra desproteinizada, a la que se le agregan 50 uL de sulfonamida al 1 % incubando en oscuridad durante 10 minutos, posteriormente se añaden 50 uL de NED al 0.1 % incubando en oscuridad durante 10 minutos. Además se prepara una curva de calibración de 8 puntos, de NaNO₂ de 0 a 100 uM. El estándar y las muestras se analizan a 540 nm. Con los datos de la curva se calcula la concentración de nitritos en cada muestra.

Determinación de Malondialdehído (MDA)

El MDA es uno de los productos finales de lipoperoxidación de ácidos grasos poliinsaturados. A pH ácido y temperaturas elevadas reacciona una molécula de MDA con 2 moléculas de TBA formando aductos de color rosa que se detectan a 532 nm en luz visible (60,61). El Malondialdehído es el producto final de la peroxidación de los ácidos grasos y un marcador de la actividad de los radicales libres. Para la medición de la concentración de peroxidación lipídica en espermatozoides se utilizó el método del ácido tiobarbitúrico (TBA) descrito por Wade y van Rij(62). Aunque el TBA no sólo se limita a la medición del MDA, es el método más empleado para determinar la oxidación lipídica y por lo tanto el estrés oxidativo. En resumen, a una alícuota de plasma se les añadirán ácido tricloroacético al 25%, y se incubarán a 4 °C durante 15 minutos, posteriormente se centrifugará a 4 °C, 5000 x g durante 3 min, y el sobrenadante (100 µL) será neutralizado con NaOH (JT Baker) 4 M. A 1 mL de la solución anterior se le adicionará 1 mL de TBA (AcrosOrganics, Bélgica) al 0.8 % y se incubara a 90 °C durante 60 min. La reacción de color se medirá espectrofotométricamente (532 nm) en la fase orgánica (1-butanol). Se utilizó al tetrametoxipropano como estándar. La concentración de MDA (medido como sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, TBAR) se calculará como µmol/L.

Dienos conjugados

Los dienos conjugados, que son los productos iniciales del proceso de lipoperoxidación, serán extraídos con isopropanol y valorados por la técnica de Wallin (63).

Determinación de productos avanzados de la oxidación de proteínas

En la determinación de AOPPs se estima el grado de oxidación de proteínas en el plasma de pacientes con IRC, esta oxidación es causada por el ácido hipocloroso (HOCl) producido por neutrófilos y macrófagos, el cual, modifica las proteínas (64).

En condiciones ácidas los AOPPs reaccionan con el yoduro formando el I₂ el cual se detecta a 340 nm. La concentración de AOPPs es expresada en micromoles por litro ($\mu\text{mol/L}$) de cloramina T (patrón). Se elabora una curva de calibración con ocho puntos (0-100 μM) cloramina T. Para el sistema de la muestra, se utilizan 20 μL de suero más 80 μL de PBS pH=7.4; sin embargo., para el sistema de la curva, se requirieren 100 μL de cloramina T. A ambos sistemas se les añaden 5 μL de KI y 10 μL ácido acético concentrado. La absorbancia se obtiene leyendo a 340 nm inmediatamente después de haber agregado el ácido acético (65).

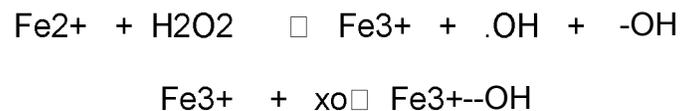
Cuantificación de los productos avanzados de la glicosilación

Debido a que los AGEs son compuestos fluorescentes se determinan mediante un método fluorométrico con base en el procedimiento de Henle y Munch (66,67). El ensayo se lleva a cabo en placas oscuras de 96 pozos (Fisher Scientific, Hanover

Park, IL USA) a 37 °C y se utilizan 5 μ L de muestra en un sistema de dilución amortiguado de PBS (pH 7.4), la intensidad de la fluorescencia se mide a la emisión máxima de 440 nm y de excitación a 350 nm. La intensidad de fluorescencia se expresa en unidades arbitrarias de fluorescencia (UAF).

Determinación de peróxidos

Esta determinación se utiliza el método de hierro-naranja de xilenol (FOX), el cual, se basa en la oxidación de Fe²⁺ a Fe³⁺ por los peróxidos de la muestra en condiciones ácidas. El ión férrico se une con el naranja de xilenol (3,3'-bis(N,N-di(carboximetil)-aminometil)-o-cresolsulfona-fenofaleína), para formar un complejo colorido que se puede medir a 560 nm. (68).



Se prepara una curva de calibración de H₂O₂ de 8 puntos de 0-500 μ M. A 10 μ L del estándar o de la muestra, se les adicionan 125 μ L de disolución reactiva FOX (9 volúmenes de dehidroxitoluenobutilado 4 mM en metanol y 1 volumen de naranja de xilenol 1 mM, (NH₄)₂Fe(SO₄)₂ 2.56 mM en H₂SO₄ 250 mM) y se agita en vortex. La curva y las muestras se incuban a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se determina la absorbancia de la curva y de las muestras a 595 nm. Con los datos de la

curva se calcula la concentración de peróxidos en cada muestra. De esta manera se determinan hidroperóxidos y otros peróxidos (69).

Determinación de la superóxido dismutasa(SOD)

La SOD se determinó con base en el método de Marklund y Marklund (70,71). El radical aniónico superóxido participa en la autoxidación del pirogalol. Para ello se preparó una solución de pirogalol en HC1 (JT Baker, Xalostoc, Mex. México) y se incubó a 40 °C. A 50 µL de muestra se le añadirán 200 µL de una mezcla de Tris–EDTA–HC1 y se leerá a 420 nm en un espectrofotómetro DU 50 (Beckman, Palo Alto, CA. USA). Posteriormente se añadirá la solución de pirogalol y se volverá a medir el incremento en la absorbencia cada 30 segundos durante 3 min. El blanco de reactivos se realizará de la misma manera pero en lugar de muestra se utilizará agua bidestilada. La actividad de la SOD se expresará en U/mg de proteína.

Medición de la actividad de glutatión total (GSH)

El GSH será medido con el 5,5' ditiobis–(2–ácido nitrobenzoico) (DTNB). La mezcla de reacción contiene GSH (Amresco) en PBS a pH 7.0, EDTA y azida de sodio, una alícuota de plasma y agua bidestilada para aforar a 4 mL. Tras la incubación a 37 °C durante cinco minutos, se añadirá T–BOOH precalentado y se volverá a incubar por cuatro minutos más. Al final de ese periodo se recuperarán 1 mL y se le añadirán 4 mL de ácido fosfórico (High Purity de México), se centrifugará a temperatura ambiente, y a

2000 x g durante 10 minutos. Se recuperaron 2 mL del sobrenadante y se le añadirá Na_2HPO_4 y reactivo de DTNB. La absorbencia se medirá a 412 nm. Los blancos y los estándares se prepararan de manera similar. La actividad de GSH se expresará como U/mL. (72).

Determinación de tioles (GLUTATIÓN) y sulfidrilo totales en el suero

La cuantificación de la glutatión total se analiza mediante el reactivo de Ellman (DTNB; 5' 5' Ditio-Bis 2-Nitro-ácido benzoico) de acuerdo con el procedimiento estándar. Este método se basa en la reacción estequiométrica entre DTNB y los SH de acuerdo a la siguiente reacción (73).

Primeramente se prepara una curva de calibración con ocho puntos desde 0 a 100 μM de L-Cisteína, las muestras y la curva de calibraciones tratan de la misma manera, en donde se colocan 12.5 μL de DTNB (reactivo de Ellman), 25 μL de buffer Tris-EDTA pH 8.2. y 210 μL de H_2O BD y se determina la primera lectura a 412 nm. Tras la lectura se incorporaron 2.5 μL del estándar o del suero, según el sistema (agitando) e inmediatamente se realiza la segunda lectura a la misma longitud de onda.

Determinación de Vitamina C

Para evaluar la capacidad antioxidante del suero, se utiliza el método descrito por Prieto. Este método se basa en la reducción de molibdato (VI) a molibdato (V) por la muestra, seguido de la formación un complejo entre el fosfato y el molibdato (V), el cual

tiene una absorción óptima a 695 nm. (74). Para la determinación, se prepara una curva de calibración de ácido ascórbico con 8 puntos de 0 a 10 nm, se utilizan 10 µL de la muestra más 10 µL de agua BD los cuales se colocan en un tubo eppendorf que contienen 200 µL de disolución reactiva (0,6 M de ácido sulfúrico, 28 mM fosfato de sodio monobásico y 4 mM de molibdato de amonio). De la misma forma que la muestra, se añaden 10 µL del estándar más 10 µL de agua BD con la disolución reactiva. Después de que se añadieron las disoluciones a los tubos, se incuban a 95 °C durante 90 minutos. Tras la primera incubación, se deja enfriar durante 10 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se determina la densidad óptica a 695 nm. La actividad antioxidativa se determina en términos de ácido ascórbico mmol/ mL de suero. Con los datos de la curva se calcula la concentración de Vitamina C en cada muestra.

Cinética de laSOD por el método de pirogalol

Para determinar la actividad enzimática de la SOD se necesitan 2 sistemas de reacción, uno para la muestra y otro para el control; el sistema control contiene 290 µL de buffer Tris (50 mM) - EDTA (1mM) pH 8.5, el sistema de la muestra 280 µL del mismo buffer, más 10 µL de suero. Después a cada sistema se añaden 10 µL de disolución de pirogalol (20mM) y a los 90 segundos de haberse incorporado se realizan 7 lecturas a 420 nm cada 10 segundos (74), para el cálculo de la actividad enzimática se utiliza la siguiente ecuación:

$$\text{Unidades de SOD/3 mL disolución de reacción} = ((A-B) * 100)/(A*50)$$

Donde:

A - Absorbancia del control de lectura

B - Lectura de absorbancia de la muestra

Definición de unidad: una unidad de SOD se describe como la cantidad de enzima necesaria para producir el 50% de inhibición de la autooxidación del pirogalol por 3 mL de mezcla de ensayo.

Unidades $\times 10 =$ Unidades / mL de muestra

IX. ANALISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se muestran en medias \pm desviación estándar las variables continuas, mientras que las variables categóricas en porcentajes. Se utilizó el análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) y se hizo una prueba a posteriori (Tukey) para las pruebas paramétricas, para las pruebas no paramétricas se utilizó la U de Mann-Whitney. Las diferencias en las variables categóricas fueron analizadas con la prueba de la chi-cuadrada. Se consideró de significancia estadística a un valor de $p < 0.05$. Todos los cálculos fueron realizados en el paquete estadístico SPSS versión 20.0. Mientras que las gráficas se procesaron con el paquete estadístico PRISM V. 4.0.

ASPECTOS ÉTICOS

El presente estudio es considerado como de riesgo mínimo para el sujeto de estudio de acuerdo con Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 07 de febrero de 1984 y se da cumplimiento a los artículos 13 y 14, del Título Segundo y de acuerdo al artículo 17 de la misma ley, así como los lineamientos de la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial sobre Principios Éticos para las Investigaciones Médicas en Seres Humanos.

Después de proporcionar información verbal de los objetivos del estudio, se le solicitó al participante cuando estaba en condiciones físicas y mentales apto, o a su familiar o representante legal su autorización mediante una firma de una carta de consentimiento informado (Anexo 1) para realizarse una historia clínica, así como para obtener una muestra de sangre periférica de 7 mL mediante punción venosa que fue realizada por personal capacitado. Se le informó al participante que se le entregaría un tanto del consentimiento informado firmado por el participante, un familiar, testigos y quien obtiene el consentimiento. También se le informó al paciente que tenía derecho a retirarse del estudio en el momento en que así lo decidiera y lo haga saber al grupo de investigación, sin que esto influyera en la calidad de su atención médica.

Bioseguridad

El Servicio de Urgencias del HGR No. 1 de Charo Michoacán cuenta con las instalaciones e infraestructura adecuadas para la realización de los procedimientos contemplados en este proyecto por lo que no se tiene ninguna duda en su

procesamiento. Los desechos que resulten de estos procedimientos, serán inactivados en solución de hipoclorito en concentración de 1g/L.

LOGISTICA

Una vez que fue autorizado por el Comité Local de Investigación, se procedió a explicarles ampliamente a los pacientes, sus familiares o su representante legal, de manera verbal y por escrito y que les quedara clara su participación voluntariamente y dieron su consentimiento por escrito se procedió a la realización de la historia clínica, recopilación de los resultados de los estudios bioquímicos y de gabinete que se solicitaron en el servicio de Urgencias del Hospital sede del estudio y se tomó una muestra adicional de sangre de alguna de sus venas de sus extremidades superiores en una cantidad de aproximadamente 7 ml la cual fue centrifugada, y el suero obtenido almacenado en alícuotas en tubos eppendor de 1.5 ml y congelado a -20oC hasta su procesamiento y que se utilizó para la determinación de los biomarcadores pro y antioxidantes. Estos estudios se realizaron al momento del ingreso al servicio de urgencias.

RECURSOS FINANCIAMIENTO Y FACTIBILIDAD

Factibilidad

El estudio se realizó en el servicio de Urgencias del HGR No 1 de Charo, Michoacán.

RECURSOS

Humanos:

Dos investigadores y un alumno del Curso de Especialización en Medicina de Urgencias que en este proyecto fungió como investigador principal.

Factibilidad:

Los estudios rutinarios del paciente con estas características se realizan de manera rutinaria en el servicio. Los estudios de los marcadores de pro oxidantes y antioxidantes se realizaron con reactivos que adquirió el investigador principal y solo se utilizó el equipo del hospital sede del estudio para su medición. El equipo de laboratorio fue utilizado por el Jefe del Laboratorio del Hospital quien participa como Investigador Asociado no existiendo limitación para su uso.

X. RESULTADOS

Se estudiaron un total de 129 pacientes. 68 (52.7 %) con EVC y 61 (47.3 %) controles. De los pacientes con EVC 46 (67.6 %) ingresaron por un EVC isquémico, 17 (25.0 %) por EVC hemorrágico y 5 (7.4 %) con diagnóstico de EVC transitorio que fue corroborado por estudio de Tomografía Axial Computarizada Cerebral. Mientras que de los 61 controles incluidos 20 (32.8 %) ingresaron con diagnóstico de descontrol hipertensivo, 38 (62.3 %) por descontrol metabólico, 2 (3.3 %) dolor precordial y 1 (1.6 %) con diagnóstico de pie diabético.

La tabla 1 muestra el resultado de las variables antropométricas y clínicas de la población estudiada. En ella se observa que los pacientes con EVC isquémico fueron mayores en la edad, mientras que el peso corporal y el IMC, el grupo con EVC hemorrágico fue mayor; la PAS y PAD también fue mayor en el grupo de pacientes con EVC hemorrágico en comparación al grupo control y al grupo de pacientes con EVC isquémico.

La tabla 2 muestra los resultados de las variables bioquímicas. En ella se observa que el grupo control tuvo concentraciones de glucosa en suero superiores al grupo de pacientes con EVC isquémico y EVC hemorrágico; también se observa que el grupo de pacientes con EVC isquémico, EVC hemorrágico y EVC transitorio tuvieron concentraciones séricas de Ca menor que el grupo control.

Tabla 1. Variables antropométricas y clínicas de la población estudiada.

Variable	EVC Isquémico n= 46	EVC Hemorrágico n= 17	EVC transitorio n=5	Control n=61
Edad (años)	73 ± 9	70 ± 13	64 ± 16	66 ± 8*
Género (H/M)	24/22	7/10	3/2	21/40
Peso (kg)	65.9 ± 7.4	73.2 ± 9.8	65.6 ± 7.4	70.4 ± 7.1*
IMC (m ²)	25.5 ± 2.2	27.2 ± 2.5	25.5 ± 3.2	26.8 ± 2.2
PAS (mm/Hg)	131 ± 11	141 ± 13	134 ± 9	120 ± 14**
PAD (mm/Hg)	86 ± 7	94 ± 9	89 ± 7	84 ± 13***

IMC= Índice de masa corporal (peso kg/talla m²); PAS= Presión arterial sistólica; PAD= Presión arterial diastólica. *p<0.05 Gpo control vs EVC isquémico; p<0.01 ** p<0.01 Gpo control vs ECV isquémico y EVC hemorrágico y EVC hemorrágico vs EVC isquémico; ***p<0.01 Gpo control vs EVC hemorrágico.

Tabla 2. Variables bioquímicas de la población estudiada.

Variable	EVC Isquémico n= 46	EVC Hemorrágico n= 17	EVC transitorio n=5	Control n=61
Glucosa (mg/dL)	138.0 ± 61.5	127.3 ± 44.4	168.8 ± 159.1	194.3 ± 116.4*
Urea (mg/dL)	40.2 ± 21.3	47.0 ± 23.0	54.5 ± 32.8	43.8 ± 27.0
Creatinina (mg/dL)	1.14 ± 1.01	1.38 ± 1.23	1.02 ± 0.46	1.05 ± 1.19
Ac. Úrico (mg/dL)	5.2 ± 1.3	5.0 ± 1.1	4.9 ± 2.2	5.4 ± 1.5
Hb (g/dL)	13.1 ± 2.1	12.2 ± 2.0	12.7 ± 0.6	12.9 ± 1.9
Ht (%)	39.4 ± 6.5	36.4 ± 6.2	38.6 ± 2.8	40.0 ± 5.2
P (mg/dL)	3.9 ± 0.8	3.8 ± 0.6	4.3 ± 0.8	3.8 ± 0.9
Ca (mg/dL)	8.5 ± 0.9	8.1 ± 1.0	7.8 ± 1.9	8.9 ± 0.7**
Cl (mg/dL)	102.6 ± 4.9	104.4 ± 5.0	102.0 ± 6.8	99.9 ± 6.4
K (mmol/L)	4.2 ± 0.6	4.1 ± 0.6	4.3 ± 0.4	4.2 ± 0.5
Na (mmol/L)	136.6 ± 5.5	138.7 ± 6.1	136.2 ± 5.5	136.1 ± 4.4
Mg (mg/dL)	1.9 ± 0.3	2.0 ± 0.3	2.3 ± 0.4	1.9 ± 0.5

EVC= Enfermedad vascular cerebral; Hb= Hemoglobina; Ht= Hematocrito; P= Fósforo; Ca= Calcio; Cl= Cloro; K= Potasio; NA= Sodio; Mg= Magnesio.

*p<0.05 Gpo control vs pacientes con EVC isquémico y EVC hemorrágico; **p<0.05

Gpo control vs Gpo con EVC isquémico, EVC hemorrágico y EVC transitorio.

Marcadores pro y antioxidantes.

La tabla tres muestra los resultados de los marcadores antioxidantes y de oxidación de la población estudiada. En ella se observa que los pacientes con EVC tipo isquémico, hemorrágico y transitorio tuvieron una menor capacidad antioxidante expresada en este estudio por la determinación de Vitamina C y SOD en comparación al grupo sin ella EVC. Igualmente se observa que los marcadores pro-oxidantes NOx y Malondialdehído fueron en concentraciones mayores en los pacientes con la ECV que en los pacientes que ingresaron con factores de riesgo pero sin la EVC.

Variable	EVC Isquémico n= 46	EVC Hemorrágico n= 17	EVC transitorio n=5	Control n=61
Vitamina C (mg/dL)	10.98 ± 2.55	13.52 ± 2.24	12.2 ± 2.92	19.58 ± 4.13*
SOD (U/L)	0.82 ± 21.3	0.77 ± 0.23	0.95 ± 0.32**	1.22 ± 0.21*
NOx (umol/L)	19.14 ± 3.01	12.38 ± 2.99	15.02 ± 3.46	10.59 ± 2.19*

Malondialdehído(umol/L)	2.98 ±0.15	2.53 ± 0.24	2.37 ± 0.29	1.02 ± 0.11*
-------------------------	------------	-------------	-------------	--------------

SOD= Superoxidodismutasa; NOx= Óxido Nítrico p<0.001 Gpo. Control vs pacientes con EVC isquémico, hemorrágico y transitorio; p<0.05, Gpo. Control vs pacientes con EVC transitorio.

Finalmente las Figuras 1 a la 4 muestran gráficamente las concentraciones de los marcadores antioxidantes y pro-oxidantes que tuvieron los pacientes con EVC tipo EVC isquémico, hemorrágico y transitorio en comparación al grupo control donde se observa con objetividad que los pacientes con EVC tienen una mayor oxidación y menor capacidad antioxidante en comparación al grupo con factores de riesgo presentes pero sin el evento isquémico.

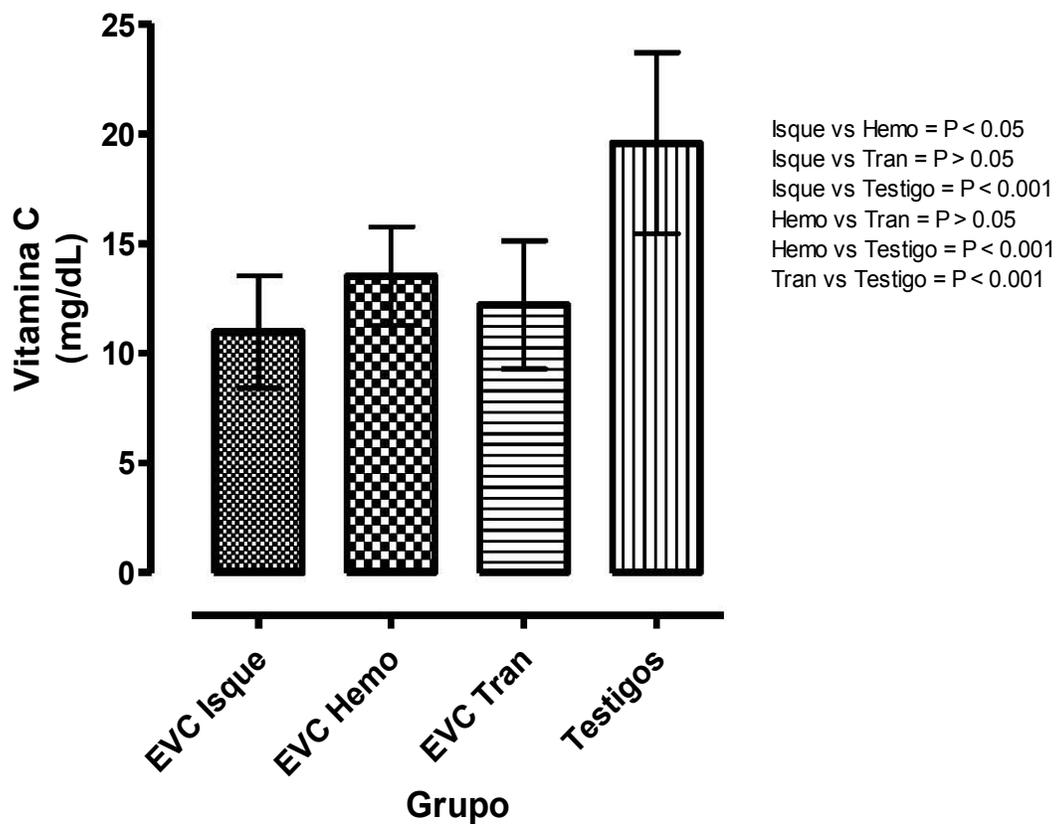


Figura 1. Resultados obtenidos en los valores de Vitamina C (mg/dL) en la población estudiada. EVC Isque= Evento Vascular Cerebral isquémico; EVC Hmo= Evento Vascular Cerebral Hemorrágico; EVC Tran= Evento Vascular Cerebral Transitorio.

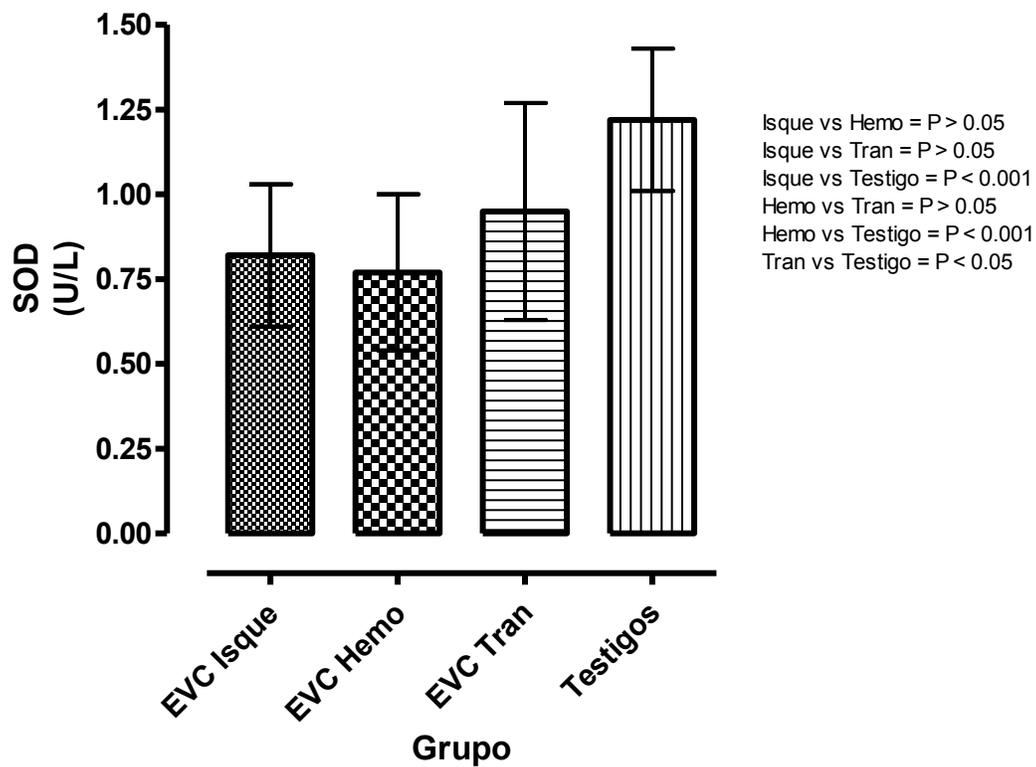


Figura 2. Resultados obtenidos en los valores de SOD (U/L) en la población estudiada. SOD= Superóxido Dismutasa; EVC Isque= Evento Vascular Cerebral isquémico; EVC Hmo= Evento Vascular Cerebral Hemorrágico; EVC Tran= Evento Vascular Cerebral Transitorio.

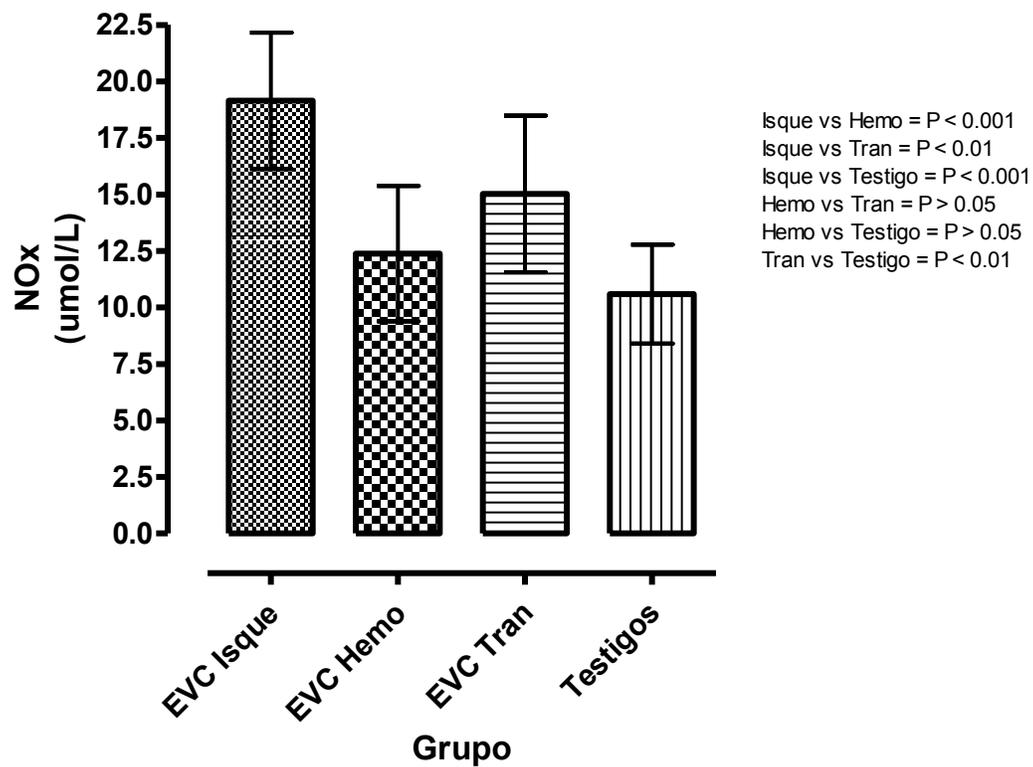


Figura 3. Resultados obtenidos en los valores de NOx (umol/L) en la población estudiada. NOx= Óxido Nítrico; EVC Isque= Evento Vascular Cerebral isquémico; EVC Hmo= Evento Vascular Cerebral Hemorrágico; EVC Tran= Evento Vascular Cerebral Transitorio.

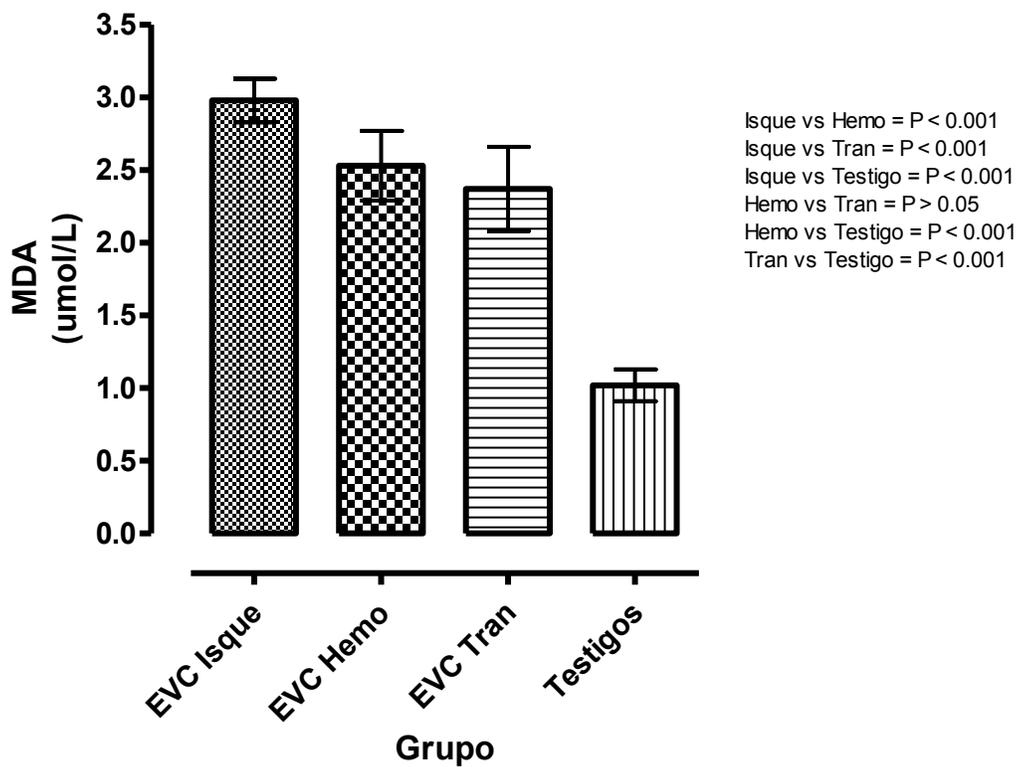


Figura 4. Resultados obtenidos en los valores de MDA (umol/L) en la población estudiada. MDA= Malondialdehído; EVC Isque= Evento Vascular Cerebral isquémico; EVC Hmo= Evento Vascular Cerebral Hemorrágico; EVC Tran= Evento Vascular Cerebral Transitorio.

XI. DISCUSIÓN

En este estudio encontramos concentraciones séricas de glucosa y de Ca⁺ mayor en el grupo de pacientes que ingresaron al servicio de urgencias con los factores de riesgo pero sin el evento cerebral (grupo control). De la misma manera, nuestros resultados sugieren un imbalance en el estrés oxidativo en los pacientes con EVC isquémico, hemorrágico y transitorio al observar valores menores de Vitamina C y SOD y mayores de NOx y Malondialdehído en comparación al grupo control.

En relación a los valores de glucosa estos se explican ya que la mayoría de los pacientes que conformaron el grupo control tenían diabetes mellitus y el motivo de ingreso fue por descontrol glucémico. En relación al imbalance en el estrés oxidativo podemos hacer las siguientes observaciones.

Existen evidencias experimentales que sugieren la participación de los radicales libres en la generación del estrés oxidativo en la patogénesis de lesión cerebral isquémica (75). El tejido cerebral es especialmente propenso a los efectos nocivos de los radicales libres por numerosas razones (76,77). Los lípidos de la membrana celular cerebral son muy ricos en cadenas laterales de ácidos grasos poliinsaturados, que son particularmente sensibles a los ataques de los radicales libres. Además, el tejido cerebral es deficiente catalasa y expresa cantidades moderadas de SOD y glutatión peroxidasa (78). Por otro lado la hiperhomocistinemia ha sido implicada como un factor que contribuye a la patogénesis de estrés oxidativo (79,80). El efecto perjudicial de Ht Hcy en el entorno de la EVC trombótico aguda parece ser multifactorial, involucrando el sistema de coagulación haciéndola más coagulable aún (81) y la producción de los

neurotransmisores excitotóxicos como el ácido homocisteico y ácido sulfinico cisteína, conducen a la muerte neuronal (82). Es importante hacer notar estos eventos en la participación de la EVC aun cuando no fue el propósito de esta tesis medir el Ht-HCy.

En este estudio se presenta un aumento significativo en los niveles plasmáticos de varios marcadores de estrés oxidativo en el momento de la obtención de muestras y que pudiera ser un factor que debe ser tomado en cuenta en la interpretación de los resultados en relación con ataque isquémico.

En esta trabajo hemos encontrado que existe reducción significativa en las concentraciones séricas de vitamina c (ácido ascórbico) de los pacientes estudiados, y que coincide con lo reportado previamente por Sharp et al. (83). Varios estudios epidemiológicos han sugerido que el aumento de la ingesta de ácido ascórbico puede ser un factor protector contra el EVC(84,85).Por otra parte, se informó que el ácido ascórbico puede estar relacionado con el riesgo de la muerte por EVC.La mortalidad por accidente cerebrovascular en personas de edad avanzada fue más alto en aquellos que tenían niveles bajos de vitamina C, tanto si se mide por la ingesta alimentaria o por la concentración plasmática del ácido ascórbico (86). Sin embargo, Keli et al. (87)no reveló ninguna asociación entre la vitamina ingesta C y riesgo de enfermedad vascular cerebral.

El ascorbato se considera uno de los antioxidantes más importantes en el plasma humano (88), y es la primera línea de defensa antioxidante que es empleada durante la peroxidación de los lípidos (89). La reducción significativa de los niveles plasmáticos de ácido ascórbico en nuestros pacientes parece estar relacionado con el agotamiento de este antioxidante debido a que es consumido durante la formación de los radicales

libres. Esta posibilidad se ve reforzada por el hecho de que los seres humanos son incapaces de sintetizar ácido ascórbico a partir de glucosa. Hay correlación inversa significativa entre el ácido ascórbico y el malondialdehído en todos los pacientes estudiados lo que sustenta que el estrés oxidativo es el consumidor del ácido ascórbico.

En contra parte con otros autores (90,91), nosotros encontramos una diferencia significativa entre los niveles plasmáticos de SOD de los pacientes y los de los testigos, siendo mayor en estos últimos que en los primeros. Por otro lado, Spranger et al. (92) observó una reducción significativa en la actividad SOD dentro de 5 días después de un evento vascular cerebral, que volvió a controlar los niveles más adelante.

A diferencia del ácido ascórbico que depende exclusivamente de un suministro exógeno, el SOD se genera de forma endógena. Esto podría explicar la diferencia de los niveles plasmáticos de los pacientes en comparación con los de los controles. Por otra parte, la fracción intracelular de SOD también puede participar en mayor medida en el proceso de eliminación de radicales libres, el mantenimiento de la fracción extracelular de SOD sin cambio notable, finalmente la disminución del SOD en los pacientes podría deberse también a su consumo excesivo al contrarrestar los efectos de los radicales libres.

La elevación significativa del NOx en nuestros pacientes en comparación con los controles es más probablemente debido a la inducción de NO sintasa por el efecto del ataque trombótico. Con base en nuestra hipótesis y en las observaciones de Wei y Quast (93) que demostraron excitotoxicidad excesiva inducida por el glutamato conduce a una mayor generación de radicales hidroxilo a través de un mecanismo mediado por

NOx y que resulta en la lesión por isquemia / reperfusión severa. Esto podría ser atenuada por la administración del inhibidor de la NOx sintasa NG-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (93). El efecto neurotóxico de NOx puede ser mediado por la inhibición del metabolismo mitocondrial (94) o acelerar la muerte celular programada (apoptosis) (95). Uno de los mecanismos propuestos es que la elevación significativa de NO podría reflejar la elaboración angiopática del radical peroxinitrito través de la generación de aniones superóxido y peróxido de hidrógeno (96).

En este trabajo demostramos que el estrés oxidativo juega un papel importante durante el desarrollo del EVC con base en la elevación significativa de la peroxidación de los lípidos (MDA) que se deriva de la autooxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana, por otro lado, el incremento significativo de NOx, así como la reducción significativa del ácido ascórbico (como antioxidante) en pacientes con EVC en comparación con los sujetos testigo.

Tal aumento observado en el malondialdehído (medido como un índice de la oxidación de los lípidos) en nuestros pacientes coincide con la observación de Sharp et al. (83) e Imre et al. (97), han informado de un aumento de la capacidad de la peroxidación lipídica de los eritrocitos de los pacientes con ictus que podría explicar los disturbios hemorreológicos observados en la microcirculación de estos pacientes, solo que a diferencia de ellos las mediciones que nosotros realizamos la hicimos en suero total. La correlación positiva observada entre óxido nítrico y peróxido de lípidos en nuestro estudio puede sugerir un posible papel de la participación o liberación de especies reactivas del oxígeno. Por otro lado, no podemos excluir que el estrés oxidativo agudo ha contribuido en la disminución de la vitamina C y del SOD.

El estrés oxidativo es probablemente uno de los mecanismos involucrados en el daño neuronal inducido por isquemia-reperfusión, y la actividad antioxidante del plasma pudiera resultar en un factor de protección del tan daño neurológico causado por la asociación entre la enfermedad cerebrovascular y el estrés (98).

La excitotoxicidad en la isquemia cerebral y que finalmente lleva a muerte celular son desencadenados por una reducción brusca en el flujo sanguíneo que sufre al cerebro durante la isquemia resultando en una reducción de oxígeno y glucosa y por lo tanto en una reducción en la energía disponible para mantener el gradiente iónico lo que resulta en una despolarización excesiva neuronal y una liberación de glutamato no regulada con un número de consecuencias deletéreas que incluye un incremento en el Ca^{+} , generación de radicales libres, activación de la permeabilidad mitocondrial y excitotoxicidad secundaria. Debido a que el glutamato es el neurotransmisor excitatorio más importante y constituye la base de la transmisión sináptica, la excitotoxicidad neuronal generalmente se refiere a la lesión y muerte celular derivadas de una intensa y prolongada exposición a glutamato y al desequilibrio iónico asociado en la célula (99). En nuestro estudio encontramos concentraciones bajas de calcio sérico en el grupo de pacientes con EVC. Este resultado es interesante por los mecanismos fisiológicos y fisiopatológicos en que interviene este ion. Así, la muerte celular secundaria a isquemia desencadena una serie de vías que incluye la pérdida de la homeostasis del calcio (100) y el Ca^{+} juega un papel muy importante en los mecanismos fisiopatogénicos de la isquemia cerebral aguda (101); por lo que, el metabolismo del Calcio celular inmediatamente y durante un ataque transitorio de isquemia cerebral es muy importante porque desencadena una serie de eventos que

llevan a daño neuronal subsecuente y muerte celular (102). Además se ha descrito que el calcio sérico es un predictor de enfermedad cardiovascular (ECV) (103). También se ha descrito que niveles bajos de Ca^{+} se asocian a una mayor magnitud en los síntomas en el paciente con EVC cuando llegan al servicio de urgencias (104). Por otro lado, diversos estudios asocian que niveles altos de Ca^{+} se relacionan con una estancia hospitalaria menor (105) aunque los resultados son contradictorios ya que otros estudios asocian niveles séricos altos de Ca^{+} con una mayor muerte celular tanto en la ECV (106), como en la EVC (107). Su conocimiento en los últimos años ha llevado a una serie de estudios con el propósito de bloquear ese ion para prevenir el daño cerebral (108); sin embargo, desde nuestro punto de vista se requieren de mayores estudios en el conocimiento de la fisiopatología del daño celular en esta compleja enfermedad.

XII. CONCLUSIONES

En conclusión; El estrés oxidativo es un acontecimiento excepcional durante el desarrollo del accidente cerebrovascular hemorrágico, trombótico y transitorio, y puede tener un efecto perjudicial sobre los desenlaces de este padecimiento. No sabemos si estos cambios son causa o consecuencia y es posible que uno o varios de ellos formen parte de los factores causales y participen activamente en la evolución de la enfermedad y sus complicaciones, en ello participan - sin lugar a dudas – los radicales libres y los antioxidantes. En este estudio, presentamos evidencias entre la asociación de los antioxidantes particularmente la vitamina C y la SOD así como el óxido nítrico y el malondialdehído como mediadores del estrés oxidativo. Se deberá diseñar estudios prospectivos para evaluar la acción de la vitamina C como una posible intervención farmacológica en la fase aguda del ictus para que atenúe o apague la cascada de generación de radicales libres y sus efectos nocivos.

XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Easton JD, Saver JL, Albers GW, et al. Definition and evaluation of transient ischemic attack: a scientific statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council; Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; Council on Cardiovascular Radiology and Intervention; Council on Cardiovascular Nursing; and the Interdisciplinary Council on Peripheral Vascular Disease. *Stroke*. 2009;40:2276–2293.
2. Lo EH, Dalkara T, Moskowitz MA. Mechanisms, Challenges and opportunities in stroke. *NatRevNeurosci* 2003;4:399-415.
3. Donnan GA, Fisher M, Macleod M, et al. *Stroke*. *Lancet* 2008;471:1612-1623.
4. American Heart Association: Heart Disease and Stroke Statistics – 2005. Update Dallas, Texas. American Heart Association 2005.
5. World Health Organization (WHO) definition of stroke. 2003.
6. Morales-Vidal S. Stroke pathophysiology. *Future Medicine*, 2013;6-20.
7. Kolominsky-Rabas P, Weber M, Gefeller, et al. Epidemiology of ischemic stroke subtypes according to TOAST criteria: incidence, recurrence, and long-term survival in ischemic stroke subtypes: a population-based study. *Stroke*. 2001;32:2735-40.
8. Alwan A. Global status report on noncommunicable diseases 2010. Geneva. World Health Organization 2011.
9. Chiquete E, Ruíz J, Murillo B, et al. Mortalidad por enfermedad vascular cerebral en México, 2000-2008: Una exhortación a la acción. *RevMexNeuroci*. 2011;12:235-241.

10. Easton J, Saber J, Albers G, et al. Definition and evaluation of transient ischemic attack: a scientific statement for healthcare professionals from the American heart association/American stroke association stroke council. *Stroke*. 2009;40:2276-93.
11. Muir KW, Tyrrell P, Sattar N, et al. Inflammation and ischaemic stroke. *Curr Opin Neurol* 2007;20:334-342.
12. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 1999;22:391-397.
13. Del Zoppo GJ. Focus on research: Stroke and neurovascular protection. *N Eng J Med* 2006;354:553-555.
14. Torregrosa G., Salom JB, Jover-Mengual T, et al. Fisiopatología básica: De la oclusión arterial a la muerte neuronal. En: Joan Montaner. Fisiopatología de la isquemia cerebral. 2007. 1ª Edición. Ed. Marge Medica Books; 13-31.
15. Mehta SL, Manhas N, Rahubir R. Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. *Brain Research Reviews* 2007;54:34-66.
16. Ekdahl CT, Kokaia Z, Lindvall O. Brain inflammation and adult neurogenesis: the dual role of microglia. *Neuroscience* 2009;168:1074-1089.
17. Lucas SM, Rothwell NJ, Gibson RM. The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br J Pharmacol* 2006;147(Suppl 1):S232-S240.
18. Swanson RA, Ying W, Kauppinen TM. Astrocytes influences on ischemic neuronal death. *Curr Mol Med* 2004;4:193-205.
19. Brouns R, De Deyn PP. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. *Clinical Neurology and Neurosurgery* 2009; 111(6):483-495.

20. Jian LK, Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases and free radicals in cerebral ischemia. *Free Radical Biology and Medicine* 2005; 39(1):71-80.
21. Huang ZG, Xue D, Preston E, et al. Biphasic opening of the blood-brain barrier following transient focal ischemia: effects of hypothermia. *Can J Neurol Sci* 1999; 26: 298-304.
22. Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 1993;262:689-695.
23. Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, et al. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev* 2001;53:135-159.
24. Mehta SL, Manhas N, Rahubir R. Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. *Brain Research Reviews* 2007;54:34-66.
25. Traystamn RJ, Kirsch JR, Koehler RC. Oxygen radical mechanism of brain injury following ischaemia and reperfusion. *J Appl Physiol* 1991;71:1185-1195.
26. Helaine A, Hagerman AE, Fulkerson BK, Ambrose J, Rice RE, Wiley RL. Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. *Med Sci Sport Exer.* 2000;32(9):1576-1581.
27. Kalra J, Martha S, Prasad K. Oxygen free-radicals: key factors in clinical disease. *Lab Med Int* 1999;11(2):16-21.
28. Retes CI, Pereda CJP, Pereda CMT, et al. Estrés oxidativo vinculación entre las ciencia básica y la práctica clínica. *Rev Per Ginecol Obstet* 2010;56:92-100.
29. Salonen JT. Markers of oxidative damage and antioxidant protection: assessment of LDL oxidation. *Free Radical Research* 2000;33:S41-S46.

30. Sohal RS, Sohal BH, Orr WC. Mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide generation, protein oxidative damage and longevity in different species of flies. *Free RadicBiol Med* 1995;19:499-504.
31. Armstrong D, Browne R. The analysis of free radicals, lipid peroxides, antioxidant enzymes and compounds related to oxidative stress. *Free Radicals in Diagnostic Medicine*. New York: Plenum Press;1994:43.
32. Halliwell B, Gutteridge, JM, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now?. *J. Lab. Clin. Med.* 1992;119:598-620.
33. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Ed 2. Clarendon Press, Oxford.1989.
34. Li YS, Fu JZ, Lo CYA. Hypoxia-induced stress oxidative in ischemic retinopathy. *Oxidative Med and Cell Longevity*. 2012;1-10.
35. Narayanan A, Popova T, Turell M, et al. Alteration in superoxide dismutase 1 causes oxidative stress and P38 MAPK activation following RVFV infection. *Plos One* 2011;6(5):1-11.
36. Israel N, Gouqerot-Pocidaló MD. Oxidative stress in human immunodeficiency virus infection. *Cell Mol Life Sci* 1997;53(11-12):864-870.
37. Lesser MP. Elevated temperaturas and ultraviolet radiation cause oxidative stress and inhibitit photosynthesis in symbiotic dimoflagellates. *LimnolOceanogr* 1996;2:271-283.
38. Deavall GD, Martin AE, Horner MJ, et al. Drug-induced oxidative stress and toxicity. *J Tpxicol* 2012:1-13.

39. Butterfield DA, Castegna A, Pocernich CB, et al. Nutritional approaches to combat oxidative stress in Alzheimer's Disease. *J NutrBiochem* 2002;13:444-461.
40. Docampo, R. Antioxidant mechanisms. In J. Marr and M. Müller, (Eds.). *Biochemistry and Molecular Biology of Parasites*. London: Academic Press. 1995; pp. 147–160.
41. Rice-Evans CA, Gopinathan V. Oxygen toxicity, free radicals and antioxidants in human disease: biochemical implications in atherosclerosis and the problems of premature neonates. *Essays Biochem*. 1995;29: 39–63.
42. Evans MD, Cooke MS. Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids. *BioEssays* 2004;26 (5): 533–542.
43. Fridovich I, Freeman B. Antioxidant defenses in the lung. *Ann Rev Physiol* 1986;48:693-702.
44. Wong Ch, Crack PJ. Modulation of neuro-inflammation and vascular response by oxidative stress following cerebral ischemia-reperfusion injury. *CurrMedChem* 2008;15:1-14.
45. Yilmaz G, Granger DN. Cell adhesion molecules and ischemic stroke. *Neurol Res* 2008;30:783-793.
46. D'Ambrosio AL, Pinsky DJ, Connolly ES. The role of the complement cascade in ischemia/reperfusion injury: implications for neuroprotection. *Mol Med* 2001;7:367-382.
47. World health Organization (WHO) cardiovascular disease (CVSs). *Global Atlas on Cardiovascular Diseases Prevention and Control*. Geneva, World Health Organization, 2011.

48. Pagidipati NJ, Gaziano TA. Estimating deaths from cardiovascular disease: measurement of global methodologies of mortality measurement. *Circulation* 2013;127:749-756.
49. Programa General de Salud 2007-2012. Secretaría de Salud México.
50. López A, Mathers C, Ezzati M, et al. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *Lancet*. 2006;367:1747-57.
51. Kolominsky-Rabas P, Weber M, et al. Epidemiology of ischemic stroke subtypes according to TOAST criteria: incidence, recurrence, and long-term survival in ischemic stroke subtypes: a population-based study. *Stroke*. 2001;32:2735-2740.
52. Strong K, Mathers C, Bonita R. Preventing stroke: saving lives around the world. *LancetNeurol*. 2007;6:182-87.
53. Chiquete E, Ruíz J, Murillo B, et al. Mortalidad por enfermedad vascular cerebral en México, 2000-2008: Una exhortación a la acción. *RevMexNeuroci*. 2011;12:235-241.
54. Easton J, Saber J, Albers G, et al. Definition and evaluation of transient ischemic attack: a scientific statement for healthcare professionals from the American heart association/American stroke association stroke council. *Stroke*. 2009;40:2276-2293.
55. Talavera JO, Rivas-Ruiz R, Bernal-Rosales LP. Tamaño de muestra. *RevMedInstMex Seguro Soc* 2011;49:517-522.
56. Sun J, Zhang X, Broderick M, et al. Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griens Reaction Assay. *Sensors* 2003;3(8):276-284.

-
57. Bredt DS, Snyder AH. Nitric oxide. A physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem.* 1994;63:175-195.
58. Dawson TM, Snyder SH. Gases as biological messengers. Nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *J Neurosci* 1994;14:5147-5149.
59. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, et al. Analysis of nitrite, nitrate and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982; 126: 131-138.
60. Buege, JA, Aust SD; Microsomal lipid peroxidation, *Methods Enzymol.*: 1978;52, 302-310.
61. Uchiyama M, Mihara M. Determination of malondialdehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *AnalytBiochem* 1978;86:271-278.
62. Wade CR, van Rij AM. Plasma thiobarbituric acid reactivity: Reaction conditions and the role of iron, antioxidants and lipid peroxy radicals on the quantitation of plasma lipid peroxides. *Life Sci* 1988; 43:1085–1093.
63. Wallin B, Rosengren B, Shertzer H, Camejo G. Lipoprotein oxidation and measurement of thiobarbituric acid reacting substances formation in a single microtiter plate: its use for evaluation of antioxidants. *Anal Biochem*1993;208: 10-15.
64. Iwao Y, Anraku M, Hiraike M, et al. The structural and pharmacokinetic properties of oxidized human serum albumin, advanced oxidation protein products (AOPP). *Drug MetabPharmacocinet* 2006;21:140-146.
65. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeollere-Blandin C. et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int* 1996;49:1304-1313.

66. Henle T, Deppisch R, Beck W, et al. Advanced glycated end-products (AGE) during haemodialysis treatment: discrepant results with different methodologies reflecting the heterogeneity of AGE compounds. *Nephrol Dial Transplant* 1999;14:1968–1975.
67. Munch G, Kies R, Wessel, A, et al. Determination of advanced glycation end-products in serum by fluorescence spectroscopy and competitive ELISA. *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* 1997;35:669–677.
68. Nourooz-Zadeh, Tajaddini-Samadi J, Wolff SP. Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the Ferrous oxidation-xylenol orange assay in conjunction with triphenylphosphine. *Anal Biochem* 1994;220(2):403-409.
69. Gray JI. Measurement of lipid oxidation. A Review. *J Am Oil Chem* 1978;55:539-546.
70. Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 1994;47(3):469-474.
71. Orr WC, Sohal RJ. Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in *Drosophila melanogaster*. *Science* 1994;263:1128-1130.
72. Beutler E, Duron O, Mikus B. Improved method for determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* 1963; 61: 882-888.
73. Habeeb AF. Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid. *Ann Biochem* 1966;14:328-336.
74. Jyothi P, Riyz N, Nandakumer G, et al. A study of oxidative stress in paucibacillary and multibacillary leprosy. *NET Study* 2008;74(1):80.

-
75. Polidori MC, Frei B, Cherubini A, Nelles G, Rordorf G, Keaney JF Jr, Schwamm L, Mecocci P, Koroshetz WJ, Beal MF. Increased plasma levels of lipid hydroperoxides in patients with ischemic stroke. *Free Radic Biol Med.* 1998;25:561–567.
76. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen radicals and the nervous system. *Trends Neurosci.* 1985;8:22–26.
77. Lebel CP, Bondy SC. Oxygen radicals: a common mediators of neurotoxicity. *Neurotoxicol Teratol.* 1991;13:341–346.
78. Cohen G. Oxygen radicals and Parkinson's disease. En: Halliwell B, ed. *Oxygen Radicals and Tissue Injury.* Bethesda; Md: FASEB; 1988;103:403–406.
79. Lentz SR. Mechanisms of thrombosis in hyperhomocysteinemia. *Curr Opin Hematol.* 1998;5:343–349.
80. Zhang F, Slungaard A, Vercellotti GM, Ladecola C. Superoxide-dependent cerebrovascular effects of homocysteine. *Am J Physiol.* 1998;274:R1704–R1711.
81. Selhub J, D'Angelo A. Relationship between homocysteine and thrombotic disease. *Am J Med Sci.* 1998;316:129–141.
82. Parnetti L, Bottiglieri T, Lowenthal D. Role of homocysteine in age related vascular and non-vascular diseases. *Aging (Milano).* 1997;9:241–257.
83. Sharp PC, Mulholland C, Trinic KT. Ascorbate and malondialdehyde in stroke patients. *Ir J Med Sci.* 1994;163:488–491.
84. Simon JA, Hudes ES, Browner WS. Serum ascorbic acid and cardiovascular disease prevalence in U.S. adults. *Epidemiology.* 1998;9:316–321.

85. Ness AR, Powles JW, Khaw KT. Vitamin C and cardiovascular disease: a systematic review. *J Cardiovasc Risk*. 1996;3:513–521.
86. Gale CR, Martyn CN, Winter PD, Cooper C. Vitamin C and risk of death from stroke and coronary heart disease in cohort of elderly people. *BMJ*. 1995;310:1563–1566.
87. Keli SO, Hertog MG, Feskens EJ, Kromhout D. Dietary flavonoids, antioxidant vitamins and incidence of stroke: the Zutphen study. *Arch Intern Med*. 1996;156:637–642.
88. Frei B, Stocker R, England L, Ames BN. Ascorbate: the most effective antioxidant in human blood plasma. *Adv Exp Med Biol*. 1990;264:155–163.
89. Nyyssonen K, Taparvainen M, Salonen R, Tuomilehto J, Tsalonen. Vitamin C deficiency and risk of myocardial infarction: prospective population study of men from eastern Finland. *BMJ*. 1997;314:634–638.
90. Gruener N, Gross B, Gozlan O, Barak M. Increase in superoxide dismutase after cerebrovascular accident. *Life Sci*. 1994;54:711–713.
91. Adachi T, Nakamura M, Yamada H, Futenma A, Kato K, Hirano K. Quantitative and qualitative changes of extracellular-superoxide dismutase in patients with various diseases. *Clin Chim Acta*. 1994;229:123–131.
92. Spranger M, Krempien S, Schwab S, Donneberg S, Hacke W. Superoxide dismutase activity in serum of patients with acute cerebral ischemic injury: correlation with clinical course and infarct size. *Stroke*. 1997;28:2425–2428.

93. Wei J, Quast MJ. Effect of nitric oxide synthase inhibitor on a hyperglycemic rat model of reversible focal ischemia: detection of excitatory amino acids release and hydroxyl radical formation. *Brain Res.* 1998;27:791:146–156.
94. Cleeter MWJ, Cooper JM, Darley-Usman YM, Moncada S, Schapira AH. Reversible inhibition of cytochrome-C-oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain by nitric oxide: implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Lett.* 1994;345:50–54.
95. Ghosh A, Greenberg ME. Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Science.* 1995;268:239–247.
96. Chow K, Cheung F, Lao TT, O K. Effect of homocysteine on the production of nitric oxide in endothelial cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1999;26:817–818.
97. Imre SG, Fekete I, Farkas T. Increased proportion of docosahexanoic acid and high lipid peroxidation capacity in erythrocytes of stroke patients. *Stroke.* 1994;25:2416–2420.
98. Leinonen JS, Ahonen JP, Lonrot K, Jehkonen M, Dastidar P, Molnar G, Alho H. Low plasma antioxidant activity is associated with high lesion volume and neurological impairment in stroke. *Stroke.* 2000;31:33–39.
99. Breton RR, Rodríguez CG. Excitotoxicity and oxidative stress in acute ischemic stroke. *Acute Schemic Stroke; Chapter 2*, Ed. Intesch 2012; pp:30-58.
100. Kristian T, Siesjo BK. Calcium in ischemic cell death. *Stroke.* 1998;29:705–718.
101. Siesjo B. Cerebral circulation and metabolism. *J Neurosurg.* 1984;60:883–908.

102. Tymianski M, Tator CH Normal and abnormal calcium homeostasis in neurons: a basis for the pathophysiology of traumatic and ischemic central nervous system injury. *Neurosurgery*. 1996;38:1176 –1195.
103. John PW, Mark LD, Mathew WK. Plasma calcium as a predictor of cardiovascular disease in community based cohort. *Clinical Endocrinology* 2013; 78(6): 852-857.
104. Guven H, Clilliler A, Koker C, Sarikaky SA, Comoglu SS. Association serum calcium level with clinical severity in acute ischemic stroke. *ACTA Neurologica Belgica* 2011;111: 45-49.
105. Oubiagele B, Starkman S, Teal P, Lyden P, Kaste M, Davis SM, et al. Serum calcium as prognosticator in ischemic stroke. *Stroke* 2008;39:2231-2236.
106. Chrysant SG, Chrysant GS. Controversy regarding the association of high calcium intake and increased risk for cardiovascular disease. *J Clin Hypertens* 2014;16:545-550.
107. Chung JW, Ryu WS, Kim BJ, Yion BW. Association with a poor short-term outcome and long-term mortality. *J of Stroke* 2015;17(1):54-59.
108. Oubiagele B, Kidwell CS, Starkman S, Saver JL. Neuroprotective agents for the treatment of acute ischemic stroke. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2003;3:9 –20.

XIV. ANEXOS.

Anexo 1. Consentimiento informado.

Anexo 2. Hoja de recolección de datos.

Anexo 3: Cronograma de actividades

Anexo 4: Material y equipo

ANEXO 1

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL.

HOSPITAL GENERAL REGIONAL No. 1 CHARO, MICHOACAN.

Anexo: CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Morelia, Mich. a _____ de _____ del _____.

Por medio de la presente yo _____

Acepto participar en el proyecto de investigación titulado **Evaluación del Estrés Oxidativo en los Pacientes con Enfermedad Vascular Cerebral**. Registrado ante el Comité Local de Investigación 1603, con el número _____

Justificación: Evaluar los cambios bioquímicos en sangre relacionados con el estrés oxidativo, si se me diagnostica Enfermedad Vascular Cerebral (infarto cerebral, embolia cerebral, o sangrado cerebral) por mis manifestaciones clínicas y por estudios de laboratorio y gabinete (Tomografía de cráneo) que se me realicen al ingresar al servicio de urgencias del Hospital General Regional No. 1 de Charo, Michoacán.

El objetivo: de este estudio es evaluar algunos de los parámetros bioquímicos relacionados con el estrés oxidativo (una función normal de las células, pero que se puede alterar por algunas enfermedades) en pacientes con EVC en comparación a un grupo de sujetos con los factores de riesgo relacionados (presión alta, diabetes) pero sin el evento isquémico que ingresen al servicio de urgencias del Hospital General Regional No. 1 de Charo, Michoacán.

Procedimientos: Se me ha explicado a mi y/o a mi familiar que mi participación en el estudio consistirá en contestar algunas preguntas relacionadas con mi historia clínica, medición de la presión arterial, mi peso y la talla, el registro del resultado de mis

estudios de laboratorio que por rutina se realizan en el servicio de urgencias a los pacientes que llegan con esta enfermedad y el reporte de la tomografía de mi cabeza que me realicen. Se me ha explicado que sólo de manera adicional, se me tomará una muestra de sangre de 7ml a mi ingreso y siete mililitros a las 24 horas (un equivalente de aproximadamente tres cucharaditas) que será utilizado para medir los marcadores de estrés oxidativo.

Posible riesgo y molestias: Se me ha informado que en general los riesgos son mínimos como por ejemplo que puedo tener alguna molestia en el sitio donde me picarán para tomar la muestra de sangre o se me puede hacer un moretón en el sitio de la punción.

Posibles beneficios: El beneficio que tendré al participar en este estudio es que podré saber si por mi enfermedad se alteran los marcadores de estrés oxidativo para mejorar mis medidas higiénico dietéticas y la posibilidad en un futuro de algún tratamiento que limite el daño y/o mejore la circulación.

Información sobre resultados y alternativas de tratamiento: Se me explicó que se me informará de forma oportuna, clara y precisa los resultados obtenidos en este estudio, y posiblemente yo u otros pacientes con la enfermedad como la mía podríamos recibir alguna alternativa de tratamiento para mi problema en caso de que se requiera con el fin de mejorar la calidad de la atención médica.

Participación o retiro: He sido informado que puedo Retirarme del estudio si así lo decido, sin que ello afecte los servicios que recibo del IMSS.

Privacidad y confidencialidad: Se me ha informado y asegurado que la información que yo aporte es confidencial, se usara solamente para reportes científicos en los cuales no se me identificara de ninguna manera.

Por todo lo anterior declaro que acepto participar en el estudio y puedo retirarme del estudio si así lo decido, sin que ello afecte los servicios que recibo del IMSS.

En caso de dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio podré dirigirme a:

Investigador responsable: Dr. Octavio Calderón Bustos Tel: 4433909339

Investigador asociado: Dr. Sergio Gutiérrez Castellanos Tel (443) 312-48-49

Investigador asociado: Dr. Carlos Etvino Añorve Gallardo Tel:4431880015

Comité Local de Investigación y Ética de Investigación en Salud No. 1603

Secretario del Comité: Dr. Jerónimo Camacho Pérez. Tel: 4525243731

En caso de dudas o aclaraciones sobre mis derechos como participante podré dirigirme con el Secretario Comité Local de Investigación y Ética en Investigación en Salud N° 1603 al teléfono 452 52 437 31.

O bien a:

Comisión de Ética de Investigación de la CNIC del IMSS: Avenida Cuauhtémoc 330 4° piso Bloque "B" de la Unidad de Congresos, Colonia Doctores México, D.F., CP 06720.

Teléfono (55) 56 27 69 00 extensión 21230, Correo electrónico: comisión.etica@imss.gob.mx

Nombre y firma del paciente

Investigador Responsable

TESTIGOS

Nombre y firma

Nombre y firma

ANEXO 2.

Historia clínica:

Nombre _____ Folio _____

NSS _____ Edad _____ Sexo _____

TAS _____ mm/Hg TAD _____ mm/Hg Peso _____ kg

Talla _____ mts IMC _____ mts.

Diabetes Mellitus: SI _____ NO _____

Hipertensión arterial: SI _____ NO _____

Tomografía computarizada cerebral

Diagnóstico tomográfico _____

Valores estudios de laboratorio

Parámetro	Al ingreso	24 horas estancia en urgencias
Oxido nítrico	X	x
Malonildialdehído	X	x
Catalasa	X	x
Dienos conjugados	X	x
AOPPs	X	x
AGEs	X	x
Superóxidodismutasa	X	x
Glutation	X	x
Vitamina C	X	x
Glucosa (mg/dL)	X	X
Urea (mg/dL)	X	X
Creatinina (mg/dL)	X	X
Ácido Úrico (mg/dL)	X	X
Colesterol (mg/dL)	X	X
Triglicéridos (mg/dL)	X	X
Fosforo (mg/dL)	X	X
Cloro (mmol/L)	X	X
Calcio (mg/dL)	X	X
Sodio (mmol/L)	X	X
Potasio (mmol/L)	X	X
Magnesio (mg/dL)	X	X

ANEXO 3

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

ACTIVIDADES	2014						2015										
	M 7	M 8	M 9	M1 0	M 11	M 12	M 1	M 2	M 3	M 4	M 5	M 6	M 7	M 8	M 9	M 10	M 11
Recopilación y resumen de citas bibliográficas	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X					
Redacción del protocolo					X	X	X	X									
Presentación del protocolo al CLIES									X	X							
Reclutamiento de pacientes para el estudio											X	X	X				
Determinaciones biomédicas y bioquímicas														X			
Análisis estadístico e interpretación de datos															X		
Redacción de los resultados y conclusiones del estudio																X	
Presentación de la tesis y envío a publicación																	X

ANEXO 4**MATERIALES Y EQUIPOS****Materiales:**

- Placas transparentes de 96 pozos para lector de ELISA
- Placas oscuras de 96 pozos
- Gradillas
- Tubos de ensayo 13 x 100.
- Tubos Eppendor de 200, 600 y 1000 μ L.
- Puntas para micropipetas de 10, 100, 200, 1000 μ L.
- Tubos de plástico de 10 y 50 mL.
- Pipeta graduada de 10 mL.
- Pipetas volumétricas de 5 y 10 mL.

- Matraz aforado de 5, 10, 25, 50 y 100 mL.
- Varillas de vidrio.
- Espátula.
- Agitador magnético.
- Matraz erlenmeyer de 100 mL.
- Vasos de precipitado de 5, 10, 50, 100, 250, 500 y 1000 mL.
- Frascos viales transparentes y ámbar.
- Detergente líquido.

- Toallas desechables.
- Cajas para tubos Eppendor.
- Vidrio de reloj.

Reactivos:

- Ácido tricloroacético (TCA).
- Ácido tiobarbitúrico (TBA).
- Malondialdehído.
- Sulfanilamida.
- N-Naftilendiamino (NED).
- Nitrito de sodio (NaNO₂).
- Naranja de xilenol 3,3'-bis (N,N-di(carboximetil)-aminometil)-o-cresolsulfona-fenofaleína).
- Peróxido de hidrógeno.
- 2,6, Di-terbutil- 4-metilfenol (Hidroxitoluenobutilado).
- Sulfato de amonio ferroso.
- Metanol.
- Ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄).
- Ácido ascórbico.
- Fosfato de sodio monobásico.
- Molibdato de amonio.
- 5',5' Ditio-Bis 2-Nitro-ácido benzoico (DTNB, reactivo de Ellman).
- Tris.

- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).
- L-Cisteína.
- N-cloro-p-toluensulfonamida (Cloramina T).
- Cloruro de potasio (KCl).
- Cloruro de sodio (NaCl).
- Fosfato de sodio monobásico.
- Fosfato de potasio monobásico.
- Ácido clorhídrico (HCl).
- Yoduro de potasio (KI).
- Ácido acético concentrado
- Ácido acético glacial.
- 1,2,3Trihidroxibenceno (Pirogalol).
- 2-4 Dinitrofenilhidrazina (DNPH).
- Etanol.
- Acetato de etilo.
- Guanidina.
- Benzoato de sodio 10 M.
- Ácido úrico 1 M.

Equipo:

- Lector de ELISA
- Fluorómetro
- Termociclador

- Sonicador
- Agitador orbital
- Vortex
- Termoblock
- Potenciómetro
- Microcomputadora
- Microcentrifuga
- Balanza digital