

11249

31



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

INSTITUTO DE SEGURIDAD Y SERVICIOS SOCIALES DE LOS
TRABAJADORES DEL ESTADO
DIRECCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN.
SUBDIRECCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN.
UNIDAD DEPARTAMENTAL DE POSGRADO.
CURSO UNIVERSITARIO DE ESPECIALIZACIÓN EN NEONATOLOGÍA.

EJEMPLAR UNICO

**CUANTIFICACION DE LA CONCENTRACIÓN DE
MALONDIALDEHIDO EN SANGRE DE RECIEN NACIDOS
PREMATUROS COMO INDICADOR DE DAÑO POR RADICALES
LIBRES DE OXIGENO.**

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN CLINICA.

PRESENTA

Dra. Alma Delia Ramos García.
Dra. Inmaculada Aránzazu, Raquel Gómez
PARA OBTENER EL DIPLOMA DE ESPECIALISTA EN NEONATOLOGÍA.

ASESOR DE TESIS. DRA. LETICIA SOLLANO CARRANZA.

2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

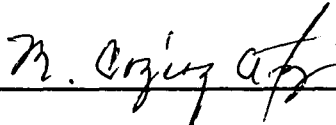
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

DR. LUIS PADILLA SANCHEZ.

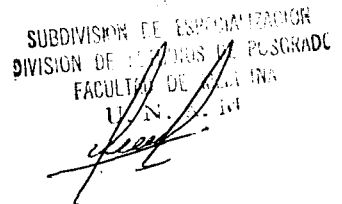


**SUBDIRECTOR DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION
CENTRO MEDICO NACIONAL 20 DE NOVIEMBRE**

DR. MANUEL CAZAREZ ORTIZ.

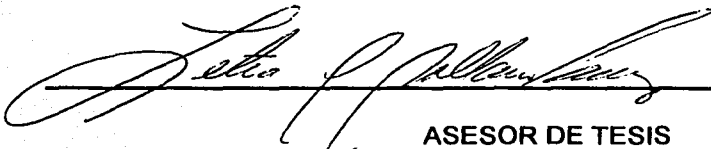


**PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE ESPECIALIZACIÓN EN
NEONATOLOGÍA.
CENTRO MEDICO NACIONAL 20 DE NOVIEMBRE.**



SUBDIVISION DE ESPECIALIZACION
DIVISION DE TESIS Y POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA
C. N. N. 20

DRA. LETICIA SOLLANO CARRANZA.



**ASESOR DE TESIS
CENTRO MEDICO NACIONAL 20 DE NOVIEMBRE**



CENTRO MEDICO NACIONAL 20 DE NOVIEMBRE

SERVICIO DE CUIDADOS INTENSIVOS NEONATALES

UNIDAD DE INVESTIGACION BIOMEDICA

**CUANTIFICACION DE LA CONCENTRACION DE
MALONDIALDEHIDO EN SANGRE DE RECIEN NACIDOS
PREMATUROS COMO INDICADOR DE DAÑO POR
RADICALES LIBRES DE OXIGENO**

INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
HIPÓTESIS.....	5
OBJETIVOS.....	6
MATERIAL Y METODOS.....	6
RESULTADOS.....	8
DISCUSIÓN.....	9
CONCLUSIONES.....	10
GRAFICAS.....	11
ANEXOS.....	15
BIBLIOGRAFÍA.....	16

RESUMEN

Introducción: El objetivo del estudio fue cuantificar la concentración de malondialdehído en sangre de recién nacidos prematuros como indicador de producción de radicales libres de oxígeno. **Material y método:** incluyeron a recién nacidos prematuros y de término. La muestra fue de 74 pacientes de los cuales 54 fueron recién nacidos pretérmino (73%) (23 hombres [42.6%] y 31 mujeres [57.4%]), de éstos, 26 pacientes no recibieron oxígeno (10 hombres [38.5%] y 16 mujeres [61.5%]) y 28 fueron tratados con oxígeno (10 hombres [35.7%] y 18 mujeres [64.2%]). Se tomó un grupo de 20 recién nacidos de término sin exposición a oxígeno (10 hombres (50%) y 10 mujeres (50%)) del servicio de unidad de cuidados intensivos neonatales del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre en agosto de 1999 a 1ro de octubre por motivo de tesis. Se cuantificó la concentración de malondialdehído en sangre de recién nacidos prematuros como indicador de liberación de radicales libres de oxígeno. El estudio es prospectivo, longitudinal, comparativo y observacional. **Resultados:** La gráfica de correlación demostró que el grupo control de recién nacidos de término presentaron niveles de malondialdehído dentro de límites inferiores 0.2 nmol/ml de proteína mientras que los recién nacidos pretérmino no expuestos a oxígeno presentaron niveles de 2.3 nmol/ml de proteína hacia el día 4 disminuyendo hacia el día 15. Los recién nacidos pretérmino expuestos a oxígeno mostraron elevaciones en el primer día de vida (23.6 nmol/ml de proteína) con nadir de 236.3 nmol/ml de proteína el cual disminuyó hacia el día 17 de vida con niveles de 29 nmol/ml de proteína. **Conclusiones:** los mecanismos antioxidantes se encuentran disminuidos e inmaduros en los recién nacidos pretérmino y la exposición a suplemento de oxígeno produce una notable elevación de los niveles de malondialdehído lo que traduce la liberación de radicales libres de oxígeno en forma importante, pudiendo ser una de las causas de daño pulmonar en la enfermedad pulmonar crónica así como a otros niveles sistémicos.

FALTA PAGINA

2|

INTRODUCCIÓN.

Se tienen registrados conocimientos diversos sobre los efectos tóxicos inducidos por el oxígeno sobre los pulmones y otros órganos desde hace 150 años pero los estudios mejor realizados fueron a partir de 1952 cuando Rose y Gyorgy describieron el efecto hemolítico del peróxido de hidrógeno sobre los eritrocitos deficientes en vitamina E permaneciendo el tipo de mecanismo todavía desconocido. Mc Cort y Fridovic encontraron que la xantina y la xantinaoxidasa representan un sistema de generador de radicales libres conocido como sistema xantina-xantinaoxidasa. En 1954 Hershman sugirió que la toxicidad por oxígeno era capaz de producir radicales libres de oxígeno.

Veterstein en 1958 demostró que en los conejos expuestos a oxígeno desarrollaron membranas hialinas a nivel pulmonar.

Posteriormente se han realizado más estudios tratando de esclarecer los daños y su repercusión clínica de los radicales libres sobre los sistemas biológicos.

En el Centro médico Nacional 20 de Noviembre se cuenta con una unidad de cuidados intensivos neonatales en donde tratamos a un gran número de recién nacidos pretérminos con terapia de oxígeno en diferentes modalidades y este hecho los hace susceptibles a daño por radicales libres de oxígeno.

La finalidad de este estudio es cuantificar los niveles de malondialdehído en la sangre de recién nacidos prematuros como indicador de daño por radicales libres de oxígeno como medición indirecta de la peroxidación lipídica.

La relevancia que ha tomado en los últimos 20 años el daño por radicales libres en los recién nacidos sobre todo en los pretérmino ha permitido el avance en los tratamientos terapéuticos con agentes antioxidantes para el manejo de patologías diversas entre ellas la enfermedad pulmonar crónica la cual constituye una complicación de este tipo de pacientes sobre todo en los que tienen antecedentes de haber sido sometidos a ventilación mecánica asistida.

El daño ocasionado por radicales libres de oxígeno repercute en el estado de funcionamiento de múltiples órganos y sistemas del recién nacido pretérmino el cual por sus condiciones de inmadurez lo cual repercute importantemente en la morbilidad.

El conocimiento sobre los niveles de la concentración de malondialdehído como indicador de peroxidación lipídica a nivel de la membrana de eritrocitos nos₃

abre la expectativa hacia nuevos campos en la terapéutica y manejo integral de los recién nacidos pretérmino.

Los radicales libres son especies moleculares inestables muy reactivos que pueden iniciar reacciones en cadena para formar nuevos radicales libres mediante procesos bioquímicos que los potencializan y producen daño a los sistemas biológicos por lo que a lo largo de la evolución se han desarrollado mecanismos antioxidantes para neutralizar estos efectos. Las especies de oxígeno reactivos son formados durante el metabolismo celular normal mediante la reducción del paso de oxígeno molecular del agua en la cadena de transporte de electrones mitocondrial generando al radical superóxido.

Los radicales libres de oxígeno no solo son capaces de desnaturalizar proteínas sino también peroxidan lípidos de membrana que en los recién nacidos pretérmino se correlaciona con niveles altos de malondialdehído tiobarbitúrico con la producción de hidrocarburos durante la respiración lo que da como resultado lesión tisular por aceleración de la peroxidación lipídica y defensas antioxidantes deficientes.

El malondialdehído es un compuesto químico utilizado como marcador de peroxidación lipídica el cual reacciona con el etanol y las proteínas de las membranas de los eritrocitos. Las fuentes de malondialdehído son los productos de la oxidación del ácido linoléico y linolénico.

Todos los organismos celulares son capaces de soportar grandes exposiciones al estrés oxidativo por lo que se desarrollaron a lo largo de la evolución enzimas y compuestos denominados en conjunto como "defensas antioxidantes" que son sistemas que inhiben el inicio o la propagación del daño oxidativo de las biomoléculas. Sin embargo ha sido cada vez más aparente que las defensas antioxidantes no son 100% efectivas y los componentes intracelulares experimentan daño oxidativo. En los últimos años se ha demostrado que las células emplean mecanismos reparadores los cuales se denominan como "sistemas de reparación" los cuales retiran o reparan los productos del daño oxidativo tanto de proteínas, DNA y lípidos por lo que los mecanismos de defensa ante el estrés oxidativo son diversos. A nivel de los lípidos se presenta una protección dada por la hidrólisis selectiva de los ácidos grasos oxidados que involucra al metabolismo de las hidroperoxidasas lipídicas por medio de las peroxidasas citosólicas.

En la neonatología la importancia de los mecanismos de producción de radicales libres de oxígeno vierte información sobre un número de estados patológicos con patogénesis desconocida que han ameritado mucho esfuerzo para realizar investigaciones para entender sus bases entre ellas se encuentran la enfermedad pulmonar crónica y la retinopatía de la prematuridad. El concepto de los radicales libres de oxígeno producidos por el sistema de hipoxantina-xantinaoxidasa entre otros y los mecanismos de defensa antioxidantes inmaduros en los recién nacidos prematuros pudieran explicar porque estos pacientes son especialmente susceptibles a desarrollar alteraciones patológicas a nivel de diversos órganos y sistemas como retinopatía de la prematuridad, enfermedad pulmonar crónica, enterocolitis necrosante, persistencia del conducto arterioso y probablemente la leucomalacia periventricular los cuales no son enfermedades distintas sino diferentes facetas de una enfermedad denominada como " la enfermedad de radicales libres de oxígeno " con las manifestaciones clínicas de acuerdo al órgano lesionado representando un nuevo abordaje a problemas fundamentales en neonatología.

HIPÓTESIS

El recién nacido prematuro expuesto a terapia con oxígeno presenta mayor liberación de radicales libres de oxígeno, proporcional a la concentración de O₂ y a las horas de exposición a éste, pudiendo ser medido a través del malondialdeído en sangre .

OBJETIVO

Cuantificar los niveles del malondialdeído en sangre de recién nacidos prematuros expuestos y no expuestos al oxígeno y compararlos con recién

nacidos de término no expuestos a oxígeno para obtener valores basales de sistemas antioxidantes.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.a. Cuantificar los niveles de malondialdehido en sangre de recién nacidos pretérmino no expuestos a oxígeno para obtención de niveles basales.

1.b. Cuantificar los niveles de malondialdehido en sangre de recién nacidos de término no expuestos a oxígeno para obtener valores basales.

1.c. Cuantificar los niveles de malondialdehido en la sangre de recién nacidos pretérmino expuestos a oxígeno.

1.d. Correlacionar los niveles de malondialdehido de los recién nacidos de término no expuestos a oxígeno con los recién nacidos pretérmino expuestos a oxígeno para valorar la producción por radicales libres.

1.e. Correlacionar los niveles basales de malondialdehido entre los recién nacidos de término y pretérmino no expuestos a oxígeno.

MATERIAL Y METODOS.

Es un estudio prospectivo, observacional, longitudinal y comparativo realizado a partir del 1º de agosto de 1999 y realizando un corte el 1º de octubre del 2000 con el propósito de esta Tesis. Se cuantificó la concentración de malondialdehido en sangre periférica de recién nacidos prematuros como un indicador de producción de radicales libres de oxígeno así como los niveles basales de maloldialdehido en recién nacidos pretérmino y de término no expuestos a oxígeno, ya que en la literatura hasta el momento no se han reportado los valores basales en recién nacidos. El estudio se realizó en el C.M.N. " 20 de Noviembre" en el Servicio de Cuidados Intensivos Neonatales.

Se integraron tres grupos:

. **GRUPO I: grupo de prematuros que recibieron oxígeno en su estancia en el SCIN** :incluyeron a recién nacidos prematuros de 26 a 37 semanas de gestación con peso entre 500 a 2000 gramos , independientemente de las diferentes etapas de ventilación.

. **GRUPO II: grupo de prematuros que no recibieron oxígeno en su estancia en el SCIN:** se incluyendo a recién nacidos prematuros de 26 a 37 semanas de gestación con peso entre 500 a 2000 gramos ,.

GRUPO III: grupo testigo de recién nacidos de término: incluyeron a recién nacidos mayores de 38 semanas de gestación ,con peso mayor de 2500 gramos y sin tratamiento con oxígeno.

Se excluyeron a los recién nacidos procedentes de otro hospital y que fallecieron antes de 24 horas de vida.

METODOLOGÍA.

1.-Se utilizó muestra de sangre periférica obtenida por venopunción de recién nacidos prematuros de la unidad de cuidados intensivos neonatales, al momento del nacimiento y cada tercer día hasta su egreso del hospital.

2.-Las muestras se centrifugaron a 800 Gravedades durante 10 minutos para separar el plasma de los eritrocitos.

3.-Los eritrocitos fueron lavados en 3 ocasiones con amortiguador de fosfatos y posteriormente tratados con solución hipotónica de fosfato (5mmol) para la obtención de membranas

4.-A las membranas se les determinó la concentración de malondialdehido mediante el * método de Ottolenghi.

5.- La proteína total de la membrana del eritrocito fue determinada mediante el método de Buiret y la concentración de malondialdehido fue reportado como nmol/mg de proteína .

*el metodo Ottolengui: es una técnica que determina la unión del ácido tiobarbitúrico y MDA mediante un fotoespectrómetro de 532 nm utilizando el coeficiente de extinción de MDA para calcular la concentración de la muestra.

La información necesaria para nuestro estudio se obtuvo de manera directa por los investigadores del laboratorio de investigación del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre y expediente clínico.

Se capturaron los datos de cada paciente en la hoja de Recolección de Datos (Anexo1). La información fue vaciada a una base de datos Microsoft Excel'97 y se utilizó el paquete estadístico Epi 96.

El análisis estadístico se realizó mediante pruebas de correlación.

RESULTADOS

En este estudio fueron incluidos **74 recién nacidos prematuros** de ambos géneros del Centro Médico Nacional "20 de Noviembre", 54 fueron recién nacidos pretérmino (73%) (23 hombres[42.6%] y 31 mujeres [57.4%]) de los cuales 26 prematuros (10 hombres [38.5%] y 16 mujeres [61.5%]) correspondieron al grupo I. 28 prematuros (10 hombres [35.7%] Y 18 mujeres [64.2%]) correspondieron al grupo II y 20 recién de término (27%) (10 hombres [50%] y 10 mujeres [50%]) correspondieron al grupo III .Se excluyeron a los pacientes que no reunieron los criterios de inclusión.

	No. de pac.	Masculinos	Femeninos
RN PT	54	23(42.6%)	31(57.4%)
RNPT con Oxígeno	26	10 (38.5%)	16(61.5%)
RNPT sin oxígeno	28	10(35.7%)	18(64.2%)
RPT	20	10(50%)	10(50%)
TOTAL	74	33(44.5%)	41(55.4%)

La concentración de malondialdehído en sangre periférica de recién nacidos pretérmino expuestos al oxígeno muestran niveles de malondialdehído en el primer día de vida 23.6 nmol/ ml de proteína con nadir en el día 10 de vida con 236.3 nmol/ ml de proteína presentando disminución al día 17 de vida de 59

nmol/ ml de proteína manteniéndose en los mismos niveles hasta el día 29 de vida. (gráfica 1)

Se elaboró una gráfica de correlación entre el grupo III y el grupo II la cual refleja que los niveles de malondialdehído se mantuvieron dentro de límites inferiores a 0.2 nmol/ml de proteína durante los 29 días en los recién nacidos de término mientras que los recién nacido pretérmino mostrarón elevaciones en los primeros cuatro días de vida con un nadir de 2.3 nmol/ml de proteína el cual disminuye hacia el día 15 mostrando los mismos niveles que el grupo control a los 29 días de vida. (gráfica 2)

DISCUSION

En base a la cuantificación de los niveles de malondialdehído en recién nacidos de término no expuestos al oxígeno se mantuvieron de manera uniforme niveles de 0.2 nmol/mg de proteína lo que probablemente corresponda a valores basales, sin embargo , para necesitamos un número mayor de muestras para poder establecer nuestros basales definitivos , y traduce que poseen sistemas antioxidantes funcionales que se podrían catalogar como "sistemas antioxidantes maduros " mientras que el grupo de recién nacidos pretérmino mostraron niveles superiores con incremento de los niveles de maloldialdehído desde el primer día de vida comparandolos con los niveles de los pacientes de término lo que podría traducir que sus defensas antioxidantes se encuentran disminuidas por lo que podrían ser catalogados como " sistemas antioxidantes inmaduros ".Respecto a la exposición a terapéutica con oxígeno se observa un incremento notable en los valores reales de los niveles de maloldialdehído lo

que podría traducir que los sistemas antioxidantes no son capaces de inhibir el inicio y la propagación del daño oxidativo y que presenta una respuesta tardía hasta el día 17 de vida pero sin llegar a niveles basales para prematuros.

Esta investigación hasta el momento ha confirmado que las defensas antioxidantes de los recién nacido pretérmino se encuentran disminuidas a comparación del grupo control de recién nacidos de término y en caso de recién nacidos pretérmino con exposición a oxígeno estos responden de manera tardía

a los 17 días de vida aproximadamente sin presentar los mismos niveles de protección antioxidante que el grupo control.

Con este estudio hasta el momento no podemos precisar si es a nivel cuantitativo o cualitativo ya que aún no contamos con el estudio de las variables correspondientes y tampoco se valora de esta manera a los " sistemas de reparación " que podrían jugar un importante papel en la protección antioxidante a nivel molecular de manera tardía.

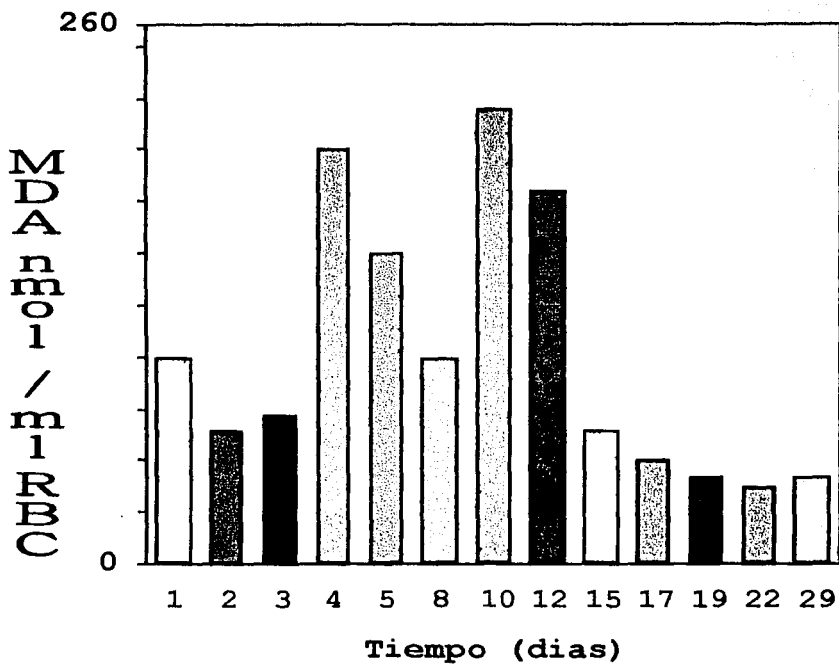
El estudio se encuentra dentro de una Línea de Investigación de daño pulmonar en el recién nacido por lo que no es posible realizar más comentarios sobre la discusión, ya que este estudio nos ha abierto un campo muy amplio para continuar con la medición, y manejo de los radicales libres de oxígeno.

CONCLUSIONES.

Los mecanismos antioxidantes se encuentran inmaduros en el recién nacido pretérmino y esto se refleja por la elevación de los niveles de malondialdehído en comparación con recién nacidos de término y en los recién nacidos pretermino expuestos a oxígeno muestra una considerable elevación de malondialdehído que los no expuestos lo que podría reflejar mecanismos de defensa antioxidante son ineficaces y posteriormente intentan de compensar la formación de radicales libres de oxígeno pero sin llegar a valores basales hasta el día 29 de vida.

**CONCENTRACIÓN DE MALONDIALDEHIDO EN SANGRE PERIFERICA DE
RECIEN NACIDOS PREMATUROS EXPUESTOS AL OXIGENO.**

TIPO DE MUESTRAS	MDA nmol/ml eritrocito	MDA nmol/mg Hg
control	19.17	0.0639
sano	26.88	0.0896
	13.608	0.04536
	17.691	0.05897
	19.791	0.06597

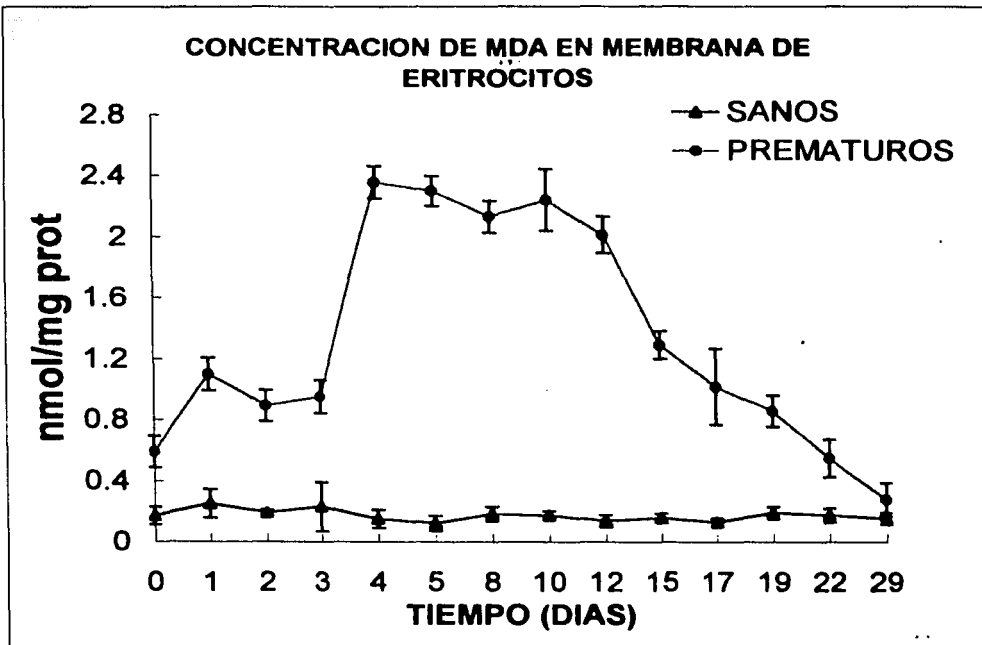


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

N= 54 grupo experimental.

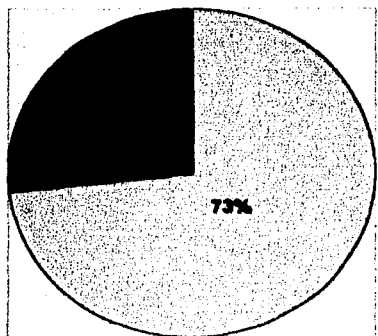
GRAFICA 1

GRAFICAS



GRAFICA 2

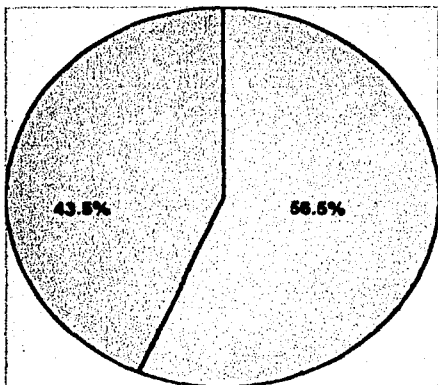
UNIVERSO



GRAFICA 3

FUENTE: EXPEDIENTE

GRUPO CONTROL

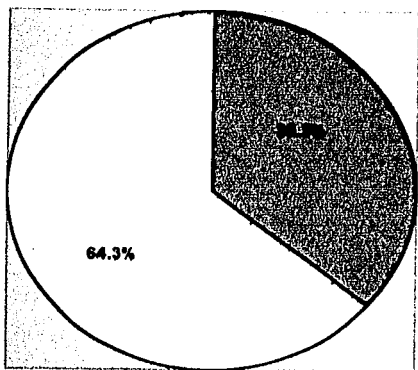


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

GRAFICA 4

FUENTE : EXPEDIENTE

GRUPO EXPERIMENTAL



GRAFICA 5

FUENTE : EXPEDIENTES

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

BIBLIOGRAFIA .

1,Stress,Kelvin j,A Davis , Anne et al.Repair Systems in Oxidative. Molecular Biology of Aging ;123-141.

2.-C.Helen ,M Silverman et al . Antioxidants in neonatal lung disease.Archives of Disease in Childhood 1995;73:F112-116.

3.- P.Graham .et al.Free radical damage in very low birthweighth infant. Archives of Disease in Childhood 1994;70:F107-F111.

4.-Edwin N,Frankel, et, al .Formation of Malonaldehyde from lipid oxidation products . Biochimica et biophysica Acta ,754(1983)264-69.

5.- OD Saugstad ,et al .Mechanisms of tissue injury by oxygen radicals : implications for neonatal disease. Acta paediatr 85:1-4,1996

6.-Jose Gutierrez ,Martha Zentella , et .al .Acute Ethanol Intake Produces lipid peroxidation in rat red blood cells membranes.Biochemistry and molecular biology international.vol 29,no 2 february 1993.

7.-Scand Saugstad ,et al .Oxygen tocity in the neonatal period.Acta Paediatr Scand 1990;79;881-92.

8.-Mc.Coird JM.et al.Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury .JM. N.Engl J Med 1985;312-64.

9.-Frank L, Groseclose EE, et al. Erythrocyte cupric/zinc superoxido dismutase exhibit reduced activity in preterm and low birthweight infants at birth. *Acta Paediatr* 1995;84:1421-5.

10.-Choi DW, Sisesjö et al. Regional variations in chronic lung disease in very low birthweight infants; a prospective population based study. *J paediatr Child Health* 1992;28:301-5.

11.-Kelly Fiet et al. Time course of vitamin E repletion in the premature infant. *Br J Nutr* 1990;63:631-8.

12.-Oliver Cn, Starke-Reed PE, et al. Molecular basis of pulmonary oxygen toxicity. Wispe et al. *Clinic Perinatol* 1987;12:159-63.

13.-Freeman BA, et al. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *J Biol Chem* 1987;262:412-26.

14.-Imlay JA, Chin SM, et al. Correlation of free radicals-induced lipid peroxidation with outcome in very low birthweight infants. *J Pediatrics* 1990;116:760-4.

15.-Gladstone IM, Levine RL. Serum antioxidant activity in neonates. *Arch Dis Child* 1988;63:748-57.