



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**  
**BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**EFFECTO DEL ÁCIDO ALFA LIPOICO SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO, PROCESO  
INFLAMATORIO CRÓNICO Y PRODUCTOS FINALES DE LA GLUCOSILACIÓN  
AVANZADA EN ADULTOS MAYORES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2**

# **T E S I S**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**P R E S E N T A**  
**BEATRIZ ISABEL GARCÍA MARTÍNEZ**

**TUTOR PRINCIPAL:** DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ  
FES ZARAGOZA, UNAM

**COMITÉ TUTOR:** DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO  
FES ZARAGOZA, UNAM

DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI  
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM



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.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**  
**BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**EFFECTO DEL ÁCIDO ALFA LIPOICO SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO, PROCESO  
INFLAMATORIO CRÓNICO Y PRODUCTOS FINALES DE LA GLUCOSILACIÓN  
AVANZADA EN ADULTOS MAYORES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2**

**T E S I S**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**PRESENTA**  
**BEATRIZ ISABEL GARCÍA MARTÍNEZ**

TUTOR PRINCIPAL: DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ  
FES ZARAGOZA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO  
FES ZARAGOZA, UNAM

DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI  
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

OFICIO CPCB/322/2018

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado

Lic. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que el subcomité de Biología Experimental y Biomedicina, del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 12 de febrero de 2018, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna, **GARCÍA MARTÍNEZ BEATRIZ ISABEL** con número de cuenta 408039527 con la tesis titulada "Efecto del ácido alfa lipoico sobre el estrés oxidativo, proceso inflamatorio crónico y productos finales de la glucosilación avanzada en adultos mayores con diabetes mellitus tipo 2", realizada bajo la dirección del DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ:

Presidente: DR. ROBERTO DOMÍNGUEZ CASALÁ  
Vocal: DRA. ALDA ROCÍO ORTIZ MUÑOZ  
Secretario: DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO  
Suplente: DR. ALBERTO MONROY GARCÍA  
Suplente: DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 18 de abril de 2018.

  
DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA  
COORDINADOR DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

## *Agradecimientos*

*En primer lugar, al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.*

*La presente investigación fue realizada gracias al apoyo otorgado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IN 222015).*

*Un agradecimiento muy especial al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo otorgado mediante el Programa de Becas para Estudios de Posgrado, con número de CVU 706595.*

*Al Dr. Víctor Manuel Mendoza Núñez, mi tutor principal, por dirigirme durante la realización de esta investigación, por el tiempo, dedicación y paciencia invertidos, así como por la confianza brindada.*

*A los miembros de mi comité tutor:*

*Dr. Edelmiro Santiago Osorio y Dr. José Pedraza Chaverri, por sus excelentes observaciones y comentarios, pero sobre todo por compartirme su tiempo y sus conocimientos.*

## *Agradecimientos*

*El desarrollo de este trabajo fue llevado a cabo en la Unidad de Investigación en Gerontología de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.*

*Se agradece todo el apoyo otorgado por la clínica de Diabetes del Hospital Regional del ISSSTE “Gral. Ignacio Zaragoza” y la Dra. Martha Mendieta*

*En particular, un agradecimiento a Productos Medix S.A. de C.V. por la donación del tratamiento y el placebo empleados en el presente trabajo.*

*A la Dra. Juana Rosado Pérez por estar al pendiente de la investigación en todo momento.*

*A las Dras. Mirna Ruiz y Raquel Retana por todo el apoyo.*

*Con especial cariño a los integrantes de la Unidad de Investigación en Gerontología.*

*A la Unidad de Investigación en Diferenciación Celular y Cáncer por su valiosa ayuda.*

## *Dedicatorias*

*A todos los voluntarios de la investigación que confiaron en nosotros  
y participaron con entusiasmo y constancia.*

*A Angie, Eve, Danny y Sam por los buenos momentos que pasamos aún en medio de tanto trabajo.*

*A mi familia que me apoya, me brinda un hogar, me reconforta  
y me ayuda a encontrar la motivación para continuar.*

*A mis personas favoritas en el mundo: Jessy y Jesús.  
Los amo muchísimo así que no suelten mi mano.*

*A todos mis amigos que me alentaron y demostraron su cariño y admiración.  
Particularmente, gracias a ti, mi querido Roger.*

*Y finalmente al más importante de todos: Dios.*

# Índice

<b>I.</b>	<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
	<b>ABSTRACT</b>	<b>2</b>
<b>II.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
<b>III.</b>	<b>MARCO TEÓRICO</b>	<b>4</b>
	III.1. Envejecimiento: aspectos teóricos e implicaciones	4
	<i>III.1.1. Algunas explicaciones del envejecimiento</i>	6
	<i>III.1.2. Envejecimiento y padecimientos relacionados</i>	9
	III.2. Diabetes mellitus	10
	<i>III.2.1. Fisiopatología de la diabetes tipo 2</i>	13
	<i>III.2.2. Estrés oxidativo y diabetes mellitus</i>	16
	<i>III.2.3. Formación de AGEs en la diabetes</i>	24
	<i>III.2.4. Inflamación y diabetes</i>	29
	III.3 Ácido alfa lipoico: propiedades y aplicaciones clínicas	34
	<i>III.3.1. Absorción y metabolismo del AAL</i>	35
	<i>III.3.2. Propiedades antioxidantes y quelantes del AAL</i>	36
	<i>III.3.3. Participación de AAL en vías de señalización</i>	38
	<i>III.3.4. Aplicaciones clínicas del AAL</i>	41
	<i>III.3.5. Toxicidad del AAL</i>	48
<b>IV.</b>	<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>50</b>
<b>V.</b>	<b>HIPÓTESIS</b>	<b>51</b>
<b>VI.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>52</b>
	VI.1 Objetivo general	
	VI.2 Objetivos específicos	
<b>VII.</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>53</b>
	VII.1 Universo y tipo de estudio	54

---

VII.2 Variables	55
VII.2.1 <i>Covariables: factores pro-oxidantes y/o proinflamatorios</i>	56
VII.3 Técnicas	56
VII.3.1. <i>Mediciones antropométricas y tensión arterial</i>	56
VII.3.2. <i>Mediciones bioquímicas</i>	57
VII.3.2.1 <i>Concentración de AGE's</i>	59
VII.3.2.2 <i>Medición de marcadores de proceso inflamatorio crónico</i>	60
VII.3.2.3 <i>Medición de marcadores de estrés oxidativo</i>	62
VII.3.3. <i>Cuantificación del contenido de ácido alfa lipoico (AAL) en las cápsulas administradas</i>	67
VII.3.3.1 <i>Linealidad del método analítico para determinación de AAL en cápsulas</i>	68
VII.3.3.2 <i>Precisión/repetibilidad y exactitud del método analítico para determinación de AAL en cápsulas</i>	69
VII.3.3.3 <i>Especificidad del método analítico para la determinación de AAL en cápsulas</i>	69
VII.3.3.4 <i>Cuantificación de AAL en cápsulas</i>	70
VII.3.3.5 <i>Uniformidad de contenido del AAL en las cápsulas</i>	71
VII.3.4. <i>Cuantificación del contenido de AAL en muestras de plasma de los voluntarios</i>	72
VII.3.4.1 <i>Linealidad, precisión y exactitud del sistema</i>	72
VII.3.4.2. <i>Linealidad y exactitud del método analítico para la cuantificación de AAL en muestras de plasma</i>	74
VII.3.4.3 <i>Precisión/repetibilidad del método analítico para cuantificación de AAL en muestras de plasma</i>	75
VII.3.4.4 <i>Especificidad</i>	75
VII.3.4.5 <i>Estabilidad</i>	75
VII.3.3.6 <i>Límite de cuantificación</i>	76
VII.3.5 <i>Cuantificación de AAL en las muestras de plasma</i>	77

---

VII.4. Diseño estadístico	78
VII.5. Aspectos éticos y legales	78
<b>VIII. RESULTADOS</b>	<b>79</b>
<b>IX. DISCUSIÓN</b>	<b>87</b>
<b>X. CONCLUSIONES</b>	<b>96</b>
<b>XI. PERSPECTIVAS</b>	<b>97</b>
<b>XII. REFERENCIAS</b>	<b>98</b>
<b>ANEXOS</b>	
Anexo 1. Consentimiento informado	111
Anexo 2. Cuestionario de Estilos de Vida	113

## ÍNDICE DE FIGURAS

## Página

<b>Figura III.1.</b> Distribución de la población de México por grandes grupos de edad, 1950-2050	5
<b>Figura III.2.</b> Esquema que muestra los siete pilares del envejecimiento y su interacción.	8
<b>Figura III.3.</b> Complicaciones de la diabetes.	12
<b>Figura III.4.</b> Patogénesis de la diabetes mellitus tipo 2.	15
<b>Figura III.5.</b> Clasificación de los sistemas antioxidantes de acuerdo a su función	21
<b>Figura III.6.</b> Vías metabólicas activadas por la hiperglucemia.	22
<b>Figura III.7.</b> Glucosilación no enzimática de proteínas y principales AGEs.	25
<b>Figura III.8.</b> Vía de señalización del NF-KB.	28
<b>Figura III.9.</b> Enfermedades asociadas a la inflamación crónica.	32
<b>Figura III.10</b> Estructura química de R-AAL, S-AAL y del ácido dihidrolipoico (ADHL).	34
<b>Figura III.11.</b> Propiedades antioxidantes del AAL y ADHL.	38
<b>Figura III.12.</b> Participación del AAL en la vía de señalización de la insulina.	40
<b>Figura VII.1.</b> Diagrama de la selección de participantes y conformación de los grupos de estudio.	54
<b>Figura VIII.1.</b> Concentración plasmática de AAL pre y post-tratamiento en los grupos de estudio.	82
<b>Figura VIII.2.</b> Efecto del ácido alfa lipoico sobre la concentración de RAGEs en los grupos de estudio.	82
<b>Figura VIII.3.</b> Efecto del ácido alfa lipoico sobre la HbA1c en los grupos de estudio.	84

---

---

## ÍNDICE DE CUADROS

## Página

<b>Cuadro III.1.</b> Criterios diagnósticos de DM y prediabetes por la Asociación Americana de Diabetes	11
<b>Cuadro III.2.</b> Estudios de la absorción del ácido alfa lipoico en voluntarios sanos.	36
<b>Cuadro III.3.</b> Usos clínicos del ácido alfa lipoico (AAL).	44
<b>Cuadro III.4.</b> Toxicidad del AAL en algunos modelos animales.	49
<b>Cuadro VII.1</b> Operacionalización de las variables del estudio.	55
<b>Cuadro VII.2</b> Resultados generales de la validación del método analítico para la determinación en cápsulas.	71
<b>Cuadro VII.3</b> Resultados de la cuantificación de ácido lipoico en las cápsulas.	71
<b>Cuadro VII.4</b> Resultados de la uniformidad de contenido de ácido alfa lipoico en las cápsulas.	72
<b>Cuadro VII.5</b> Resultados generales de la validación del método analítico para cuantificación de ácido alfa lipoico en plasma.	77
<b>Cuadro VIII.1</b> Parámetros clínicos y antropométricos pre y post-tratamiento en los grupos de estudio.	79
<b>Cuadro VIII.2</b> Parámetros bioquímicos pre y post-tratamiento en los grupos de estudio.	80
<b>Cuadro VIII.3</b> Marcadores de estrés oxidativo pre y post-tratamiento en los grupos de estudio.	81
<b>Cuadro VIII. 4.</b> Efecto del ácido alfa lipoico sobre el proceso inflamatorio en los grupos de estudio.	83
<b>Cuadro VIII.5</b> Regresión lineal múltiple para la concentración de AAL con RAGEs y marcadores de estrés oxidativo, post-tratamiento.	85
<b>Cuadro VIII.6</b> Regresión lineal múltiple para la concentración de AAL con marcadores de inflamación crónica, post-tratamiento.	86

---

---

## Abreviaturas

<b>8-OHdG</b>	8-hidroxi guanosina
<b>AAL</b>	Ácido alfa lipoico
<b>ADA</b>	Asociación Americana de Diabetes
<b>ADHL</b>	Ácido dihidrolipoico
<b>ADP</b>	Adenin difosfato
<b>AGEs</b>	Productos finales de la glucosilación avanzada (del inglés Advanced Glycosilation End products)
<b>Akt</b>	Cinasas serina/treonina
<b>ALEs</b>	Productos finales de lipooxidación avanzada (del inglés Advanced Lipooxidation End products)
<b>AM</b>	Adultos mayores
<b>ANOVA</b>	Análisis de la varianza
<b>AP-1</b>	Proteína activadora
<b>ATP</b>	Adenin trifosfato
<b>CaMKK</b>	Calmodulina dependiente de cinasas
<b>CAT</b>	Capacidad antioxidante total
<b>CML</b>	Carboximetil-lisina
<b>CREB-1</b>	Elementos de respuesta al Camp
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>DHAP</b>	Dihidroxiacetona-fosfato
<b>DM2</b>	Diabetes mellitus tipo 2
<b>ECNT</b>	Enfermedades crónicas no transmisibles
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EO</b>	Estrés oxidativo
<b>ERG</b>	Respuesta temprana de crecimiento
<b>ERNs</b>	Especies reactivas de nitrógeno
<b>EROs</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>GA3P</b>	Gliceraldehído-3-fosfato
<b>GLUT</b>	Transportador de glucosa
<b>GPx</b>	Glutación peroxidasa
<b>GSH</b>	Glutación reducido
<b>GSSG</b>	Glutación oxidado
<b>HbA1c</b>	Hemoglobina glucosilada
<b>IC</b>	Inflamación crónica
<b>ICAM</b>	Molécula de adhesión intercelular
<b>IKK</b>	Proteína inhibidora
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IRS</b>	Sustrato del receptor de insulina
<b>IκBα</b>	Proteína inhibidora del κB
<b>LCB</b>	Cinasa hepática B
<b>MAPK</b>	Cinasas activadas por mitógenos
<b>MDA</b>	Malonaldehído

---

<b>NAD</b>	Nicotin adenin dinucleótido
<b>NADH</b>	Nicotin adenin dinucleótido reducido
<b>NADP</b>	Nicotin adenin dinucleótido fosfato
<b>NADPH</b>	Nicotin adenin dinucleótido fosfato reducido
<b>NFκB</b>	Factor nuclear κB
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PCK</b>	Proteincinasa C
<b>PCR</b>	Proteína C reactiva
<b>PGE</b>	Prostaglandinas
<b>PIC</b>	Proceso inflamatorio crónico
<b>PI3K</b>	Fosfatilinositol-3-cinasa
<b>RAGE</b>	Receptor de los AGEs
<b>RI</b>	Resistencia a la insulina
<b>RL</b>	Radicales libres
<b>SM</b>	Síndrome metabólico
<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa
<b>TNFα</b>	Factor de necrosis tumoral α
<b>VCAM</b>	Molécula de adhesión vascular celular

## I. RESUMEN

**Antecedentes:** El envejecimiento es un proceso biológico, gradual y adaptativo caracterizado por una disminución de la respuesta homeostática, lo que incrementa la vulnerabilidad del organismo a ciertas enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) entre las que destacan la diabetes mellitus tipo 2 (DM2). La DM2 es una enfermedad metabólica que cursa con estrés oxidativo (EO) e inflamación crónica (IC), cuyas alteraciones contribuyen en la fisiopatología de las complicaciones micro y macrovasculares que se presentan en la DM2. Por tal motivo, se han propuesto algunas opciones terapéuticas para prevenir y controlar el EO e IC. En este sentido, el ácido alfa lipoico (AAL) es uno de los suplementos más utilizados por sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias en adultos, sin embargo, son escasos los estudios realizados en adultos mayores.

**Objetivo:** Evaluar el efecto de la administración oral de AAL sobre estrés oxidativo, proceso inflamatorio crónico y productos finales de la glucosilación avanzada (AGEs) en adultos mayores con DM2.

**Material y métodos:** Previo consentimiento informado, se realizó un estudio aleatorizado, doble ciego, controlado, en una población de 108 adultos mayores con diabetes mellitus tipo 2 con tratamiento de hipoglucemiantes orales por 5 años o menos, sin daño hepático ni renal. Para tal efecto se conformaron en 3 grupos: 1) grupo experimental (GE), n=42 a quienes se les administró AAL 600mg/ día, 2) grupo placebo (GP), n=38 a quienes se les administró un placebo con la misma presentación del tratamiento, y 3) grupo control (GC), n=28, quienes no recibieron ningún suplemento. A todos los participantes se les realizaron mediciones antropométricas (peso, estatura, índice de masa corporal, perímetro de la cintura y de la cadera), química sanguínea y biometría hemática, empleando técnicas espectrofotométricas. También se midió el grado de EO a través de la concentración de 8-isoprostanos mediante ELISA, la capacidad antioxidante total (CAT) y la actividad de las enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx), mediante espectrofotometría. La IC fue evaluada mediante las concentraciones séricas de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12p70, IL-8 e IL-10 por citometría de flujo, además se midieron las concentraciones de la proteína C reactiva (PCR) por turbidimetría. Los AGEs fueron cuantificados a través de su receptor (RAGE) por ELISA. Además, se midió la hemoglobina glucosilada (HbA1c). También se cuantificó la concentración plasmática de AAL en los tres grupos de estudio. Las pruebas fueron realizadas al inicio y a los 6 meses. Los datos fueron analizados con la prueba de ANOVA de medidas repetidas y regresión lineal múltiple, utilizando el paquete estadístico SPSS V.15.0.

**Resultados:** Se observó un incremento estadísticamente significativo en la concentración sanguínea de AAL en el GE (basal, 0.222 vs. post-tratamiento, 3.503), en comparación con el GP (basal, 0.2 vs. post-tratamiento, 0.179) y GC (basal, 0.2012 vs. 6 meses, 0.97) ( $p < 0.01$ ). Asimismo, los GE y GP mostraron una disminución estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) en la concentración sanguínea de 8-isoprostanos respecto al GC (GE: basal,  $100 \pm 3$  vs. post-tratamiento,  $57 \pm 3$ ; GP: basal,  $106 \pm 7$  vs. post-tratamiento,  $77 \pm 5$ ; GC: basal,  $94 \pm 10$  vs. 6 meses  $107 \pm 11$  pg/mL). También se observó una disminución estadísticamente significativa en la actividad de la SOD en el GC (basal,  $182 \pm 2$  vs 6 meses,  $172 \pm 1$  UI/L,  $p < 0.05$ ) respecto al GE (basal,  $178 \pm 1$  vs. post-tratamiento,  $177 \pm 1$  UI/L) y al GP (basal,  $176 \pm 1$  vs. post-tratamiento,  $172 \pm 1$  UI/L). Igualmente, la actividad de la GPx mostró una disminución estadísticamente significativa en el GC (basal,  $9531 \pm 815$  vs 6 meses,  $6223 \pm 613$  UI/L,  $p < 0.05$ ) en comparación con el GE (basal,  $8409 \pm 507$  vs. post-tratamiento,  $9694 \pm 458$  UI/L) y el GP (basal,  $8273 \pm 575$  vs. post-tratamiento,  $8691 \pm 355$  UI/L). Por otro lado, se encontró una disminución estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) en la concentración de los RAGEs en el GE (basal, 1636 vs. post-tratamiento, 1144) y en el GP (basal, 1506 vs. post-tratamiento, 1016) en comparación con el GC (basal, 1407 vs. 6 meses, 1506). Respecto a los marcadores pro-inflamatorios, en todos los parámetros evaluados el GC mostró un incremento estadísticamente significativo después de 6 meses ( $p < 0.05$ ) respecto a los GE y GP. Además, se observó una correlación positiva entre la concentración sanguínea de AAL con la actividad de la SOD ( $r = 0.279$ ,  $p < 0.01$ ) y de la GPx ( $r = 0.249$ ,  $p < 0.05$ ), aunada a una correlación negativa con la concentración de 8-isoprostanos ( $r = -0.247$ ,  $p < 0.05$ ) (Cuadro VIII.5). También se encontró una correlación negativa entre la concentración sanguínea de AAL con IL12p70 ( $r = -0.220$ ,  $p < 0.05$ ), TNF $\alpha$  ( $r = -0.250$ ,  $p < 0.05$ ), IL6 ( $r = -0.249$ ,  $p < 0.05$ ) y IL1 $\beta$  ( $r = -0.329$ ,  $p < 0.01$ ).

**Conclusiones:** Nuestros hallazgos sugieren que el tratamiento suplementario de AAL con dosis de 600mg/día tiene efecto antioxidante y antiinflamatorio similar al efecto placebo en adultos mayores con DM2.

## ABSTRACT

**Background:** Aging is a biological, gradual and adaptive process characterized by a decrease in homeostatic response, which increases the vulnerability of the organism to certain non-transmissible chronic diseases (NTCD), among which type 2 diabetes mellitus (T2DM) stands out. T2DM is a metabolic disease that occurs with oxidative stress (OS) and chronic inflammation (CI), whose alterations contribute to pathophysiology of micro and macrovascular complications that occur in T2DM. For this reason, some therapeutic options have been proposed to prevent and control OS and CI. In this sense, alpha lipoic acid (ALA) is one of the most used supplements for its antioxidant and anti-inflammatory properties in adults, however, there are few studies performed in older adults.

**Aim:** To evaluate the effect of oral administration of ALA on oxidative stress, chronic inflammatory process and advanced glycation end products (AGEs) in older adults with T2DM.

**Design:** Prior informed consent, a randomized, double-blind, controlled study was conducted in a population of 108 older adults with T2DM treated with oral hypoglycemic agents for 5 years or less, without liver or kidney damage. For this purpose, they were divided into 3 groups: 1) experimental group (EG), n= 42 who received 600mg/day of ALA, 2) placebo group (PG), n= 38 who received a placebo with the same presentation of treatment, and 3) control group (CG), n= 28, who did not receive any supplement. All participants underwent anthropometric measurements (weight, height, body mass index, waist and hip circumference), blood chemical and blood count, by spectrophotometric techniques. The degree of OS was measured through serum levels of 8-isoprostanes by ELISA, total antioxidant capacity (TAC) and activity of antioxidant enzymes: superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx), by spectrophotometry. The CI was evaluated by means of serum concentrations of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12p70, IL-8 and IL-10 by flow cytometry, in addition the concentrations of C reactive protein (CRP) were measured by turbidimetry. AGEs were measured through their receptor (RAGE) by ELISA. In addition, glycated hemoglobin (HbA1c) was measured. The plasma levels of ALA were also measured in three study groups. The tests were performed at the beginning and at 6 months. The data were analyzed with the repeated measures ANOVA test and multiple linear regression, using the statistical package SPSS V.15.0.

**Outcomes:** There was a statistically significant increase on serum levels of ALA in the EG (baseline, 0.222 vs. post-treatment, 3.503), compared to PG (baseline, 0.2 vs, post-treatment, 0.179) and CG (baseline, 0.2012 vs. 6 months, 0.97) ( $p < 0.01$ ). Likewise, EG and PG showed a statistically significant decrease ( $p < 0.05$ ) on serum levels of 8-isoprostanes compared to CG (EG: basal,  $100 \pm 3$  vs, post-treatment,  $57 \pm 3$ ; PG: basal,  $106 \pm 7$  vs. post-treatment,  $77 \pm 5$ ; CG: baseline,  $94 \pm 10$  vs. 6 months  $107 \pm 11$  pg / mL). There was also a statistically significant decrease in SOD activity on CG (baseline,  $182 \pm 2$  vs. 6 months,  $172 \pm 1$  IU / L,  $p < 0.05$ ) compared to the EG (baseline,  $178 \pm 1$  vs. post-treatment,  $177 \pm 1$  IU / L) and PG (baseline,  $176 \pm 1$  vs. post-treatment,  $172 \pm 1$  IU / L). Similarly, activity of GPx showed a statistically significant decrease in the CG (baseline,  $9531 \pm 815$  vs 6 months,  $6223 \pm 613$  IU / L,  $p < 0.05$ ) compared to EG (baseline,  $8409 \pm 507$  vs. post -treatment,  $9694 \pm 458$  UI / L) and PG (baseline,  $8273 \pm 575$  vs. post-treatment,  $8691 \pm 355$  UI / L). On the other hand, we found a statistically significant decrease ( $p < 0.05$ ) on serum levels of RAGEs in EG (baseline, 1636 vs. post-treatment, 1144) and PG (baseline, 1506 vs. post-treatment, 1016) compared to CG (baseline, 1407 vs. 6 months, 1506). Regarding the pro-inflammatory markers, CG showed a statistically significant increase in all evaluated parameters after 6 months ( $p < 0.05$ ) with respect to EG and PG. In addition, a positive correlation was observed between the blood concentration of ALA with the activity of SOD ( $r = 0.279$ ,  $p < 0.01$ ) and of GPx ( $r = 0.249$ ,  $p < 0.05$ ), as well as a negative correlation with concentration of 8-isoprostanes ( $r = -0.247$ ,  $p < 0.05$ ). (Table VIII.5). A negative correlation was also found between blood concentration of ALA with IL12p70 ( $r = -0.220$ ,  $p < 0.05$ ), TNF $\alpha$  ( $r = -0.250$ ,  $p < 0.05$ ), IL6 ( $r = -0.249$ ,  $p < 0.05$ ) and IL1 $\beta$  ( $r = -0.329$ ,  $p < 0.01$ ).

**Conclusion:** Our findings suggest that supplementary treatment of AAL with a dose of 600 mg/day has an antioxidant and anti-inflammatory effect similar to placebo effect in older adults with T2DM.

## II. INTRODUCCIÓN

El envejecimiento humano es un proceso biológico, psicológico y social complejo que afecta a todos los seres vivos y abarca cuatro niveles: fisiológico, morfológico, celular y molecular. Dicho proceso implica disminución en la capacidad del organismo para mantener la homeostasis, haciéndolo susceptible a desarrollar enfermedades crónicas, mismas que en última instancia pueden causar la muerte.

El envejecimiento poblacional y sus implicaciones han despertado el interés por parte de la comunidad científica debido a la transición demográfica que se ha experimentado en los últimos 50 años, puesto que en la actualidad el 11 % de la población mundial son mayores de 60 años y se espera que en 2050 esta cifra sea del 22%. En nuestro país en el año 2017, el 10,5% de la población total (12, 973, 411) era  $\geq 60$  años de edad y las proyecciones demográficas indican que para 2050, el 27,7% (33.7 millones) de la población mexicana tendrá 60 años o más. Además, la esperanza de vida promedio a los 60 años actualmente es de 22 años. Esta situación demográfica tiene implicaciones legales, sociales y económicas y, sobre todo, riesgos para la salud.

Ante este panorama, surge un gran reto para la medicina y los sistemas de salud, ya que paralelamente al incremento en la esperanza de vida se ha presentado un aumento significativo en la incidencia de las enfermedades asociadas a la vejez, entre las que destacan la hipertensión arterial, el síndrome metabólico, la enfermedad de Alzheimer, el cáncer y la diabetes mellitus tipo 2 (DM2).

En México la DM2 se presentan con elevada frecuencia en los adultos mayores, quienes además cursan con cierto grado de inflamación y estrés oxidativo (EO). En este sentido, las evidencias científicas han demostrado que los sujetos diabéticos presentan un marcado daño oxidativo, así como un estado inflamatorio crónico; lo que, aunado a la hiperglucemia, contribuye a la aparición de complicaciones a nivel micro y macrovascular (neuropatía, retinopatía, nefropatía, enfermedad cardiovascular, etc).

Dado lo anterior, se ha optado por el empleo de tratamientos complementarios a la terapia hipoglucemiante convencional, estos tratamientos incluyen el uso de suplementos terapéuticos con propiedades antioxidantes y anti-inflamatorias tales como: vitamina C, vitamina E, coenzima Q10, ácidos grasos (omegas 3 y 6), melatonina y en recientes años el ácido alfa lipoico (AAL).

El AAL es un compuesto químico de naturaleza ditiólica (posee 2 grupos –SH), capaz de atravesar la membrana celular, lo que le permite distribuirse fácilmente por todo el organismo. Dadas sus características químicas, que le confieren propiedades: antioxidante, anti-inflamatoria e incluso hipoglucemiante; ha resultado ser de gran utilidad en el tratamiento de las complicaciones de la DM2, principalmente la neuropatía diabética.

Pese a la gran cantidad de estudios existentes respecto a la utilidad clínica del AAL en adultos, los resultados en cuanto a su empleo en adultos mayores diabéticos no son consistentes, lo que dio la pauta a la realización de la presente investigación, cuya finalidad fue evaluar el efecto antioxidante, anti-inflamatorio e hipoglucemiante del AAL (600 mg/día) en adultos mayores con DM2.

### III. MARCO TEÓRICO

A lo largo de la historia de la humanidad se han sumado numerosos esfuerzos con la intención de explicar por qué envejecemos. Desde la época de los antiguos griegos se consideraba que el envejecimiento y la muerte eran fenómenos naturales e inevitables, además se concebía a la vejez como un estado intermedio entre la salud y la enfermedad. Aun cuando dicho estado no era considerado patológico, se caracterizaba por el hecho de encontrar las funciones biológicas reducidas y debilitadas.<sup>1</sup>

Actualmente existen diversas maneras para definir al envejecimiento, siendo la más aceptada aquella que lo concibe como un proceso continuo, universal e irreversible, que implica un conjunto de cambios a nivel molecular, celular, morfológico y fisiológico, cuyo resultado es la disminución de la capacidad de adaptación por parte del organismo, haciéndolo susceptible a diversas enfermedades y por lo tanto aumentando la probabilidad de muerte.<sup>2-3</sup>

Independientemente de la forma en que se conciba al envejecimiento, es un hecho que las personas envejecen conforme transcurre su ciclo de vida.

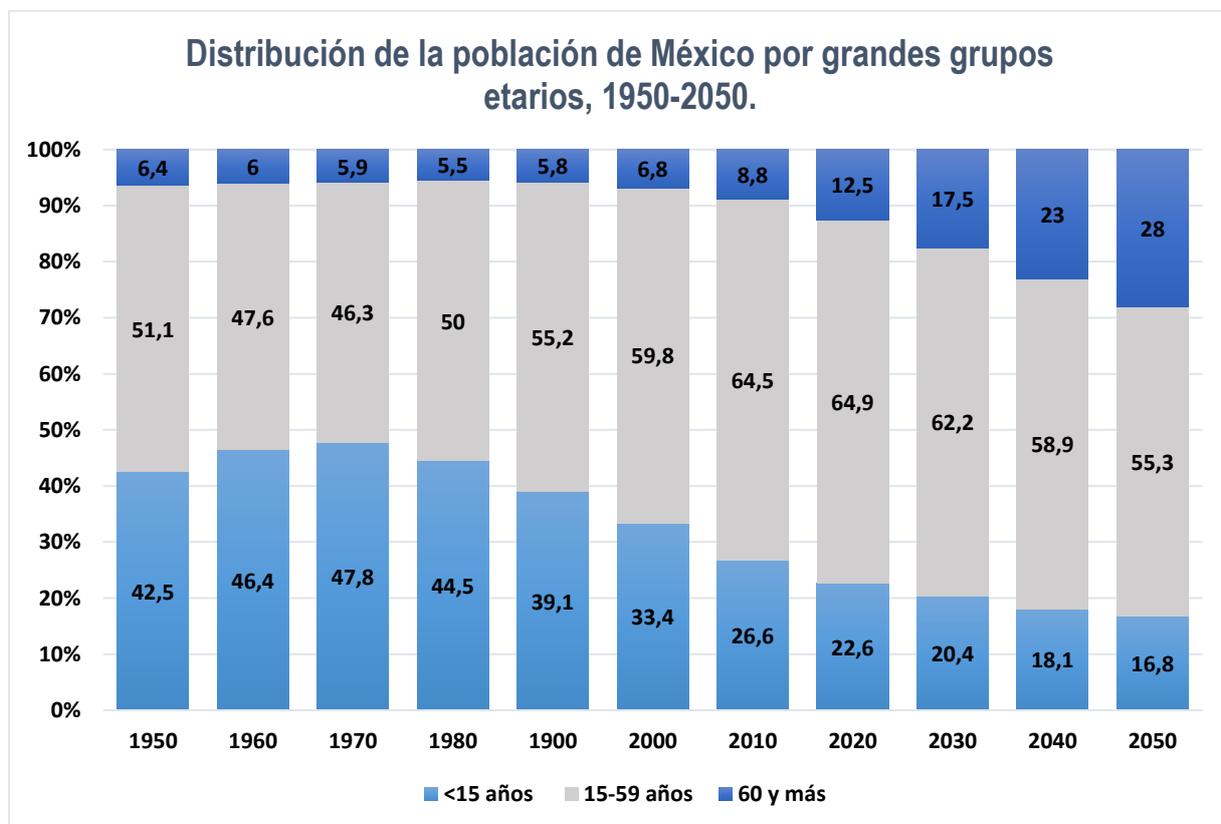
#### III.1. Envejecimiento: aspectos teóricos e implicaciones

Desde el punto de vista biológico, el envejecimiento es un proceso universal, intrínseco, progresivo y adaptativo, caracterizado por una disminución relativa de la reserva y respuesta biológica ante las exigencias para mantener o recuperar la homeostasis; la principal característica es la pérdida del rendimiento de órganos, aparatos y sistemas, como resultado de las modificaciones morfológicas, fisiológicas, bioquímicas, psicológicas y sociales, propiciadas por la carga genética y el desgaste acumulado ante los retos que enfrenta la persona a lo largo de su historia en un ambiente determinado.<sup>3</sup>

Durante el proceso se presentan algunos cambios inevitables como pérdida del tejido óseo, reducción de la masa muscular, disminución de la función respiratoria, disminución de la capacidad cognoscitiva, elevación de la tensión arterial y degeneración macular, las cuales predisponen a condiciones incapacitantes como osteoporosis, enfermedad cardíaca, demencia y ceguera, entre otras. En este sentido el envejecimiento representa el principal factor de riesgo relevante para la aparición de enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT), ya que las vías que modulan la longevidad están implicadas en el desarrollo de diversas patologías.<sup>4-6</sup>

Hasta nuestros días, los avances tecnológicos respecto a la prevención y tratamiento de las enfermedades crónicas han permitido el incremento en la esperanza de vida de la población mundial. Así a mediados del siglo XX la esperanza de vida era de tan sólo 47 años mientras que en la actualidad es de 73 años y se espera que alcance los 76 años a mediados del siglo XXI. A nivel mundial la población mayor de 60 años ha aumentado de un 8% a un 11% en las últimas décadas y se proyecta que dicha proporción alcanzará hasta un 22% para el año 2050, es decir, que para entonces 1 de cada 5 habitantes será mayor de 60 años.<sup>7-8</sup>

En México la esperanza de vida pasó de 36 años en 1950 a 74 años en 2010, actualmente la esperanza de vida es de 76 años y se espera que para 2050 sea de 80 años. En este contexto la proporción de la población con una edad mayor de 60 años también ha ido en incremento. En la actualidad representa el 10% de la población total y según las estimaciones del CONAPO en 2020 dicha proporción podría alcanzar hasta un 12.5%, en tanto, para 2050 la proporción de adultos mayores de 60 años sería de hasta 28% (figura III.1).<sup>9</sup>



**Figura III.1.** Distribución de la población de México por grandes grupos de edad, 1950-2050. Se observa el incremento en la proporción de la población mayor de 60 años entre 1950 y 2010, así como la proyección en el incremento de dicha proporción hacia 2050. Fuente INEGI 2016.

No obstante, el incremento en la esperanza de vida no garantiza que todos los adultos mayores (AM) alcancen los 76 años en un estado saludable ya que la esperanza de vida saludable apenas alcanza los 66 años lo cual implica que durante 10 años los AM cursan con cierta carga de enfermedad y dependencia. La creciente prevalencia de las enfermedades crónicas en este grupo etario representa un gran reto económico y social debido a que compromete la funcionalidad de los AM, genera discapacidad y conduce gradualmente a la dependencia, lo que representa un incremento en el costo de atención a la salud.<sup>10</sup>

Por lo anterior se hace necesario generar conocimiento que permita realizar los cambios pertinentes en los sistemas de salud para lograr que sean capaces de proporcionar los cuidados y atenciones que los AM requieren. En este sentido, un gran número de investigadores en todo el mundo se ha dado a la tarea de profundizar los conocimientos en materia de envejecimiento con la finalidad de entender los mecanismos implicados en la estrecha relación existente entre este proceso y las ECNT, de ahí que a la fecha existan diversas teorías que intentan explicarlo.<sup>10-11</sup>

### *III.1.1. Algunas explicaciones del envejecimiento*

Como se ha mencionado antes, desde la antigüedad se ha tenido la necesidad de explicar por qué envejecemos. Los antiguos griegos pensaban que estamos conformados por agua, tierra, fuego y aire, y dado que tales elementos tienden a destruirse entre sí, al mezclarse dentro de un mismo organismo provocan su muerte, por tanto, envejecer y morir era natural e inevitable. También hubo quienes creían al nacer poseemos una especie de “combustible” cuya cantidad va disminuyendo conforme transcurre el tiempo, llegando al punto en el cual dicho combustible se agota y la muerte se hace presente.<sup>1,12</sup>

A partir de la segunda mitad del siglo XX comenzaron a surgir distintas teorías para explicar el envejecimiento, desde las que consideran que es resultado de la acumulación de alteraciones hasta las que suponen que es un fenómeno predeterminado. Hacia 1990 se tenía conocimiento de la existencia de al menos 300 teorías que intentaban explicar el proceso de envejecimiento y dicho número continúa creciendo hasta nuestros días, como resultado del creciente entendimiento de todos los procesos que ocurren en el envejecimiento. Gracias a los conocimientos actuales en el campo de la biología celular y molecular, se han logrado proponer nuevas teorías que integran tanto los conocimientos más antiguos como los más recientes, sin embargo, aún no es posible unificar todas las teorías existentes.<sup>13-14</sup>

Se ha intentado agrupar las teorías más relevantes en dos grandes grupos: 1) las estocásticas que sostienen que el envejecimiento es producto de la acumulación de acontecimientos perjudiciales y, 2) las deterministas o no estocásticas que sugieren que el envejecimiento es un proceso programado dentro del genoma de cada organismo.<sup>1,12-13</sup>

Del primer grupo cabe resaltar la teoría del entrecruzamiento, ésta sostiene que existen ciertos enlaces entre las moléculas, los cuales son capaces de acelerar el envejecimiento y desencadenar enfermedades, el ejemplo de ello es la glucosilación de proteínas que se observa en personas diabéticas, cuya principal consecuencia es la alteración en la funcionalidad de dichas biomoléculas, lo que ocasiona daño celular y paulatinamente a los tejidos, órganos y sistemas. Asimismo, destaca la teoría del daño oxidativo propuesta por el Dr. Harman en 1956, esta teoría que los daños generados por radicales libres (RL) de oxígeno se acumulan debido a la disminución en la capacidad antioxidante del organismo conforme transcurre el tiempo y que dicha acumulación provoca el mal funcionamiento a nivel celular, tisular y de órganos, conduciendo finalmente a la muerte del organismo. Ambas teorías resultan de gran relevancia en la presente investigación debido al papel del daño oxidativo, así como del entrecruzamiento molecular en la fisiopatología de la diabetes mellitus tipo 2 (DM2).<sup>1,13-14</sup>

Por otra parte, se encuentran las teorías deterministas también llamadas genéticas que intentan explicar el envejecimiento a partir de factores genéticos y sostienen que existe un límite de edad para el envejecimiento según la especie. Entre las teorías que conforman este grupo destacan la teoría de la muerte celular apoptótica y la teoría del acortamiento de los telómeros. También se ha intentado explicar el envejecimiento bajo un enfoque evolutivo en el cual se postula que la senescencia es una adaptación necesaria ya que sin ella el recambio y la renovación celular resultarían perjudicados, por lo tanto, el envejecimiento no está programado, sino que es resultado de procesos biológicos normales que además son necesarios para la vida.<sup>13,14</sup>

A pesar de los diversos enfoques bajo los cuales se pretende explicar el proceso de envejecimiento, hasta el momento no existe una teoría capaz de explicar todos los mecanismos implicados dada su naturaleza multifactorial; sin embargo, los investigadores en este campo han intentado unificar las teorías existentes con la finalidad de dilucidar dichos mecanismos. Actualmente se ha propuesto la existencia de siete comunes denominadores, celulares y moleculares, cuyos mecanismos juegan un importante rol en el proceso de envejecimiento, razón por la cual se les considera los siete pilares del envejecimiento (figura III.2).<sup>11,15-16</sup>

La interacción entre los llamados pilares del envejecimiento además de tener un papel clave en dicho proceso ha sido ligada a la fisiopatología de muchos padecimientos entre los que destacan enfermedad cardiovascular, enfermedad renal crónica, cáncer, enfermedad de Alzheimer, hipertensión arterial, inflamación, síndrome metabólico y DM2. Por tal razón se considera al envejecimiento como el factor de riesgo más importante para el desarrollo de ECNT.<sup>11,17</sup>



**Figura III.2.** Esquema que muestra los siete pilares del envejecimiento (daño macromolecular, epigenética, inflamación, adaptación al estrés, proteostásis, células troncales y regeneración celular, metabolismo) y su interacción. La compleja red que intercomunica a los 7 procesos aún no ha sido completamente dilucidada puesto que no se tiene claridad acerca de los mecanismos implicados; sin embargo, los 7 pilares propuestos son comunes denominadores tanto del envejecimiento como de las enfermedades que predominan en la etapa de la vejez. Se ha propuesto que el entendimiento de cómo el envejecimiento habilita el desarrollo de ciertas patologías dirigirá el conocimiento hacia la propuesta de nuevas terapias que permitan prevenir y/o tratar múltiples enfermedades de manera simultánea, ya que hasta ahora el tratamiento de las enfermedades crónicas ha resultado inadecuado y fragmentado. Tomado de Kennedy et al, 2014.<sup>11</sup>

### *III.1.2. Envejecimiento y enfermedades crónicas no transmisibles*

Como ya se ha mencionado la esperanza de vida ha sufrido importantes modificaciones en las últimas décadas, de tal manera que se proyecta que para 2050 la población mexicana tendrá una expectativa de vida hasta de 80 años. Sin embargo, también se ha evidenciado el incremento en la prevalencia de ECNT como hipertensión arterial, obesidad, dislipidemia y DM2, entre otras; lo cual afecta significativamente la calidad de vida de los AM ya que las ECNT tienen un alto riesgo de complicaciones que afectan la funcionalidad física, mental y social. De manera paralela al aumento de las enfermedades relacionados a desórdenes metabólicos, también se ha hecho evidente la aparición de alteraciones neurodegenerativas en los AM, destacando las enfermedades de Parkinson y Alzheimer. Esto genera elevados costos y acentúa la necesidad de realizar las modificaciones pertinentes en materia de salud para brindar los servicios que los AM requieren.<sup>2,9,10,13</sup>

En la actualidad las principales causas de muerte entre los mexicanos están relacionadas con las ECNT. En primer lugar, se encuentran las defunciones por DM2, seguidas de las provocadas por enfermedades isquémicas del corazón, cáncer, enfermedades cerebrovasculares y hepáticas, respectivamente. Entre la población mayor de 60 años el 17.1% de las muertes es a causa de la DM2 mientras que las enfermedades isquémicas son responsables del 16.9% de las defunciones, y las enfermedades cerebrovasculares son responsables del 6.8%, el resto de las muertes son causadas por enfermedades hepáticas, de vías respiratorias, y cáncer, por mencionar algunas.<sup>13,18-19</sup>

Por otro lado, el sobrepeso y la obesidad en los AM se han incrementado en las últimas décadas, situación que resulta preocupante debido a que se incrementa el riesgo de padecer síndrome metabólico (SM). El SM comprende un conjunto de factores de riesgo para enfermedades cardiovasculares y DM2, esto resulta considerablemente preocupante ya que su prevalencia entre la población mexicana es de un 40% y lo más grave es que se presenta también en personas jóvenes, incluyendo niños. La prioridad en atender este problema de salud radica en que incrementa el riesgo de padecer DM2, enfermedad responsable de la mayor proporción de muertes en México.<sup>2,18,20</sup>

A nivel mundial, en el año 2012 México se ubicaba en la novena posición en cuanto a muertes por causa de DM2, situación que, a la fecha implica un grave problema de salud, mismo que requiere ser atendido con urgencia.<sup>2,18</sup>

### III.2. Diabetes mellitus tipo 2

Se define a la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) como un desorden metabólico caracterizado por la presencia de hiperglucemia, la cual surge como resultado de la deficiencia en la producción y/o acción de la insulina, una hormona peptídica secretada por las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans del páncreas la cual interviene en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas. Hasta el momento se sabe que la DM2 es una enfermedad muy compleja y de origen desconocido, aunque fuertemente influenciada por factores genéticos, así como ambientales.<sup>21-23</sup>

De acuerdo con la Asociación Americana de Diabetes (ADA) existen 4 tipos de diabetes:<sup>22,24</sup>

1. DM tipo 1, generalmente de etiología autoinmune, caracterizada por la destrucción casi en su totalidad de las células  $\beta$  pancreáticas, lo que genera deficiencia de insulina y se hace necesario obtenerla farmacológicamente. Este tipo de DM representa entre 5% y 10% de la totalidad de DM.
2. DM tipo 2 la cual se genera como consecuencia de un defecto progresivo en la secreción y/o acción de la insulina, provocando resistencia periférica a la misma y por ende un aumento en los niveles sanguíneos de glucosa. Se asocia a obesidad y SM, además de estar fuertemente influenciada por la constitución genética individual. La DM2 representa entre 90% y 95% de las DM.
3. Diabetes gestacional en la cual la hiperglicemia puede presentarse en cualquier etapa del embarazo, generalmente es transitoria, de manera que desaparece tras el parto.
4. Diabetes producida por otros factores como virus, químicos, síndromes o alteraciones genéticas específicas. En este grupo se incluye: diabetes inducida por esteroides, diabetes relacionada a fibrosis quística, asociada a acromegalia, asociada a VIH, asociada a virus de hepatitis C o síndrome de ovario poliquístico.

Clínicamente se define a la DM2 como el incremento de la glucosa sanguínea en ayuno  $> 126\text{mg/dL}$  y/o  $\geq 200\text{mg/dL}$  dos horas después de la ingesta de alimento o 75g de glucosa. En tanto, la prediabetes es un término empleado para definir a sujetos con mayor riesgo de desarrollar DM pues su glucemia se encuentra relativamente alta ( $\geq 100\text{ mg/dL}$ ), aunque no lo suficiente para diagnosticar diabetes.<sup>22,24-25</sup>

La OMS y la ADA han establecido algunos criterios para el diagnóstico de DM, así como de prediabetes, dichos criterios se muestran en el cuadro III.1.<sup>25-26</sup>

**Cuadro III.1.** Criterios diagnósticos de DM y prediabetes por la Asociación Americana de Diabetes 2017.

<b>Criterio</b>	<b>Diabetes</b>	<b>Prediabetes</b>
Glucosa sérica en ayuno	≥ 126 mg/dL	100-125 mg/dL
Glucosa sérica de 2 horas tras carga oral de 75g de glucosa	≥ 200 mg/dL	140-199 mg/dL
Hemoglobina glucosilada	≥ 6.5%	5.7 a 6.4%

De acuerdo con las estimaciones de la OMS, 482 millones de adultos en todo el mundo tenían diabetes en 2014, cifra que representaba el 8.5% de la población adulta y se proyecta que en 2030 dicha cifra alcanzará los 552 millones, correspondientes a casi el 10% de la población mundial. También se sabe que actualmente la DM2 es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. En México la prevalencia de DM2 pasó de 9.2% en 2012 a 9.4% en 2016, afectando en su mayoría a las mujeres (10.3% vs 8.4% en hombres). La prevalencia observada en adultos entre 60-69 años alcanzó el 32.7% y el 29.8% en aquellos entre 70-79 años.<sup>18,27-29</sup>

La prevalencia de la DM2 ha incrementado en las últimas décadas como resultado de la urbanización, el envejecimiento de la población, la obesidad, el sedentarismo, el consumo de alimentos con alto contenido calórico y los cambios en el estilo de vida. En los AM el riesgo de padecer DM2 es dos veces mayor con respecto al resto de la población, sugiriendo que los mecanismos biológicos propios del envejecimiento afectan la capacidad del organismo para mantener los niveles de glucosa adecuados.<sup>11,20,22</sup>

La hiperglucemia que caracteriza a la DM2 no solo altera el metabolismo de los carbohidratos sino el de proteínas y lípidos. Tales alteraciones metabólicas contribuyen a largo plazo, a la aparición de daño y disfunción de algunos órganos como los ojos, riñones y corazón; además como consecuencia de la hiperglucemia también se ve afectada la funcionalidad de los nervios y vasos sanguíneos.<sup>22</sup>

Las complicaciones de la DM2 entre las que destacan enfermedad cardiovascular, enfermedad renal, accidente cerebrovascular, neuropatía, ceguera y pérdida de extremidades son, por lo tanto, el resultado final del daño a nivel micro y macrovascular (figura III.3).<sup>22,24</sup>

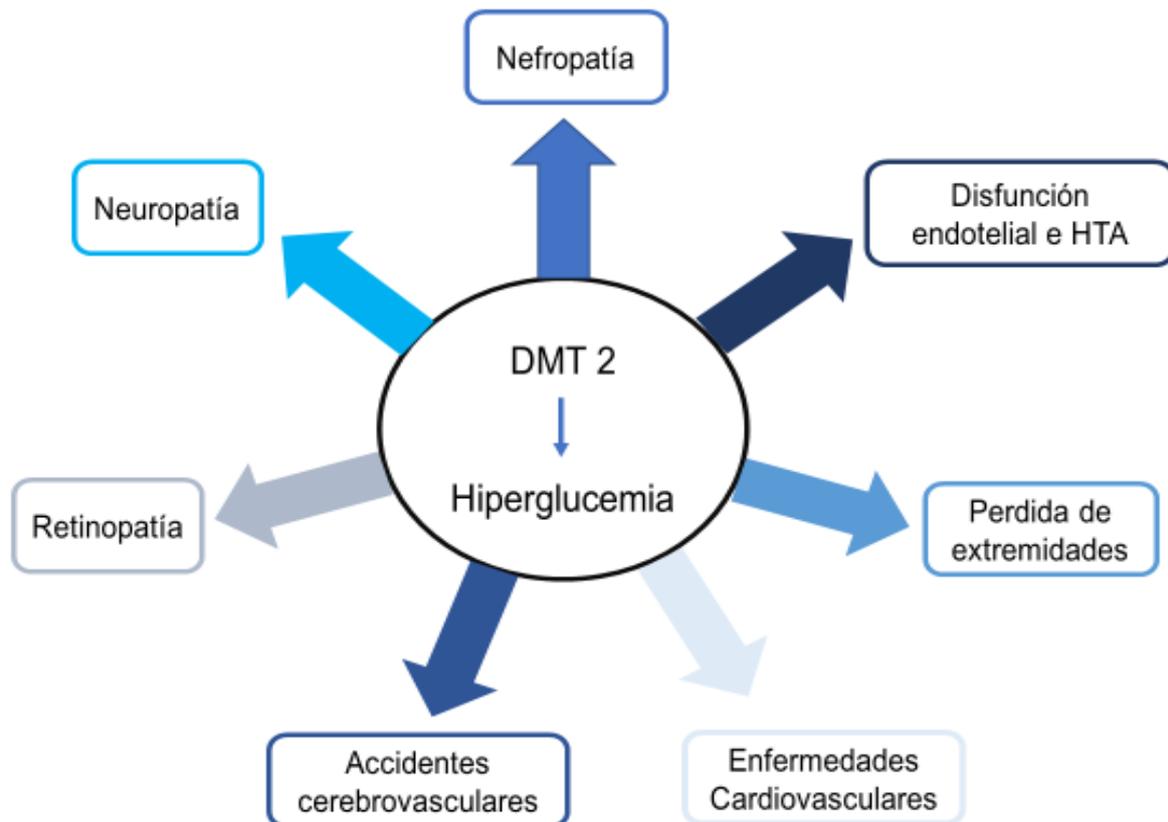


Figura III.3. Complicaciones de la diabetes.

Aun cuando la aparición de complicaciones derivadas de la DM2 depende tanto del tiempo de evolución de la enfermedad como del control glucémico, los mecanismos inherentes al envejecimiento aceleran la aparición de las mismas; de tal manera que la pérdida de la capacidad visual, la pérdida de la capacidad motriz y los trastornos cardiovasculares son muy frecuentes en los AM diabéticos. Esto refleja la necesidad de comprender mejor la interacción entre los procesos involucrados en el envejecimiento, así como aquellos mecanismos implicados en la fisiopatología de la diabetes.<sup>21-22,25</sup>

### III.2.1. Fisiopatología de la diabetes tipo 2

La concepción más reciente sobre la patogénesis de la DM2 sostiene ésta posee un marcado trasfondo genético y que la constante interacción con los factores ambientales desencadena la enfermedad tras un periodo de tiempo relativamente largo, tal como se observa en la figura III.4. La hiperglucemia surge como consecuencia de las alteraciones en la secreción de insulina por parte de las células  $\beta$ , así como de la resistencia a la insulina (RI).<sup>30-31</sup>

La insulina ejerce su acción biológica a través de la unión al receptor de insulina ubicado sobre la superficie de la membrana celular, posteriormente al activarse el receptor, se desencadenan diferentes vías de señalización, algunas de las cuales son necesarias para la captación de glucosa.<sup>32</sup>

El receptor de insulina es una glucoproteína heterotetrábrica perteneciente a la familia de receptores para factores de crecimiento, posee dos subunidades  $\alpha$  extracelulares y dos subunidades  $\beta$  transmembranales con actividad intrínseca de tirosina cinasas. Tras la unión de la insulina a las subunidades  $\alpha$  del receptor, se autofosforilan residuos específicos de tirosina ubicados en las subunidades  $\beta$  y se induce la translocación del sustrato del receptor de insulina (IRS) a la membrana plasmática. Una vez que el IRS interactúa con el receptor se activan dos importantes vías de transducción: la vía del fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K) y la vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAP cinasas).<sup>31,33</sup>

La vía de las MAP cinasas participa activamente en la regulación de la expresión génica en tejidos sensibles a la insulina, pero no en la regulación del transporte y captación de glucosa, en tanto la vía PI3K es el principal mecanismo por el cual la insulina ejerce sus funciones sobre el metabolismo de la glucosa y los lípidos.<sup>33</sup>

Por acción de la insulina se activa la vía PI3K en las células musculares y adiposas, esto induce la activación de cinasas serina/treonina (Akt), las cuales promueven la translocación de proteínas transportadoras de glucosa (GLUT 4) desde compartimentos intracelulares hacia la superficie de la membrana plasmática para que la glucosa sea captada, internalizada y posteriormente metabolizada por la célula.<sup>33,34</sup>

El control de las acciones de la insulina sobre el metabolismo energético se lleva a cabo mediante mecanismos muy finos de auto-regulación (desensibilización homóloga), en el cual las enzimas de la vía que fueron activadas por acción de la insulina inhiben la actividad de proteínas clave como son el receptor de la insulina y el IRS; sin embargo, existen otras vías no relacionadas a la insulina que también son capaces de inhibir las acciones de la hormona (desensibilización heteróloga), de tal modo que cualquier alteración que afecte el delicado y complejo mecanismo de regulación de la insulina impactará sobre el metabolismo energético, tal como sucede con la RI.<sup>33-35</sup>

La RI surge como resultado de la disminución en la capacidad de la insulina para ejercer sus funciones biológicas en tejidos diana como hígado, músculo esquelético y tejido adiposo, con lo que se ve afectado el transporte y captación de glucosa por parte de las células que conforman dichos tejidos. Inicialmente la RI induce aumento en la producción de insulina por parte de las células  $\beta$ ; sin embargo, una vez que la RI supera la capacidad de las células beta para secretar la hormona se rompe la homeostasis y se desencadena la hiperglucemia. A su vez, la hiperglucemia afecta la supresión de la lipólisis, induciendo la elevación de ácidos grasos libres circulantes, mismos que disminuyen el efecto supresor de la insulina sobre la producción de glucosa hepática.<sup>23,33</sup>

A nivel molecular, los mecanismos causantes de RI pueden ser múltiples y variar de un individuo a otro; aunque una deficiente señalización de la insulina ya sea debida a mutaciones o modificaciones post-traduccionales del receptor, así como a defectos en la unión insulina-receptor son los responsables directos de la RI.<sup>36</sup>

Por otro lado, las células  $\beta$  se encuentran en un constante dinamismo entre la regeneración de los islotes a partir de las células endoteliales del páncreas exocrino y la apoptosis. El delicado equilibrio entre la neogénesis y la apoptosis de los islotes de Langerhans puede verse afectado por diversas causas; en este sentido, se considera que el envejecimiento, la susceptibilidad genética, la RI, la elevación de ácidos grasos libres y la glucotoxicidad (a causa de la hiperglucemia), son los mecanismos patogénicos que conducen a la disfunción de las células beta.<sup>36-37</sup>

La glucotoxicidad no sólo influye sobre la funcionalidad y supervivencia de las células  $\beta$  pancreáticas, sino que es capaz de inhibir la expresión del gene que codifica para la insulina afectando la producción de la hormona. El resultado final de la RI y la disfunción de las células  $\beta$  es la hiperglucemia, misma que a su vez provoca glucotoxicidad celular.<sup>38</sup>

La glucotoxicidad afecta la síntesis del transportador GLUT 4 además de inhibir su actividad intrínseca, con lo que se desregula el sistema de transporte de la glucosa. Asimismo, interfiere con el metabolismo de los lípidos, de tal manera que los niveles séricos de ácidos grasos libres tienden a aumentar y a su vez son capaces de empeorar la RI en hígado y músculo.<sup>36</sup>

Por otra parte, la hiperglucemia crónica que caracteriza a la DM2 se ha vinculado a la generación de daño oxidativo a través de diversos mecanismos, lo que se traduce en aparición de complicaciones a nivel micro y macrovascular.<sup>39</sup>

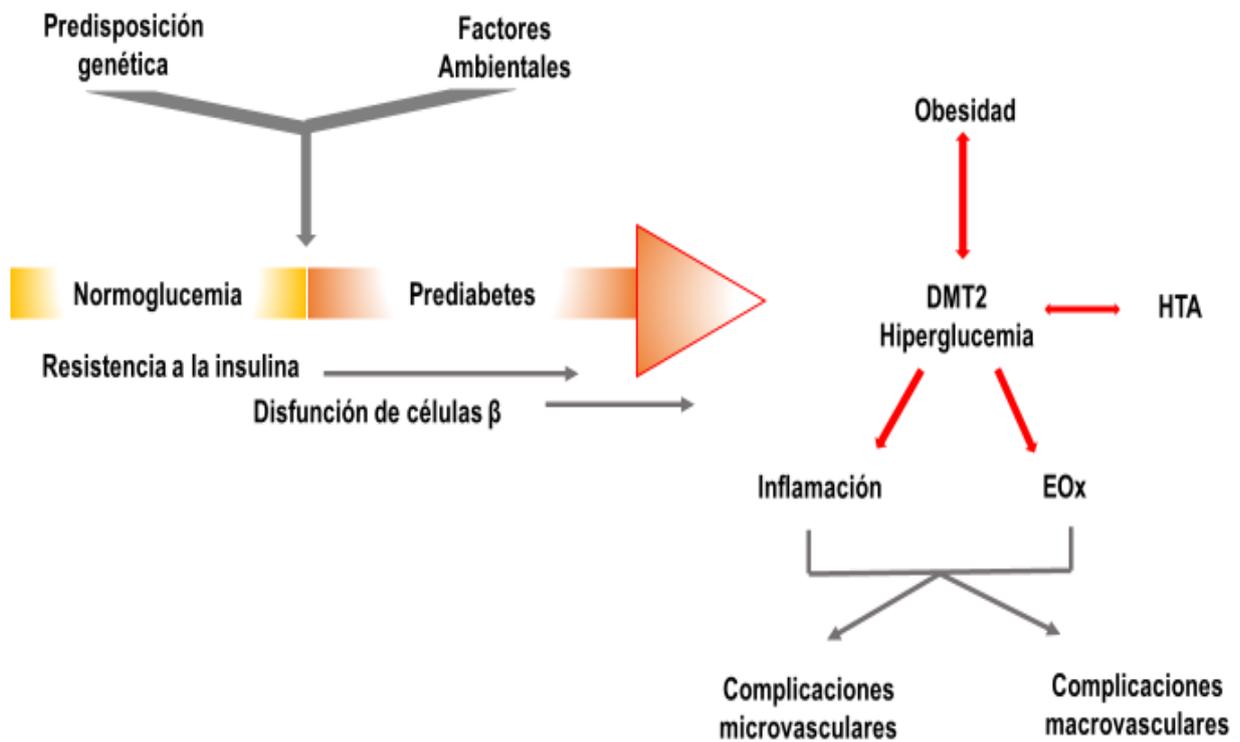


Figura III.4. Patogénesis de la diabetes mellitus tipo 2. Modificado de DeFronzo et al, 2004.<sup>36</sup>

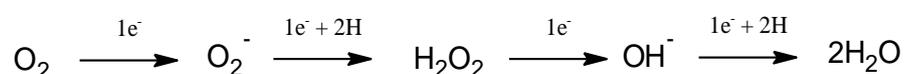
### III.2.2. Estrés oxidativo y diabetes mellitus tipo 2

La evidencia científica actual ha demostrado que existe un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) así como disminución de las defensas antioxidantes en sujetos diabéticos, es decir que la DM2 cursa con estrés oxidativo.<sup>40</sup>

Se define al estrés oxidativo (EO) como un proceso caracterizado por el desequilibrio bioquímico propiciado por la producción excesiva de radicales libres (RL) y/o especies reactivas que provocan daño oxidativo a las biomoléculas y que no puede ser contrarrestado por los sistemas antioxidantes. Un RL es una especie química que posee en su último orbital un electrón no apareado, por lo que su configuración espacial le genera gran inestabilidad y elevada reactividad, además de una enorme capacidad para reaccionar con otras moléculas de manera inespecífica con la finalidad estabilizar su carga eléctrica y alcanzar el equilibrio electrónico.<sup>41-42</sup>

Los RL no son estrictamente perjudiciales, ya que se pueden formar en el interior de las células como producto de sus actividades fisiológicas normales; bajo este contexto, la mitocondria es la principal generadora a través de la cadena transportadora de electrones. Otras fuentes de RL son los peroxisomas por su alto contenido de enzimas oxidasas, los leucocitos polimorfonucleares durante la fagocitosis y las enzimas de la familia nicotin adenin dinucleótido fosfato oxidasas (NADPH), presentes en la membrana leucocitaria, durante su participación en procesos inflamatorios, así como en reacciones asociadas al metabolismo del ácido araquidónico donde intervienen ciclooxigenasas, lipooxidasas y el citocromo p450. Además, es posible que se formen RL a partir de fuentes exógenas como las radiaciones ionizantes, rayos ultravioleta, drogas antitumorales, pesticidas, agentes contaminantes y humo de cigarro. También se puede inducir su liberación a partir de medicamentos como el acetaminofén, gentamicina, kanamicina, polimixina B y cloramfenicol.<sup>41-44</sup>

Durante el metabolismo celular una elevada proporción de oxígeno es reducido a agua, sin embargo, entre el 2 y el 5% escapa a dicha reducción bivalente y ocurre la reducción univalente de O<sub>2</sub> que genera intermediarios reactivos en una serie de reacciones que involucran cuatro electrones y produce finalmente EROs, tal como se muestra en la siguiente reacción:



En primer lugar, cuando solo un electrón reduce la molécula de oxígeno se produce el anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ). Un segundo paso implica la reducción univalente del anión superóxido originando al ión peróxido, mismo que a pH fisiológico se protoniza y da lugar al peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Finalmente, a partir de  $H_2O_2$  y  $O_2^{\bullet-}$  y mediante las reacciones de Haber-Weiss y Fenton se forma el radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ), la ERO más dañina de todas.<sup>40-42</sup>

Los RL que se generan con mayor frecuencia son las EROs, sin embargo, no son los únicos puesto que existen aquellos derivados de nitrógeno (ERNs) e incluso de azufre, que también son inestables y altamente reactivos. Las moléculas frecuentemente atacadas por los RL son: lípidos membranales, DNA, proteínas y carbohidratos, cuyo resultado final es la alteración de la funcionalidad celular.<sup>42-43</sup>

A nivel del DNA, el componente más susceptible al ataque de los RL es la desoxirribosa, azúcar que al oxidarse rompe su enlace con el grupo fosfato del siguiente nucleótido, provocando ruptura de la cadena sencilla y dañando de manera permanente el material genético. Además, las EROs inducen oxidación de proteínas por cuatro principales mecanismos: carbonilación, ruptura de enlaces peptídicos, nitración y formación de enlaces proteína-proteína, como consecuencia puede surgir fragmentación y alteraciones estructurales en las proteínas, provocando entrecruzamientos y fenómenos de agregación, así como pérdida su funcionalidad. A nivel de membrana plasmática, las alteraciones inducidas sobre sus proteínas afectan a los transportadores, los canales proteicos, los receptores o proteínas reguladoras y a los inmunorreguladores; todo ello con la probabilidad de ser letal para las células.<sup>40-41</sup>

En cuanto a los carbohidratos, se ha evidenciado que el ácido hialurónico, la condroitina y el dermatán sulfato son susceptibles de degradación en presencia de EROs, aunado a ello se sabe que azúcares como glucosa, manitol o ciertos desoxiazúcares pueden reaccionar con el radical  $OH^{\bullet}$  para producir sustancias reactivas.<sup>42</sup>

El daño oxidativo de los lípidos membranales, conocido como peroxidación lipídica, es consecuencia del elevado contenido de ácidos grasos poliinsaturados, los cuales son muy susceptibles al ataque de los RL. La peroxidación lipídica se lleva a cabo en tres etapas:<sup>43,45</sup>

- 1) Iniciación. Un RL extrae un hidrógeno bis-alélico de un lípido poliinsaturado, originando un radical que reacciona rápidamente con  $O_2$  formando un radical peroxilo ( $LOO^{\bullet}$ ).

- 2) Propagación. En esta etapa el radical LOO<sup>-</sup> altamente inestable, extrae un hidrógeno bis-alélico de moléculas vecinas, propiciando la formación de un nuevo radical que buscará reaccionar con O<sub>2</sub>, generando un nuevo radical LOO<sup>-</sup>.
- 3) Terminación. Finalmente, es posible que la concentración de radicales iniciadores sea lo suficientemente alta para soportar una reacción radical-radical (LOO<sup>-</sup> - LOO<sup>-</sup>), de lo contrario es necesaria la acción de un antioxidante.

Como consecuencia de las reacciones en cadena ya mencionadas, se forman hidroperóxidos, mismos que son degradados a diversos productos entre los que destacan: dienos conjugados, alcanos, aldehídos e isoprostanos, los cuales pueden ser determinados en plasma mediante técnicas como TBARS (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico) y ELISA.<sup>45-46</sup>

La membrana celular es un blanco muy susceptible al daño oxidante dado su elevado contenido de ácidos grasos. En este sentido, el ácido araquidónico es un ácido graso muy abundante en la membrana celular y por ende es uno de los principales objetivos de los RL. Este ácido graso puede dar lugar a la formación de un gran número de compuestos por dos mecanismos:<sup>47-48</sup>

- 1) Peroxidación enzimática, en la que se producen prostaglandina, tromboxanos, leucotrienos y productos derivados de la ciclooxigenasas, lipoxigenasas y citocromo p450.
- 2) Peroxidación no enzimática, que da lugar a compuestos como manolaldehído, hidroxinonal e isoprostanos.

Los isoprostanos son compuestos similares a las prostaglandinas, cuya síntesis inicia con la extracción de un hidrogeno bis-alelico del ácido araquidónico y la posterior reacción con oxígeno molecular, dando lugar a la formación del radical peroxilo, mismo que al sufrir una ciclación, reacciona con una nueva molécula de O<sub>2</sub>, lo que propicia la producción de un compuesto similar a las prostaglandinas, el bicicloendoperoxido, que en un siguiente paso es reducido y produce los isoprostanos.<sup>47</sup>

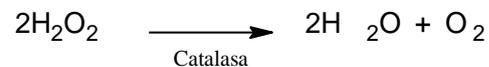
Actualmente se considera a los isoprostanos como un biomarcador confiable para la medición de la peroxidación lipídica. Esto se debe a que son moléculas estables que pueden encontrarse y medirse en fluidos biológicos tales como sangre, orina, fluido cerebroespinal, fluido bronqueoalveolar, asimismo pueden ser encontrados en células y tejidos. Entre los métodos empleados para cuantificarlos se encuentran la cromatografía de gases acoplada espectrofotometría de masas y el inmunoensayo ligado a enzimas.<sup>47</sup>

Pese al daño que los RL y EROs son capaces de causar en las células, éstas últimas disponen de un sistema antioxidante capaz de contrarrestar la acción nociva de las especies oxidantes. Así, se define a un antioxidante como una entidad química que, a bajas concentraciones, en comparación con el sustrato oxidable, retarda o previene la oxidación de dicho sustrato. Para comprender la acción de los antioxidantes se han clasificado según su función, en primarios, secundarios y terciarios, tal como se muestra en la figura III.5.<sup>43,48</sup>

Los antioxidantes primarios previenen la formación de RL y con ello evitan el daño oxidativo. Son el primer nivel de protección y ejercen su función a través de tres mecanismos: descomponiendo enzimáticamente los hidroperóxidos y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generados durante el metabolismo celular, quelando iones metálicos y depurando la EROs.<sup>43</sup>

La célula posee dos sistemas enzimáticos que llevan a cabo su función vía el primer mecanismo: la catalasa y las glutatión peroxidasas (GPx), que actúan de manera coordinada para remover el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formado por acción de la superóxido dismutasa (SOD).<sup>42</sup>

La catalasa es una enzima cuya actividad se localiza básicamente en los peroxisomas, donde realiza la conversión de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular:



El sistema de la glutatión peroxidasa utiliza al selenio como cofactor, se ha encontrado en el citoplasma y las mitocondrias. Cataliza la reacción a través de la cual el glutatión reducido (GSH) reacciona con peróxidos para transformarlos en agua y alcohol. Durante el proceso el glutatión es oxidado (GSSG), para posteriormente ser regresado a su estado original, por la enzima glutatión reductasa.<sup>43</sup>



Por su parte los antioxidantes que actúan gracias a su capacidad quelante de iones metálicos (Fe<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>+</sup>, Cd<sup>2+</sup> y Hg<sup>2+</sup>) potencialmente oxidantes, son proteínas séricas como: transferrina, ferritina, ceruloplasmina, albúmina, β-lactoglobulina e inmunoglobulinas. Además de su capacidad quelante de metales, estas proteínas pueden llevar a cabo la remoción de RL por aminoácidos como tirosina y cisteína; también incrementan los niveles de glutatión al ser fuentes de cisteína, aminoácido precursor en la síntesis de glutatión. Éste último es el mayor antioxidante endógeno producido por las células que participa directamente en la neutralización de RL y EROs, así como en el mantenimiento de las vitaminas C (ascorbato) y E (α-tocoferol) en sus formas reducidas.<sup>42, 48</sup>

En lo que respecta a la depuración de EROs, es un mecanismo llevado a cabo por la SOD. La SOD pertenece a una familia de enzimas entre las que se encuentran: CuSOD que posee un sitio de unión para Zn, el cual estabiliza la molécula, al ser la más abundante de las isoformas se ubica en el citosol; MnSOD en la matriz mitocondrial, su actividad es dependiente del tejido y de la especie y SOD extracelular que es secretora y remueve el  $O_2^{\bullet-}$  del espacio extracelular. Esta familia de enzimas cataliza el cambio del radical superóxido a peróxido de hidrógeno:<sup>43</sup>

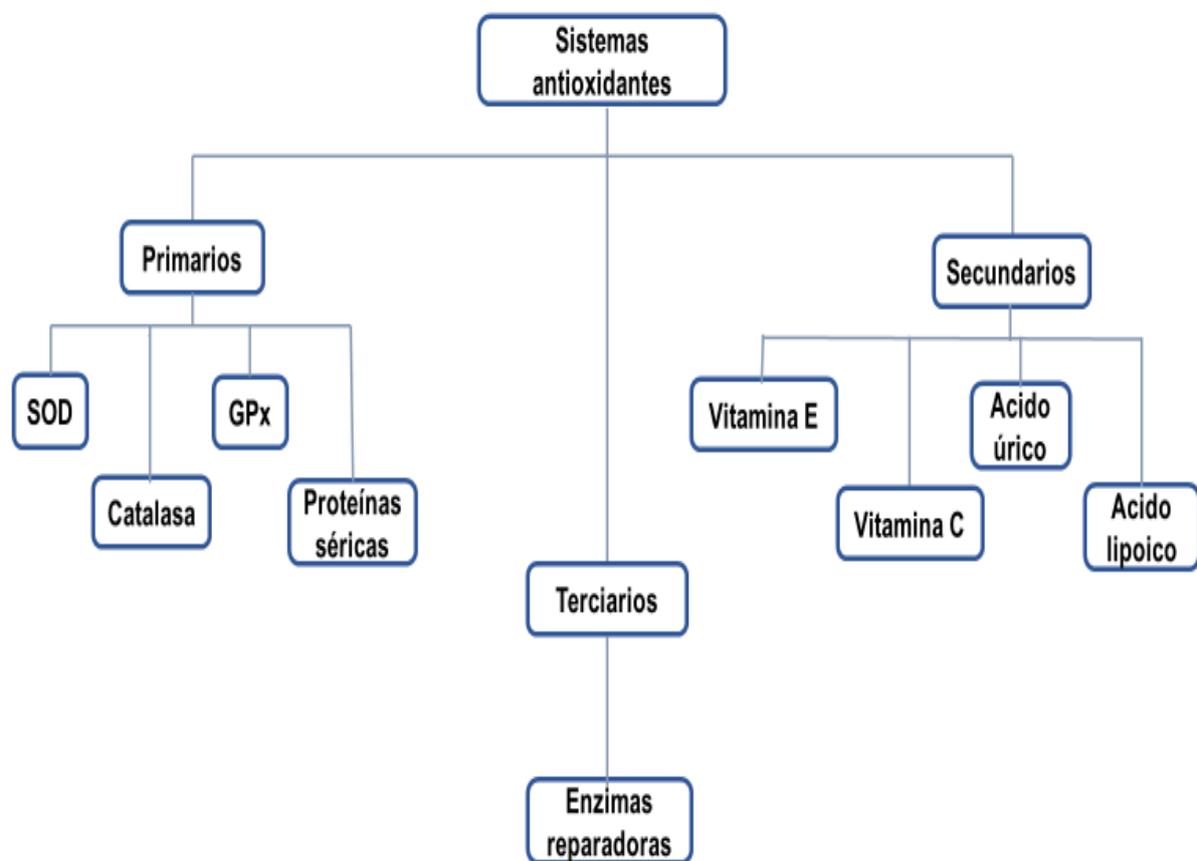


Por otro lado, los antioxidantes secundarios atrapan a los RL que se han formado impidiendo la propagación de la reacción oxidativa. Estos antioxidantes actúan a un segundo nivel de protección, es decir, cuando el nivel de los antioxidantes primarios ha sido rebasado por los RL y/o EROs. En este grupo se encuentran: la vitamina C, la vitamina E o  $\alpha$ -tocoferol, el ácido úrico, la bilirrubina y el ácido alfa lipoico, entre otros.<sup>48</sup>

La vitamina C que actúa en forma de ascorbato, posee la habilidad de donar electrones, con lo cual ayuda a destoxificar varios radicales orgánicos derivados del oxígeno, el nitrógeno y los sulfuros, esta propiedad le permite ayudar a proteger contra las EROs en medio acuoso; además posee la facultad de actuar como agente sinérgico de la vitamina E, ésta última posee efecto protector frente a la peroxidación lipídica de la membrana dada su naturaleza lipofílica, además es el antioxidante más ampliamente distribuido en la naturaleza.<sup>42-43,48</sup>

Respecto al ácido úrico, posee una estructura cíclica insaturada con un par de electrones no compartidos, razón por la cual puede recibir hasta 6 electrones de RL, actuando así, como un antioxidante *in vivo*. La bilirrubina por su parte es capaz de remover al anión  $O_2^{\bullet-}$  cuando se encuentra unida a la albúmina. Respecto al ácido alfa lipoico, dada su importancia en el presente estudio, sus propiedades como antioxidante y quelante de iones metálicos, se retomarán más adelante.<sup>48</sup>

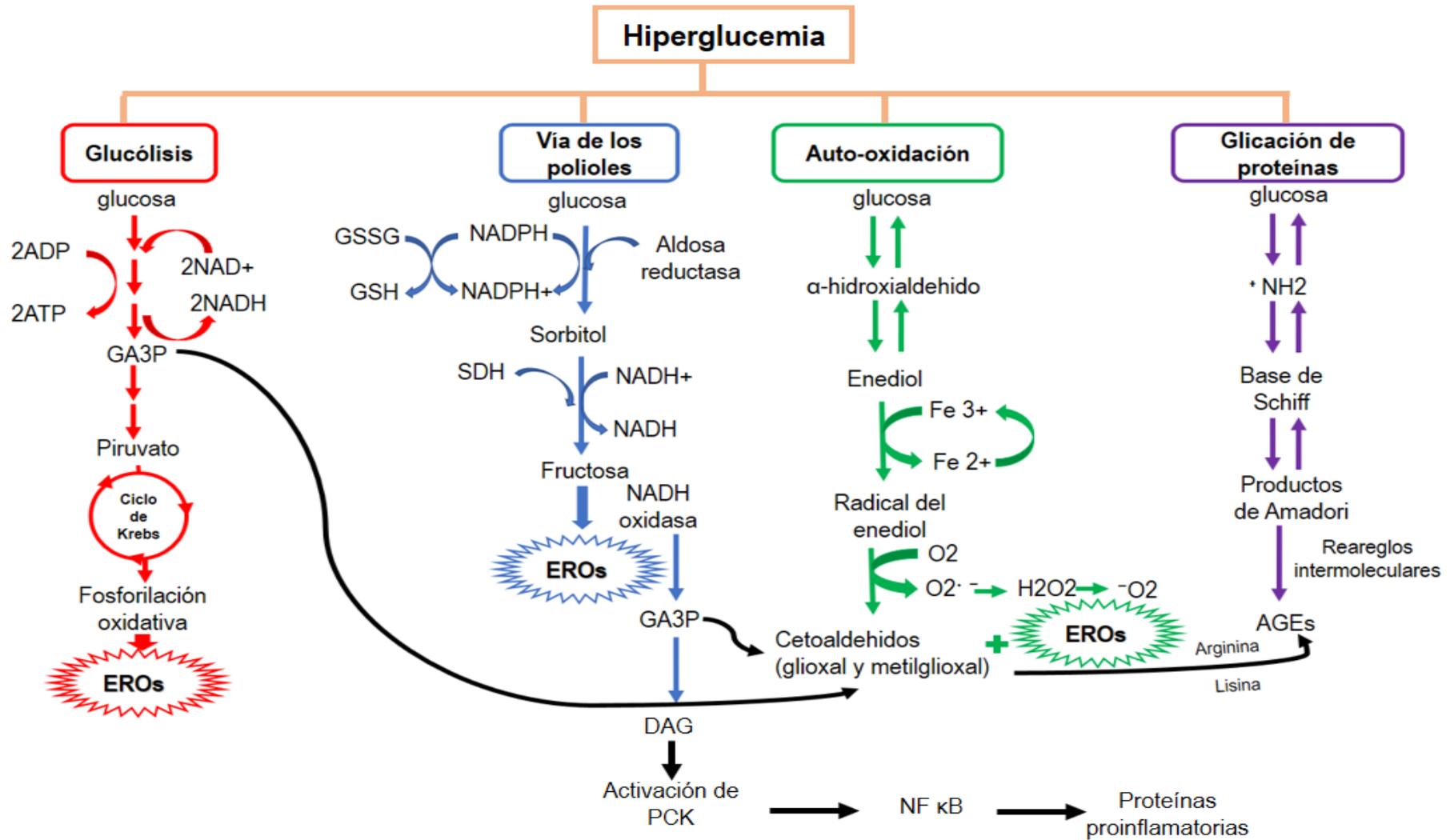
Finalmente, si los primeros dos sistemas antioxidantes no son eficientes y se oxidan las biomoléculas, se activan los antioxidantes terciarios. Se trata de una serie de enzimas que conforman los sistemas de reparación de las células. Entre sus funciones se encuentran: restaurar las biomoléculas a su conformación nativa y degradar las moléculas no funcionales para su posterior resíntesis.<sup>48</sup>



**Figura III.5.** Clasificación de los sistemas antioxidantes de acuerdo a su función: los primarios previenen la formación de radicales libres; los secundarios capturan radicales libres; los terciarios reparan biomoléculas (lípidos, proteínas y DNA). Tomado de Sánchez-Rodríguez et al, 2003.<sup>48</sup>

En condiciones fisiológicas estos mecanismos de defensa mantienen una baja concentración de EROs en la célula y su actividad es muy precisamente regulada, sin embargo, si se da un desequilibrio entre los oxidantes y los antioxidantes en favor de los primeros, se genera EO.<sup>40-43</sup>

Existen estudios que han demostrado que el EO inducido por la hiperglucemia juega un rol clave en el desarrollo de las complicaciones propias de la DM2. En este sentido, se han propuesto algunos mecanismos que intentan explicar la generación de EO a causa de la hiperglucemia, entre ellos se encuentran la auto-oxidación de la glucosa, la glucosilación de proteínas y la activación de la vía de los polioles, observados en la figura III.6.<sup>49-50</sup>



**Figura III.6.** La acumulación de glucosa en la célula propicia la activación de vías alternativas que propician acumulación de metabolitos nocivos, así como EO. Modificado de Pennathur et al, 2004.<sup>50</sup>

La glucosa es un alfa-hidroxialdehído capaz de auto-oxidarse en el radical  $\alpha$ -hidroxialdehído formando un enediol, el cual en presencia de metales de transición como el  $\text{Fe}^{+3}$ , produce cetoaldehídos intermediarios oxidados y RL. Además, debido al exceso de glucosa en las células incrementa la glucólisis y por ende las reacciones participantes en la cadena respiratoria también aumentan, esto propicia la elevada formación de EROs, principalmente el ión  $\text{O}_2^{\cdot-}$ .<sup>50-52</sup>

Una de las vías que se activan durante el estado de hiperglucemia es la de los polioles, en la cual la aldosa reductasa utiliza el NADPH para convertir el exceso de glucosa en sorbitol. El NADPH es esencial para la actividad de la GSH reductasa por lo que la depleción del NADPH a causa de la aldosa reductasa provoca la disminución de la GSH, de manera concomitante tiene lugar la reducción parcial del  $\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}_2$  y con ello se contribuye a la generación de EO.<sup>53</sup>

Por su parte el sorbitol generado incrementa la osmolaridad intracelular de células como las neuronas, los eritrocitos, las nefronas y la lente del cristalino, alterando la fisiología de dichas células y propiciando la disminución en la conducción nerviosa, alteraciones en las funciones de las nefronas, así como opacidad del cristalino, que son complicaciones propias de los diabéticos. Además el sorbitol es convertido a fructosa por efecto de la enzima sorbitol deshidrogenasa, proceso durante el cual se produce NADH a elevadas concentraciones, siendo éste último capaz de activar a la enzima NADH oxidasa, cuya acción induce a un incremento de la proporción  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$  además de estimular la generación de EROs, lo que condiciona a un mayor daño oxidativo y menor protección antioxidante al disminuir la capacidad de las células para regenerar las formas reducidas del glutatión y las vitaminas C y E.<sup>51-54</sup>

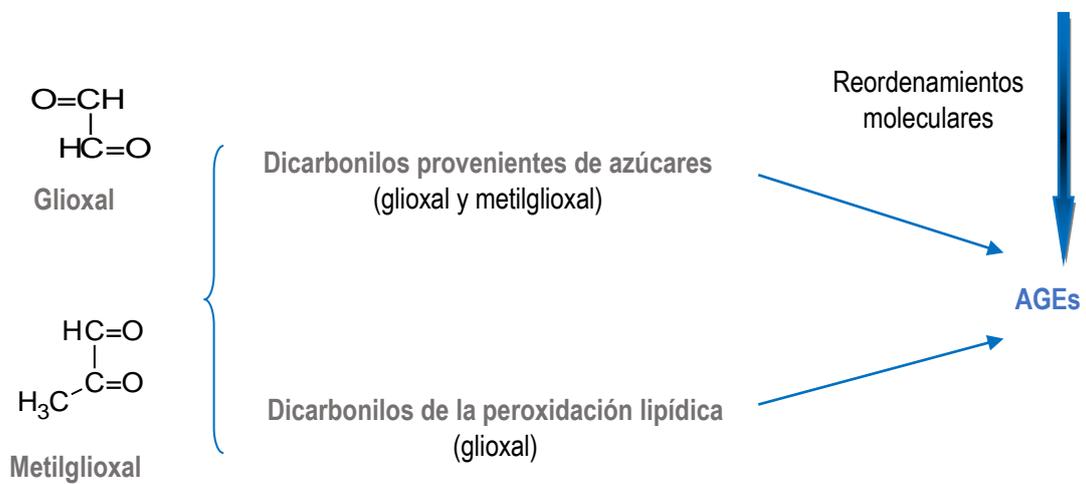
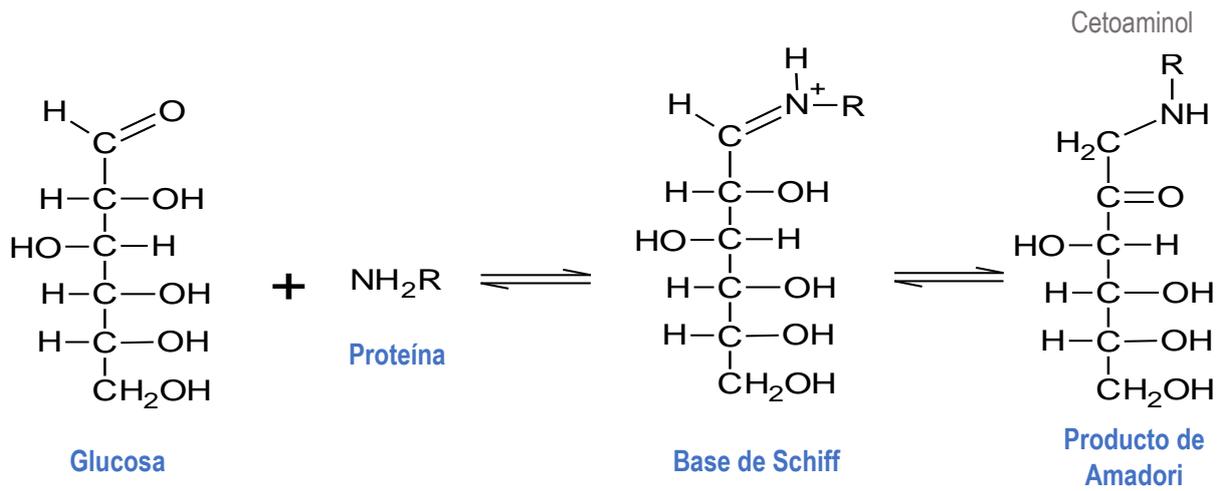
El incremento de NADH también promueve la formación y acumulación de intermediarios como gliceraldehído 3-fosfato (GA3P) y dihidroxiacetona-fosfato (DHAP) a partir de la cual se forma el glicerol-3 fosfato, cuya acumulación propicia un aumento en la producción de diacilglicerol y éste último actúa como segundo mensajero y estimula la actividad de la proteincinasa C (PCK), ésta enzima regula la actividad de enzimas como la fosfolipasa A2 citosólica y la  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  ATPasa, siendo también capaz de promover la activación de factores de transcripción pro-inflamatorios. Por otro lado, el GA3P es un precursor de metilgloxal, compuesto capaz de reaccionar con los grupos amino libres de los residuos de arginina y lisina de las proteínas, cuyo resultado final es la formación de los llamados productos finales de la glucosilación avanzada (AGEs del inglés Advanced Glycosilation End products).<sup>53-55</sup>

### *III.2.3. Formación de AGEs en la diabetes*

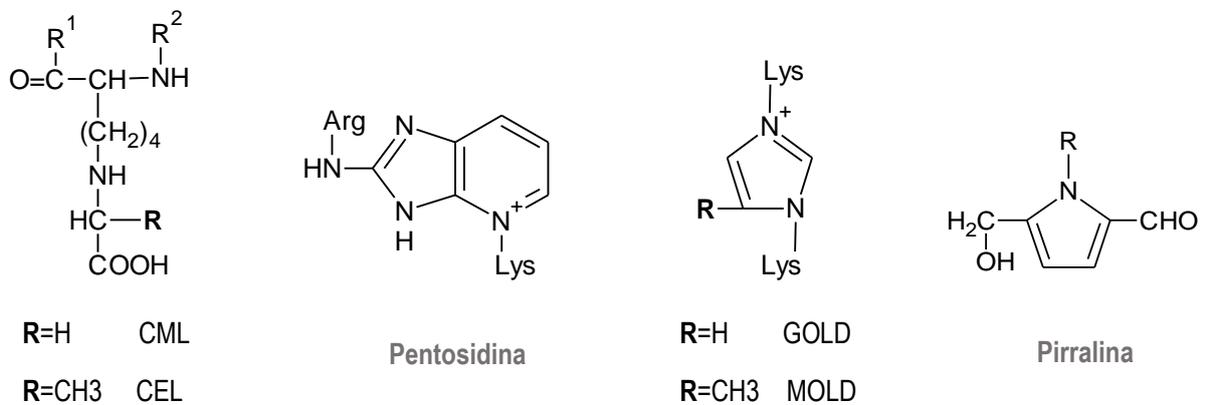
Los elevados niveles de glucosa en sangre propician reacciones químicas que ocurren entre los azúcares reductores y otras moléculas, principalmente proteínas, cuyo resultado es la formación de productos glucosilados (AGEs), que se acumulan y ocasionan la pérdida de la funcionalidad de las moléculas afectadas. El concepto de AGEs fue introducido por el químico francés Louis C. Maillard a principios del siglo XX, cuando tras calentar una mezcla de amino ácidos con azúcares reductores observó la formación de productos color marrón. Éste proceso ha sido ampliamente estudiado por la industria alimenticia ya que su aplicación permite mejorar el color, aroma y sabor de los alimentos procesados. No obstante, la formación endógena de AGEs comenzó a tornarse de gran importancia hasta la década de los 70's, cuando se descubrió la asociación de la hemoglobina glucosilada (HbA1c) con la hiperglicemia de sujetos diabéticos.<sup>56-58</sup>

El proceso de glucosilación no enzimática consiste en una serie de reacciones en las que el primer paso es la condensación de un grupo amino primario de proteínas, ácidos nucleicos o fosfolípidos con los grupos carbonilo de los azúcares reductores (glucosa) o aldehídos, formando bases de Schiff, las cuales en un segundo paso sufren reacciones de reordenamiento intramolecular, formando productos cetoamina, que son más estables y reciben el nombre de compuestos de Amadori. En un tercer paso los compuestos de Amadori pueden sufrir reacciones de oxidación, fragmentación o condensación para dar lugar a la formación de los AGEs, tal como se observa en la figura III.7.<sup>54-57</sup>

La formación endógena de AGEs involucra azúcares reductores como manosa, ribosa, triosas reactivas, glucosa y fructosa, siendo los dos últimos responsables de la formación de glioxal, metilglioxal y 3-desoxiglucosona, que son compuestos dicarbonilo altamente reactivos con gran capacidad de glicosilar a las proteínas y formar AGEs. En tanto, los aminoácidos más susceptibles de ser atacados por los grupos carbonilo son lisina, arginina y aquellos que contienen azufre. Los grupos carbonilo necesarios para la reacción no son exclusivamente producto del metabolismo de carbohidratos, ya que también pueden obtenerse del metabolismo de proteínas y lípidos. Así, cuando el grupo carbonilo proviene del catabolismo lipídico los productos formados tras la reacción reciben el nombre de productos finales de lipo-oxidación avanzada (ALEs= Advanced Lipoxidation End products). A pesar de ello la diferenciación entre ALEs y AGEs no siempre es posible, por ejemplo, la carboximetil-lisina (CML) puede formarse a partir del metabolismo tanto de carbohidratos como de lípidos.<sup>55-56,58</sup>



### Principales AGEs



CML: carboximetil-lisina, CEL: carboxietil-lisina, GOLD: dímero de gloixal-lisina, MOLD: dímero de metilgloixal-lisina

Figura III.7. Glucosilación no enzimática de proteínas y principales AGEs. Modificado de Gugliucci et al, 2000.<sup>55</sup>

El proceso de formación de AGEs es relativamente lento bajo condiciones fisiológicas ya que depende, por un lado, de la concentración de azúcares, y por otro del tiempo de exposición de las biomoléculas de larga vida, como las proteínas; así en proteínas de recambio rápido el proceso no va más allá de la base de Schiff, mientras que en proteínas con vida media prolongada el proceso llega hasta la formación de AGEs.<sup>59</sup>

Los AGEs se generan a partir de una fuente exógena mediante los alimentos, principalmente los de origen animal, procesados a elevadas temperaturas; y de una fuente endógena que se produce en aquellas personas con niveles de glucosa crónicamente elevados, como es el caso de quienes padecen diabetes o resistencia a la insulina. En este sentido, la HbA1c fue el primer AGE endógeno reconocido ya que su formación se correlaciona con el exceso de glucosa en sangre. Actualmente se emplea como marcador del control glucémico de sujetos diabéticos puesto que proporciona información acerca del promedio de las concentraciones de glucosa en un periodo de entre dos y tres meses. Además, la acumulación de AGEs en el cuerpo se ha asociado a cambios fisiológicos que caracterizan al envejecimiento, especialmente la resistencia a la insulina.<sup>59-61</sup>

Los AGEs se acumulan en el interior de las células insulino-dependientes y fuera de ellas, principalmente en las proteínas de la membrana basal, proteínas circulantes y estructurales. Durante el envejecimiento, la acumulación tisular de AGEs predomina en la matriz extracelular de la cápsula articular, los ligamentos y los complejos miotendinosos, que pierden su elasticidad y fuerza tensora, causando rigidez mecánica. Se han propuesto tres mecanismos a través de los cuales los AGEs dañan la matriz extracelular y las células, contribuyendo a los cambios que ocurren en el envejecimiento y al desarrollo de patologías: la acumulación de AGEs en la matriz extracelular causa entrecruzamientos aberrantes que provocan disminución de la elasticidad del tejido conectivo, la glucosilación de proteínas intracelulares altera el funcionamiento celular, y la unión de AGEs circulantes a su receptor activa vías de señalización celular con la consecuente modulación de la expresión genética.<sup>60,62</sup>

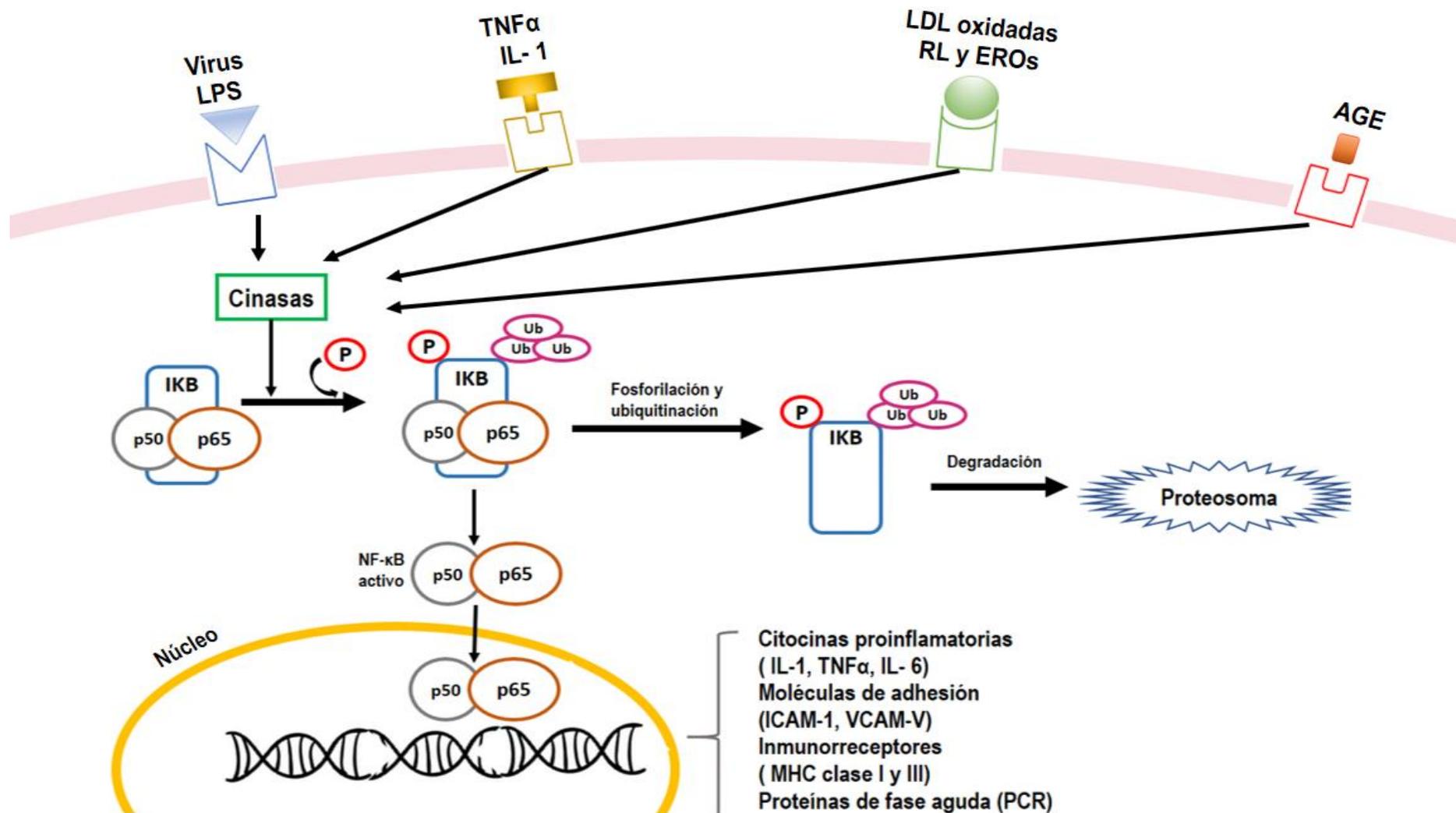
La formación de AGEs, propicia la activación de diferentes vías de señalización tras su unión a una serie de receptores ubicados sobre la superficie de diversos tipos de células como macrófagos, adipocitos, células endoteliales, células musculares lisas, linfocitos, hepatocitos, astrocitos y neuronas. El receptor de membrana más ampliamente estudiado es el RAGE, aunque a la fecha se ha identificado un complejo de receptores de AGEs (AGE-R1/OST-48, AGE-R2/80K-H, AGE-R3/galectin-3), cuya expresión depende del tipo de célula y es regulada en respuesta a cambios metabólicos que ocurren durante el envejecimiento, la diabetes y la dislipidemia.<sup>60-62</sup>

El receptor de superficie celular tipo 1 o RAGE-1 es una proteína transmembrana de un solo paso que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas y está involucrado en la transducción intracelular de señales. Se localiza en el cromosoma 6p21.3 en el locus del complejo mayor de histocompatibilidad clase III (MCHIII). La proteína madura posee 404 aminoácidos de longitud y un dominio extracelular, seguido de una región transmembrana hidrofóbica y un dominio citosólico corto, la parte extracelular posee tres dominios tipo inmunoglobulina: un dominio tipo V que es la región de unión al ligando y dos dominios tipo C. La región citoplasmática es de vital importancia durante la señalización intracelular, también se ha determinado que el receptor reconoce estructuras tridimensionales más que secuencias de aminoácidos, de ahí que entre sus ligandos además de encontrarse los AGEs están péptidos  $\beta$  amiloides, calgranulinas y las proteínas HMGB1 que son liberadas por células en proceso de necrosis.<sup>62-64</sup>

Dadas las características del RAGE, su activación promueve la respuesta inflamatoria, apoptosis, actividad protrombótica, expresión de moléculas de adhesión y EO; por tal razón dicho receptor ha sido reconocido como una molécula clave en el desarrollo de severas patologías crónicas que incluyen las complicaciones de la diabetes (nefropatía, retinopatía, neuropatía), enfermedad cardiovascular, enfermedad renal crónica, enfermedad cerebro-vascular, osteoporosis, enfermedad de Alzheimer, RI, inflamación crónica, aterosclerosis, neurodegeneración, cáncer y metástasis.<sup>64</sup>

La interacción del RAGE con sus ligandos activa diversas cascadas de señalización celular entre las que se encuentran la vía de las MAP-quinasas, JAK-STAT, CDC42, RAC1 y otros miembros de la familia de proteínas Ras, SRC1, la familia de señalización SMAD y la fosfatilil-inositol 3-cinasa (PI3-K). Activa también factores de transcripción central, elementos de respuesta al cAMP (CREB-1), respuesta temprana de crecimiento (ERG-1), proteína activadora (AP-1) y factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) que es un regulador de genes proinflamatorios.<sup>65-66</sup>

En estado inactivo los dímeros del NF- $\kappa$ B se encuentran secuestrados en el citoplasma gracias a su asociación con la proteína inhibidora I $\kappa$ B $\alpha$ . La unión AGE-RAGE así como la presencia de citocinas pro-inflamatorias y EROs estimula la activación del complejo IKK, posteriormente tiene lugar la fosforilación específica, la ubiquitinación y degradación de la proteína inhibidora I $\kappa$ B $\alpha$ . Los dímeros de NF- $\kappa$ B son liberados e inmediatamente translocados al interior del núcleo donde se unen a secuencias específicas de DNA y promueven la activación transcripcional de genes promotores de proteínas proinflamatorias, moléculas de adhesión (ICAM1 y VCAM1), EROs, factores procoagulantes, protrombóticos y vasoconstrictores, la molécula inhibidora I $\kappa$ B $\alpha$  y el mismo RAGE (figura III.8).<sup>67-68</sup>



**Figura III.8.** Vía de señalización del NF-κB. El factor permanece inactivo en el citoplasma hasta que ciertos estímulos inducen la fosforilación de la proteína IκBα, liberando al NF-κB, posteriormente la proteína IκBα es ubiquitinada y degradada en el proteosoma. Una vez que el NF-κB ha sido liberado, es traslocado al interior del núcleo y estimula la transcripción de diferentes genes, entre ellos los relacionados con la síntesis de moléculas proinflamatorias y pro-trombóticas. La vía puede ser activada en respuesta a diversos estímulos como agentes infecciosos, EOX, la interacción AGE-RAGE e incluso proteínas proinflamatorias. Modificado de Osorio et al, 2016.<sup>67</sup>

Al activarse la vía del NF- $\kappa$ B se establece un mecanismo de retroalimentación positiva cuyo resultado es un incremento en la expresión de RAGE; cuando se fosforila la proteína inhibitoria del NF- $\kappa$ B se desencadena la síntesis de novo tanto del NF- $\kappa$ B como de la I $\kappa$ B $\alpha$ , aunque dicha proteína no se produce en cantidad suficiente y el factor nuclear  $\kappa$ B permanece desinhibido, generando una activación sostenida que es responsable de la expresión del RAGE puesto que ésta es inducida por el NF- $\kappa$ B.<sup>63-65</sup>

Debido al mecanismo de activación y retroalimentación positiva del RAGE y el NF- $\kappa$ B, se promueve de manera sostenida la liberación de citocinas proinflamatorias que además de propiciar la síntesis de otros factores y moléculas de adhesión, así como de inducir una respuesta inflamatoria por parte del organismo, alteran el endotelio vascular provocando el desarrollo de complicaciones a nivel micro y macrovascular. Cabe resaltar que los procesos mencionados implican la producción y liberación de EROs, las cuales poseen la capacidad de activar al NF- $\kappa$ B, lo que aunado a la elevada concentración de EROs provenientes de las vías que se activan durante el estado de hiperglucemia así como de la formación de AGEs, tienden a empeorar el ya establecido daño oxidativo a las células y de manera paralela a desencadenar una inflamación sostenida en el organismo, siendo, el resultados final de la interacción de estos procesos, la aparición de las complicaciones de la diabetes.<sup>67-69</sup>

Por otro lado, la formación de EROs y AGEs así como los procesos en los que se involucran, son característicos tanto de la DM como del envejecimiento, de ahí que tanto el EO como la inflamación, se encuentren exacerbados en los AM y de manera más importante en aquellos que además padecen DM.<sup>60,69</sup>

#### *III.2.4. Inflamación y diabetes*

La inflamación se ha ligado a la fisiopatología de la DM2 y al proceso de envejecimiento, ya que además de contribuir a la generación de EO, se le ha implicado en el desarrollo de complicaciones a nivel micro y macrovascular.<sup>70</sup>

La inflamación es un mecanismo de defensa natural del organismo ante el estímulo de agentes patógenos, entre ellos: microorganismos, toxinas, drogas y contaminantes; cuya finalidad es eliminar la causa inicial de la lesión celular. Cuando la respuesta ante el agente agresor es inmediata se habla de que es un proceso agudo, pero, si persiste, puede convertirse en un proceso crónico. Así, en respuesta al daño tisular causado por traumatismo o infección, se establece una compleja red de interacciones moleculares y celulares dirigida a restablecer la homeostasis fisiológica y reparar el tejido dañado.<sup>69-70</sup>

La inflamación es una respuesta localizada con consecuencias sistémicas, que ayuda a destruir, reducir o secuestrar al agente perjudicial. Durante el desarrollo de dicho proceso surgen modificaciones locales y coordinadas de los vasos sanguíneos, así como del tejido conectivo, lo cual está relacionado con la regeneración de las células parenquimatosas dañadas y con la cicatrización, que se caracteriza por la proliferación de tejido fibroblástico.<sup>71</sup>

La respuesta inflamatoria inicia cuando se reconocen las señales de origen infeccioso o inflamatorio, tras el reconocimiento se activan las células inflamatorias entre las que se encuentran granulocitos, monocitos, macrófagos, plaquetas, células endoteliales y fibroblastos, principalmente, aunque durante el proceso participan elementos tanto celulares como humorales. Las células activadas inician la síntesis y liberación de mediadores inflamatorios entre los que se encuentran las citocinas pro-inflamatorias (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$ ); proteínas inflamatorias de macrófagos, proteínas quimio-atrayentes de monocitos, enzima activadora de plasminógeno, fosfolipasas, prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos, factores de coagulación, óxido nítrico, factores del complemento, factor activador de plaquetas, proteína C reactiva y especies reactivas de oxígeno.<sup>69-72</sup>

Los agentes infecciosos también activan la cascada del complemento mediante las anafilatoxinas C5a, C3a y en menor grado C4a, cuya tarea es activar a los mastocitos para liberar sustancias vasoactivas contenidas en sus gránulos (histamina y serotonina), cuya tarea es modificar el endotelio vascular en el sitio de la infección.<sup>73</sup>

Entre los fenómenos vasculares que tienen lugar durante la inflamación, lo primero que ocurre es una vasodilatación acompañada de reducción en la velocidad del flujo sanguíneo y por ende, los leucocitos comienzan a concentrarse sobre el endotelio vascular puesto que entre las proteínas liberadas se encuentran moléculas de adhesión. Con estos cambios vasculares se facilita el paso de las células fagocíticas (monocitos y neutrófilos) a través de la pared del vaso, proceso conocido como diapedésis, aunque también emigran inmunoglobulinas, complemento y otras proteínas, razón por la cual existe aumento de volumen en la zona afectada y dolor, además del resto de signos clásicos de la inflamación como son: tumefacción, calor, enrojecimiento, edema y pérdida de función en la zona de la lesión.<sup>74</sup>

La inflamación se acompaña de una reacción de fase aguda, caracterizada por inducción de fiebre, incremento en la síntesis de ciertas hormonas, leucocitos y de proteínas de fase aguda. El prototipo de proteínas de fase aguda es la PCR, sintetizada por hepatocitos y células endoteliales, su expresión está regulada por IL-6 y en menor grado por IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$ . La PCR posee la capacidad de fijarse a

la membrana del patógeno y activar el complemento, provocando el depósito de la opsonina C3b, con lo que se facilita su fagocitosis por los macrófagos, razón por la cual cobra importancia durante la respuesta inmune innata.<sup>74-75</sup>

Los mediadores de inflamación inducen la expresión de moléculas que activan los mecanismos de coagulación en los pequeños vasos, con la finalidad de limitar la extensión de la reacción al tejido cercano. También suele aparecer un estado febril debido a la acción de citocinas pirogénicas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6), que son liberadas por los leucocitos y ejercen su efecto sobre los centros termorreguladores del hipotálamo, con ello la respuesta inmune se torna más intensa. Además, participan algunas citocinas pertenecientes a la familia de las quimiocinas, las cuales son sintetizadas por fagocitos, células endoteliales, queratocitos y fibroblastos.<sup>72-74</sup>

Las citocinas proinflamatorias participan de manera coordinada durante el desarrollo de la respuesta inflamatoria. La IL-1 $\beta$  produce inflamación sistémica por medio de la acción de la ciclooxygenasa-2 con formación de prostaglandina (PGE<sub>2</sub>) en el hipotálamo causando fiebre, además produce óxido nítrico y moléculas de adhesión endotelial. La IL-6 es inducida por IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , participa en la inducción y control de la síntesis y liberación de proteínas de fase aguda por los hepatocitos durante la inflamación, además propicia la madurez y activación de neutrófilos y macrófagos, de manera conjunta con la IL-1 $\beta$  provoca fiebre. El TNF- $\alpha$ , activa la coagulación, estimula la liberación de moléculas de adhesión y el factor activador de plaquetas, así, cuando no se logra retener al agente patógeno en el sitio de la infección y éste disemina a través del flujo sanguíneo causando sepsis, por acción del TNF- $\alpha$  se produce coagulación intravascular diseminada. Mientras tanto, la IL-8 posee la función de ejercer quimioatracción de células fagocíticas desde el interior de los vasos hacia el sitio de infección.<sup>74,76</sup>

La finalidad de una respuesta inflamatoria es la destrucción de los agentes patógenos, de las células dañadas y del tejido necrótico, así como la reparación del tejido dañado. En algunas ocasiones la salud de los tejidos afectados no se restablece y la inflamación se convierte en una condición crónica con el subsecuente daño a los tejidos y la correspondiente síntesis y secreción de las citocinas que participan activamente en la inflamación de tipo crónico (IL-4, IL-5, IL-6, IL-7 e IL-13 que participan en la respuesta humoral, e IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-7, IL-9, IL-12 y TNF- $\alpha$  que son mediadoras de la respuesta celular). En este tipo de inflamación, la lesión tisular y la cicatrización se producen simultáneamente. El daño causado tiende a acumularse lentamente, a veces sin presentar síntomas durante años, lo que trae como consecuencia el deterioro severo del tejido y la aparición de enfermedades. Este proceso inflamatorio crónico se produce con frecuencia en ancianos.<sup>69,77</sup>

El envejecimiento se caracteriza por un bajo grado de inflamación asociado con la exposición crónica a antígenos, tanto endógenos como exógenos, lo que, aunado a la secreción de citocinas proinflamatorias, provoca la formación y liberación de RL y especies reactivas, las cuales favorecen al EO y éste a su vez estimula la síntesis de citocinas proinflamatorias al activar al NF- $\kappa$ B, responsable de encender los genes correspondientes a dichas citocinas. Este estado inflamatorio crónico ha sido llamado *inflammaging*.<sup>22,77-79</sup>

El *inflammaging* es un factor de riesgo de gran significancia para la morbilidad y mortalidad en las personas de edad avanzada, ya que además de presentarse en bajo grado y de manera controlada es asintomático. Su presencia favorece el daño a nivel molecular, celular, orgánico y sistémico, de tal manera que se encuentra íntimamente ligada al envejecimiento y a la mayoría de los padecimientos crónicos, entre ellos la DM (figura III.9).<sup>22, 78-81</sup>

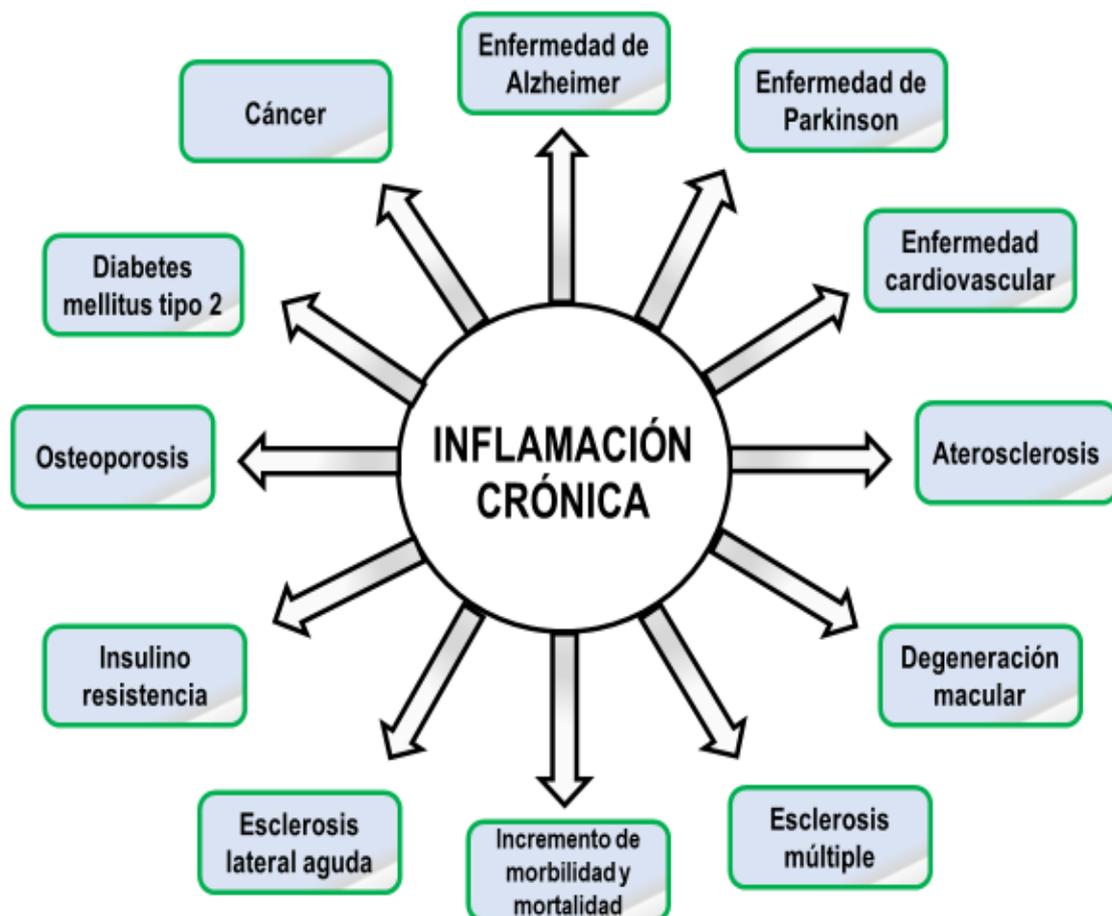


Figura III.9. Enfermedades asociadas a la inflamación crónica. Tomado de Xia et al 2016.<sup>80</sup>

Dado que el sistema inmunológico es uno de los que sufren mayor deterioro en su función con el envejecimiento, se ha propuesto la llamada teoría inmunológica del envejecimiento. Dicha teoría sostiene que a medida que transcurre la vida nuestro sistema inmunológico se va deteriorando paulatinamente, al grado de ser menos efectivo para protegernos de los agentes patógenos, llegando incluso a perder la capacidad de reconocer lo “propio” de lo “extraño”, lo que resulta en procesos auto-inmunes. De la misma manera en que esta teoría pretende explicar el proceso de envejecimiento han surgido muchas otras, entre las cuales destaca la teoría del daño oxidativo y los radicales libres, propuesta por el Dr. Denham Harman en 1956.<sup>82-83</sup>

La base de la teoría del daño oxidativo es que en todas las células de los organismos aerobios existe un estado crónico de EO, incluso bajo condiciones fisiológicas; esto se debe a que el oxígeno contenido en el aire que respiramos es esencial para los procesos involucrados metabolismo celular, en los cuales el O<sub>2</sub> se reduce dando lugar a las EROs, que en su mayoría son radicales libres. La acumulación del daño oxidativo en las macromoléculas aumenta durante el envejecimiento y contribuye al progresivo deterioro de la funcionalidad celular, con la subsecuente pérdida de la capacidad para mantener la homeostasis por parte del organismo, lo que implica un elevado riesgo de desarrollar enfermedades crónicas. En este contexto, son comunes los trastornos cardiovasculares, neurológicos, endócrinos, respiratorios, inmunes, digestivos y carcinógenos; cuya etiología se encuentra respaldada por teorías relacionadas con la acumulación de daño oxidativo.<sup>82-84</sup>

Considerando el papel del EO en el envejecimiento, así como su participación en el desarrollo de las complicaciones de la diabetes, es de suponerse que ambos procesos podrían retrasarse un poco tras la administración de antioxidantes, como el ácido alfa lipoico. Respecto a dicho compuesto, la literatura lo ha descrito como un potente antioxidante biológico y a la fecha se ha usado para la prevención de algunas enfermedades asociadas al EO, también es administrado como suplemento alimenticio con el propósito de brindar un tratamiento anti-envejecimiento, para el tratamiento de la neuropatía diabética y para acelerar el proceso de cicatrización, entre otras aplicaciones.<sup>85-86</sup>

### III.3 Ácido alfa lipoico: propiedades y aplicaciones clínicas

El AAL también conocido como ácido tióctico o ácido R,S-5(1,2-ditioilano-3-pentanoico), es un ácido carboxílico unido a un ditiol cíclico de cinco átomos, mismo que puede estar en forma oxidada (ácido lipoico) o en forma reducida (ácido dihidrolipoico); además, dado que posee un centro quiral, existen dos formas enantioméricas del AAL: R-AAL y S-AAL, tal como se muestra en la figura III.10. El compuesto es relativamente estable en estado sólido, aunque polimeriza rápidamente si se somete a temperaturas superiores a su punto de fusión (47.5°C), mientras que en una solución neutra el AAL se degrada al ser expuesto a la luz.<sup>86-88</sup>

El AAL se encuentra de manera natural en las mitocondrias de plantas y animales (incluido el hombre), donde es sintetizado gracias a la acción de la enzima ácido lipoico sintasa, partiendo del ácido octanoico y cisteína como donador de azufre. En dicho organelo actúa como cofactor de los complejos multi-enzimáticos mitocondriales (piruvato deshidrogenasa y  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa), encargados de la descarboxilación oxidativa del piruvato,  $\alpha$ -cetoglutarato y otros  $\alpha$ -ceto ácidos como valina, leucina e isoleucina; sin embargo, actúa de forma enantioselectiva y sólo la isoforma R funge como cofactor.<sup>87,89</sup>

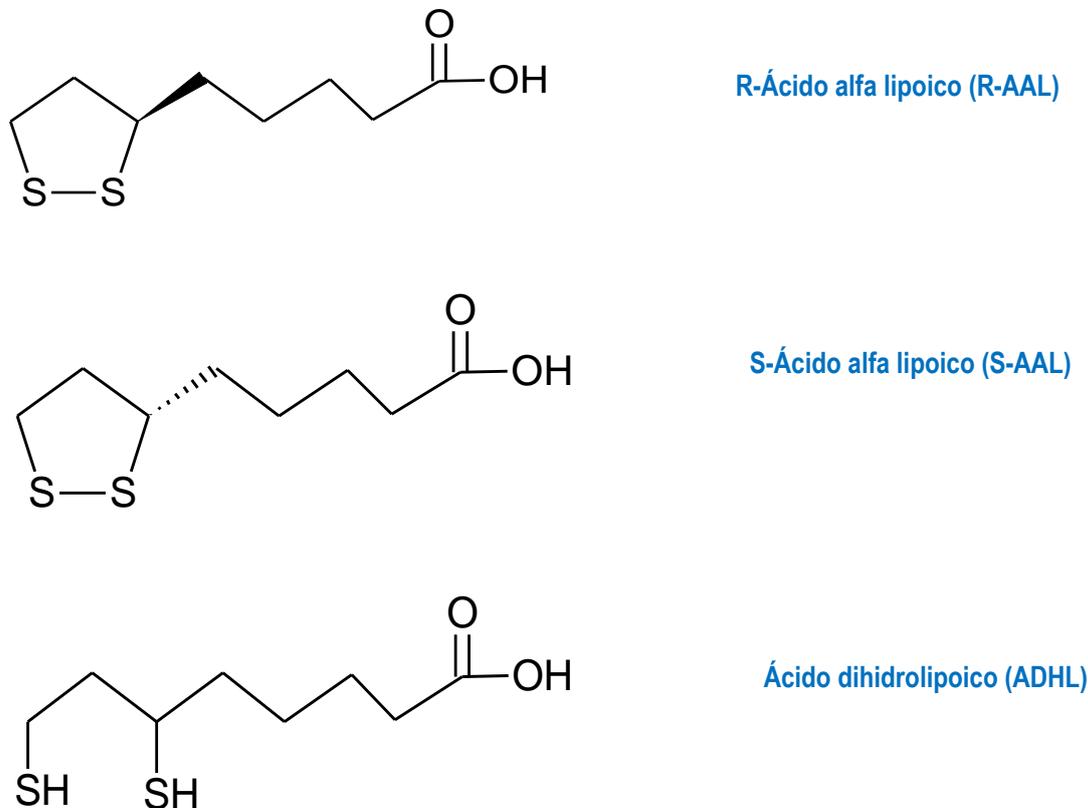


Figura III.10 Estructura química de R-AAL, S-AAL y del ácido dihidrolipoico (ADHL).

### III.3.1 Absorción y metabolismo del AAL

Previamente se ha mencionado que el AAL es sintetizado *de novo* en el organismo a partir de un ácido graso y cisteína, no obstante, se obtiene en muy pequeñas cantidades, haciéndose necesario obtenerlo a partir de fuentes exógenas. Al respecto se ha documentado que el compuesto se encuentra de manera abundante en tejidos animales, principalmente en vísceras como corazón, hígado y riñones; aunque también se encuentra en concentraciones considerables en vegetales como brócoli, espinacas, tomates, chícharos, papas y salvado de arroz.<sup>90-91</sup>

Aun cuando el AAL puede ser obtenido a partir de los alimentos también puede administrarse la mezcla racémica, obtenida vía sintética, en cápsulas o tabletas. En este sentido, se ha demostrado que la absorción gastrointestinal de AAL varía dependiendo de la forma en que se ingiere, existiendo una mayor absorción del compuesto si se administra 30 minutos antes o 2 horas después de la ingesta de alimentos. También se ha evidenciado que la absorción de AAL es enantioselectiva puesto que la isoforma R se absorbe de manera más eficiente que S.<sup>92-94</sup>

Una destacada propiedad del AAL es su comportamiento anfipático, lo que le confiere la capacidad de atravesar la membrana plasmática de todas las células del organismo, incluyendo la barrera hematoencefálica, característica que facilita su distribución en todos los tejidos. Aunado a ello el AAL es reducido a ácido dihidro-lipoico (ADHL) dentro del organismo y esta forma reducida es rápidamente transportada por el torrente sanguíneo.<sup>95-97</sup>

Posterior a su absorción, el AAL es transportado de manera rápida al resto del organismo, alcanzando concentraciones plasmáticas máximas entre 30-60 minutos después de la ingesta. En el cuadro III.2 se aprecian los resultados de algunos estudios con respecto a la absorción del AAL en voluntarios sanos a quienes se les administraron dosis de 600mg vía oral, se observa que con dicha dosis se alcanzan concentraciones plasmáticas que van de 1 a 3 µg/mL; además se aprecia que en forma de sal sódica se absorbe de manera más eficiente. Dentro del organismo, el compuesto es reducido a ADHL, gracias a la acción de las enzimas dihidrolipoamida deshidrogenasa mitocondrial que reduce la isoforma R y la glutatión reductasa citosólica que tiene preferencia por la isoforma S; tal reducción facilita su distribución por todo el organismo. Toda vez que el AAL llega al hígado, es metabolizado a través de reacciones químicas que tienen lugar durante la  $\beta$ -oxidación y S-metilación, lo que propicia la formación de los metabolitos correspondientes: bisnorlipoato, tetranorlipoato,  $\beta$ -hidroxi-bisnorlipoato, ácido 6,8-bismetil-tio-octanoico, ácido 4,6-bismetil-tio-hexanoico y ácido 2,4-bismetil-tio-butanoico, los cuales se eliminan vía excreción renal.<sup>92,93,98</sup>

Dada su capacidad de reducirse, el AAL es capaz de interactuar directamente con los RL y algunas EROs, cediéndoles electrones, para evitar que dañen a las macromoléculas. De igual manera, su rápida absorción, distribución y eliminación, lo convierten en un compuesto terapéutico auxiliar en el tratamiento de trastornos cardiovasculares, inmunes, neurodegenerativos y carcinogénicos, puesto que la fisiopatología de dichos padecimientos se encuentra ligada al daño oxidativo.<sup>102</sup>

**Cuadro III.2.** Estudios de la absorción del ácido alfa lipoico en voluntarios sanos.

AUTOR	DOSIS ADMINISTRADA	SUJETOS	ABC DE AL EN PLASMA	Cmax DE AL EN PLASMA
Teichert et al. (1998) <sup>92</sup>	a) 200mg AL racémico, VO	12	46.82 ± 21.24 µgmin/mL	0.66 ± 0.33 µg/mL
	b) 600mg AL racémico, VO		157.83 ± 25.82 µgmin/mL	2.85 ± 1.49 µg/mL
	c) 200mg AL racémico, IV		157.97 ± 35.05 µgmin/mL	8.32 ± 2.35 µg/mL
Carlson et al. (2007) <sup>93</sup>	600mg AL-Na-R, VO (sol)	15	441.6 ± 160.2 µgmin/mL	16.0 ± 6.32 µg/mL
Breithaupt et al. (1999) <sup>99</sup>	600mg AL racémico, VO	16	R-AL: 2348.04 ngh/mL S-AL: 1243.24 ngh/mL	R-AL: 1832.3 ng/mL S-AL: 978.20 ng/mL
Mignini et al. (2007) <sup>100</sup>	a) 600mg Thioctacid, VO	16	3510.9 ± 1088.6 ngh/mL	1338.6 ± 751.8 ng/mL
	b) 600mg Tioctil, VO		3563 ± 1374.1 ngh/mL	1215.8 ± 560.5 ng/mL
Amenta et al. (2008) <sup>101</sup>	a) 600mg Thioctacid, VO	8	3270.9 ± 372.8 ngh/mL	1266.2 ± 237.7 ng/mL
	b) 600mg Tiocronal, VO		2925.2 ± 448.4 ngh/mL	2290.5 ± 286.6 ng/mL
	c) 600mg Biodynoral, VO		3142.3 ± 331.5 ngh/mL	2262.8 ± 392.8 ng/mL
	d) 600 mg Tiobec retard, VO		3187.4 ± 152.8 ngh/mL	1397.7 ± 70.40 ng/mL

ABC= área bajo la curva Cmax= concentración máxima

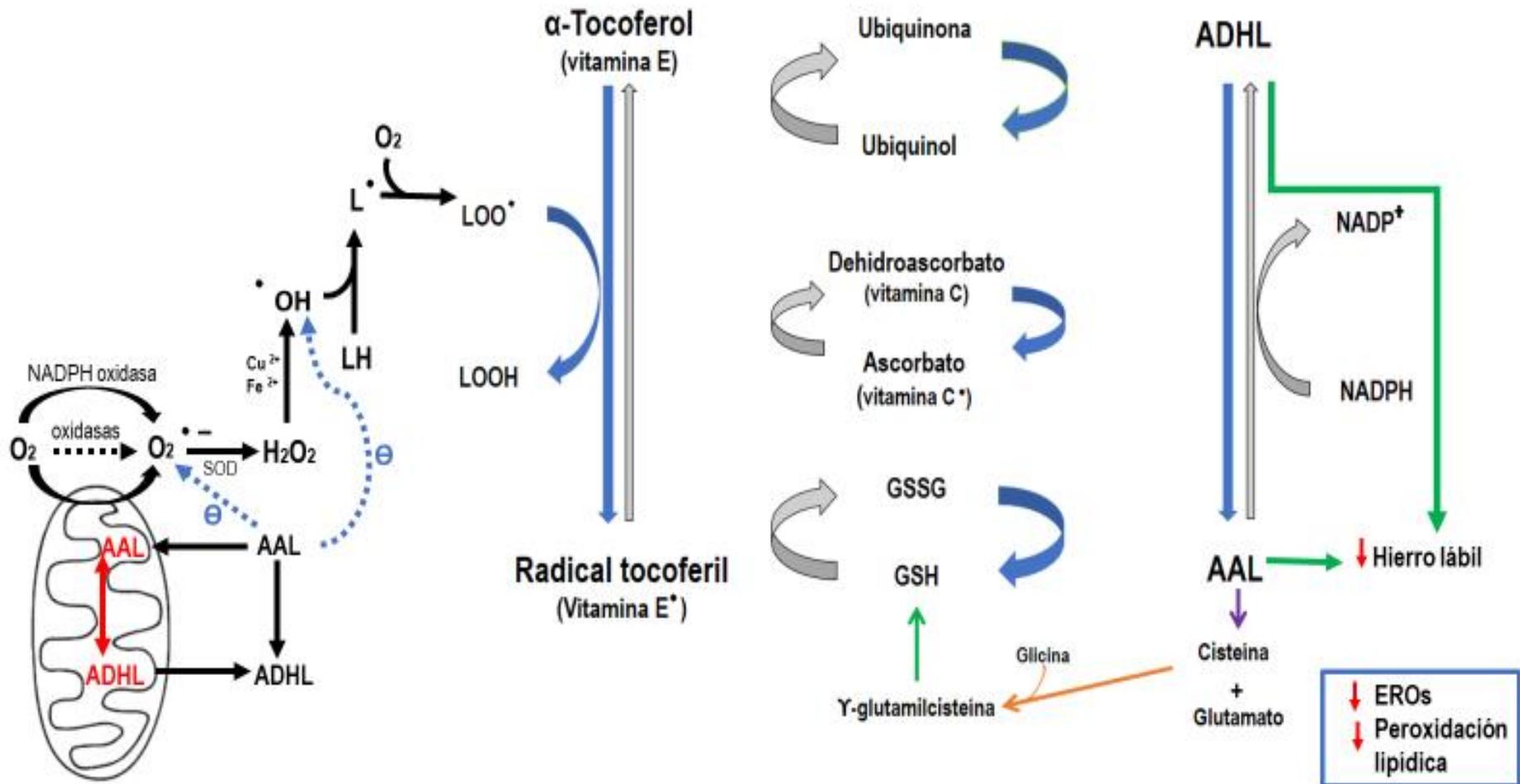
### III.3.2. Propiedades antioxidantes y quelantes del AAL

Tanto el AAL como el ADHL son capaces de contrarrestar diversas EROs (radical hidroxilo, anión peroxinitrito, ácido hipocloroso, singulete de oxígeno y radical peroxilo) ya que forman un potente par redox capaz de neutralizarlas. El ADHL posee la habilidad de regenerar las formas reducidas de otros antioxidantes como las vitaminas C y E, cuya función es ceder electrones a las EROs y RL para evitar que los tomen de las macromoléculas; sin embargo, al hacerlo generan formas oxidadas de ellas mismas, las cuales requieren ser reducidas para interactuar con otros RL, tal como se observa en la figura III.11. El ADHL también es capaz de reducir la forma oxidada de la coenzima Q-10, la cual además de ser un importante componente de la cadena de transporte de electrones en la mitocondria actuando como antioxidante, posee la habilidad de reducir la forma oxidada de la vitamina E.<sup>102-103</sup>

Por su parte, el ADHL restablece la razón glutatión reducido/oxidado (GSH/GSSG) a través de dos mecanismos: 1) reduciendo directamente GSSG a GSH al cederle electrones, y 2) mejorando la captación plasmática de cistina y reduciéndola a cisteína, puesto que esta última es un precursor del glutatión. En este contexto, se ha observado incremento en los niveles de glutatión después de la administración de AAL.<sup>87,95,102</sup>

El AAL induce la síntesis de antioxidantes endógenos o de enzimas antioxidantes y mejora su captación en diferentes tejidos. Así, se ha evidenciado un incremento en los niveles de ascorbato hepático en ratas longevas, las cuales poseen menor cantidad de transportadores de vitamina C en comparación con ratas jóvenes, y tras ser tratadas con AAL, alcanzan niveles normales.<sup>87,104-105</sup>

El AAL y el ADHL además de ser excelentes antioxidantes, poseen también la capacidad de quelar metales, es decir, contrarrestan compuestos metálicos potencialmente oxidantes, principalmente metales iónicos, a través de la formación de complejos. Debido a ello, AAL y ADHL pueden quelar iones divalentes tanto *in vitro* como *in vivo*; así mientras AAL es capaz de quelar  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  y  $Zn^{2+}$ , el ADHL puede quelar  $Hg^{2+}$  y  $Fe^{3+}$ . Al respecto, se ha evidenciado que el hierro y el cobre intervienen en la producción de EROs, y que posterior a la quelación de ambos metales por parte de ADHL en el cerebro, se observa disminución de dichas especies oxidantes; dado lo anterior, se ha sugerido que el AAL podría resultar benéfico en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, al disminuir el daño oxidante en las células del cerebro, proceso considerado factor etiológico de la enfermedad. Aun cuando el AAL y el ADHL son capaces de quelar algunos metales, no propician depleción de los mismos y por ende no perjudican los procesos biológicos en los cuales se involucran.<sup>106-107</sup>



**Figura III.11.** Propiedades antioxidantes del AAL y ADHL. Tanto la forma oxidada como la reducida tienen la capacidad de regenerar antioxidantes endógenos, tales como: vitamina C, vitamina E y GSH. Además, pueden interactuar directamente con las EROs y evitar la peroxidación lipídica. LH: lípidos insaturados, LOOH: Lípidos hidroperóxidos, LOO<sup>·</sup>: radical peróxido. Modificado de Rochette et al, 2015.<sup>107</sup>

### *III.3.3. Participación de AAL en vías de señalización*

El AAL interviene en varias vías de señalización, entre ellas, la más importante y estudiada es la vía de la insulina. La evidencia científica recabada hasta ahora señala que el AAL estimula la translocación de los transportadores de glucosa GLUT 1 y GLUT 4 desde el complejo de Golgi hacia la membrana celular, tanto de células adiposas como de músculo esquelético y paralelamente, induce la captación y aprovechamiento de la glucosa por parte de dichas células (figura III.12).<sup>108</sup>

El mecanismo que describe la participación del AAL en la vía de señalización de la insulina sugiere que su acción es debida a un aumento en la actividad de las proteínas que participan en la vía, tales como: el receptor de insulina (IR), el sustrato del receptor de insulina (IRS1), la fosfoinositol-3-cinasa (PI3K) y la proteína cinasa B, mismas que responden al AAL de igual manera que ante la insulina. En este sentido, el AAL induce la fosforilación de tirosina en el IR, cuyo resultado se traduce en la mejora de la captación de glucosa dependiente de PI3K.<sup>108-110</sup>

Otra vía de señalización en la cual el AAL tiene una importante participación es la del NF- $\kappa$ B, factor que en el citosol se encuentra inhibido por la proteína IKK. Toda vez que la célula recibe una señal externa capaz de inducir la fosforilación de IKK, provocando su degradación y liberando al NF- $\kappa$ B, éste último se introduce al núcleo y estimula la activación de los genes que regula. Ya hemos mencionado que los RL estimulan la fosforilación de la proteína inhibidora IKK, al activar al RAGE y liberan al NF- $\kappa$ B, el cual al trasladarse al núcleo, induce la transcripción de genes responsables de la síntesis de proteínas que activan respuestas inflamatorias, vasculares y de proliferación celular. El AAL inhibe la fosforilación de la proteína IKK al interactuar directamente con los RL e impide la activación del NF- $\kappa$ B, aunado a ello regenera a la vitamina E y ésta última se encarga de inhibir a la proteína cinasa C que propicia la fosforilación de IKK. Dado lo anterior queda de manifiesto el efecto anti-inflamatorio del AAL, ya que al inhibir la activación de NF- $\kappa$ B impide la síntesis de proteínas pro-inflamatorias (IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$ ).<sup>111-112</sup>

El AAL posee la habilidad de estimular la actividad de algunas proteínas cinasas, entre ellas: la proteína cinasa C (PKC) que participa en procesos de transcripción, transducción de señales hormonales y regulación del metabolismo; la proteína Akt relacionada con procesos proliferativos y anti-apoptóticos; la proteína Erk1/2 implicada en procesos de proliferación celular; y la proteína MAPK encargada de modular la transcripción de determinados genes.<sup>88,113</sup>

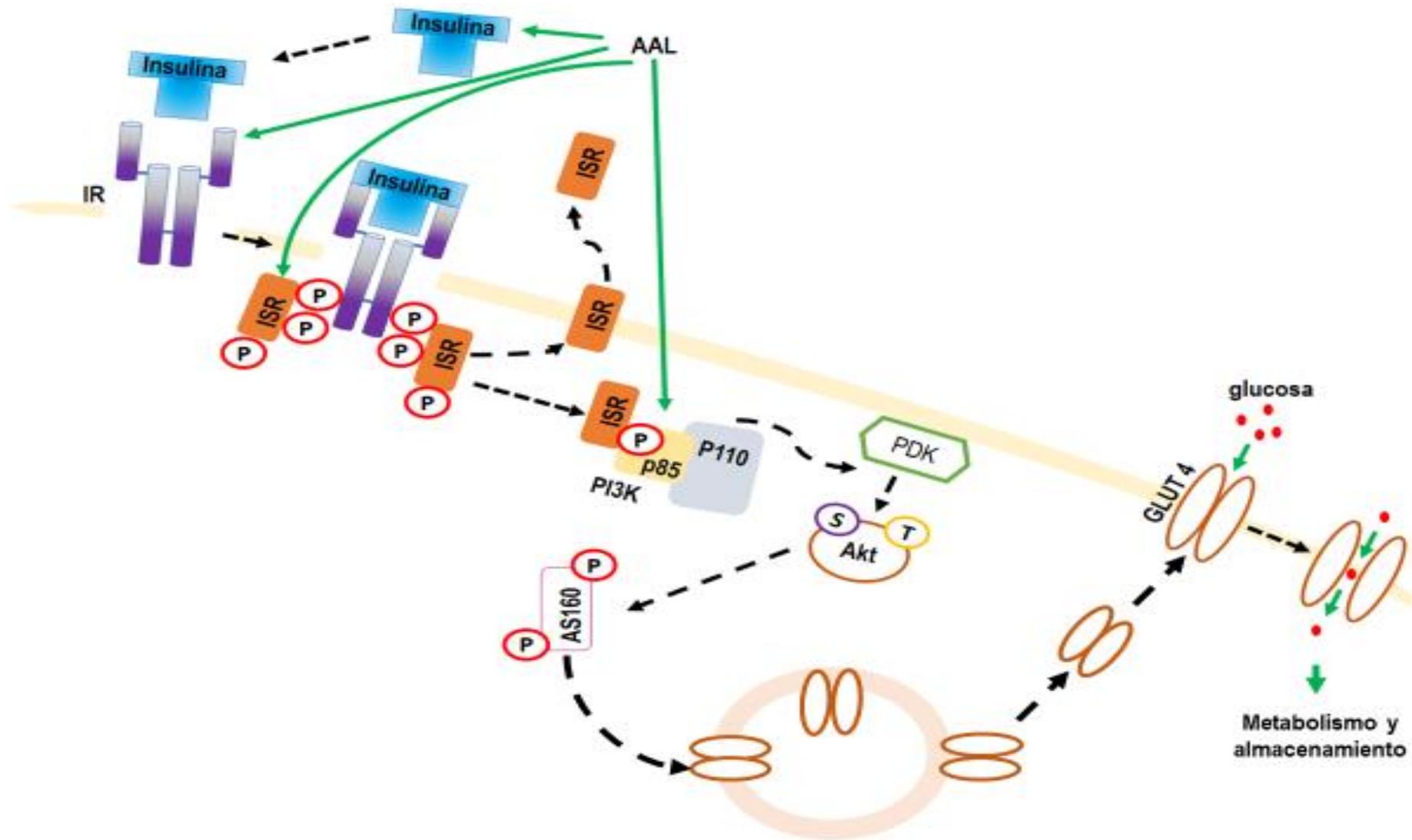


Figura III.12. Participación del AAL en la vía de señalización de la insulina. Modificado de Olivares-Reyes et al, 2008.<sup>33</sup>

El AAL influye sobre la proteína cinasa activada por adenosin monofosfato (AMPK), que está involucrada en múltiples vías de señalización intracelular relacionadas con el metabolismo, la respuesta al estrés, el ciclo celular y el proceso de envejecimiento. La AMPK funge como un sensor celular de energía y tras ser activada por la cinasa hepática B1 (LCB1) y por una calmodulina dependiente de cinasa (CaMKK), promueve la regulación de vías metabólicas que propician la síntesis de ATP a partir de la oxidación de glucosa y ácidos grasos. La intervención del AAL en esta vía tiene como resultado la estimulación indirecta de AMPK puesto que activa a la CaMKK, posteriormente el AAL induce la fosforilación de IRS1 y se activa la vía de señalización IRS1/PI3K y se estimula la translocación del GLUT 4, con la consecuente captación de glucosa por parte de las células.<sup>114-116</sup>

Los múltiples efectos que el AAL ejerce sobre algunos procesos metabólicos, inmunes y de proliferación celular, aunado a sus propiedades: antioxidante, quelante de metales y anti-inflamatoria; lo han convertido en una molécula con potencial terapéutico para el tratamiento del daño hepático, trastornos neurológicos e incluso algunos tipos de cáncer; sin embargo el uso clínico más estudiado ha sido el tratamiento de las complicaciones de la DM.<sup>106-107</sup>

#### *III.3.4. Aplicaciones clínicas del AAL*

Como se ha mencionado en apartados anteriores, la hiperglucemia que caracteriza a la DM2 desencadena procesos que contribuyen a estados protrombótico y proinflamatorio, ambos involucrados en las complicaciones de la enfermedad. En este contexto, una de las principales es la disfunción endotelial, caracterizada por vasodilatación reducida, a causa del EO establecido en las células endoteliales. El AAL mejora el estado redox de las células endoteliales y promueve la síntesis de óxido nítrico (NO), molécula vasodilatadora que regula la elasticidad de las paredes de los vasos sanguíneos. Lo anterior ha quedado de manifiesto en algunas investigaciones realizadas en sujetos diabéticos o con enfermedad cardiovascular (cuadro III.3), en los cuales se encontró mejora significativa en la función endotelial, reflejada por una elevada vasodilatación dependiente del endotelio y disminución de la presión sanguínea, tras recibir AAL vía oral, lo que no sucedió en los sujetos que recibieron placebo.<sup>117-</sup>

120

Simultáneamente al daño vascular se desencadena una respuesta inflamatoria, misma que es producto de la activación del NF- $\kappa$ B, el cual estimula la producción y liberación de moléculas proinflamatorias. Al respecto, se ha observado que el AAL disminuye la producción y liberación de TNF- $\alpha$  así como de

moléculas de adhesión intercelular (ICAM-1) y moléculas de adhesión vascular (VCAM). Además, existe evidencia de que el AAL posee la habilidad de reducir la producción de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 y EROs en ratones con artritis, previniendo los cambios destructivos del tejido conectivo, mientras que en ratas diabéticas además mejora la RI. En pacientes diabéticos mejora la función endotelial gracias a que disminuye la producción de moléculas proinflamatorias y pro-oxidantes; evidenciando los efectos anti-inflamatorio y antioxidante del AAL, tal como se aprecia en el cuadro III.3.<sup>121-123</sup>

La intervención del AAL en la vía de señalización de la insulina y de la AMPK le confiere propiedades hipoglucemiantes. Esto se ha observado en ratones que tras recibir dieta rica en grasas fueron tratados con AAL, observándose disminución de la hiperglucemia y mejora en la RI de manera similar a la metformina. Asimismo, en otro estudio realizado con humanos, se administró AAL en distintas dosis a sujetos diabéticos durante seis meses, encontrándose disminución en el porcentaje de HbA1c de manera dosis-dependiente; pese a que en otro estudio no se observó efecto alguno respecto a la sensibilidad a la insulina (cuadro III.3).<sup>124-126</sup>

Debido a la hiperglucemia con la que cursa la DM2 se da lugar a la formación de AGEs, los cuales al interactuar con sus receptores propician daño a las células de la retina, los glomérulos y del endotelio, resultando en retinopatía, nefropatía y daño vascular. Gracias al efecto hipoglucemiante del AAL se logra reducir la formación de AGEs, lo que se traduce en disminución del daño a retina y riñones (cuadro II.3). Dicha propiedad de AAL se ha observado en pacientes diabéticos que después de recibir tratamiento con AAL en combinación con vitaminas antioxidantes presentaron mejora de acuerdo con registros de electroretinograma así como disminución en la concentración de EROs.<sup>106,127-128</sup>

El AAL también reduce los daños causados por la nefropatía diabética, ya que en ratas tratadas con AAL se ha encontrado disminución de la proteinuria, de la glucosa y de la concentración de malonaldehído (MDA), así como aumento en la actividad de las enzimas SOD y GPx y concentración de las vitaminas C y E, lo cual no se observó en el grupo de ratas que recibió un placebo. En humanos, el efecto ha sido muy similar puesto que tras administrar AAL a sujetos diabéticos se ha evidenciado disminución significativa de marcadores de EO como el MDA y la 8-hidroxiguanosina (8-OHdG), aumento en la actividad de la SOD mientras que la albuminuria también disminuyó después del tratamiento.<sup>129-130</sup>

La neuropatía diabética es la primera complicación sobre la cual se han documentado los efectos benéficos del AAL. Existen investigaciones cuyos resultados sugieren que el AAL administrado a dosis de 600mg/día tiene la capacidad de mejorar la neuropatía, además se ha observado disminución significativa en los niveles de HbA1c. Asimismo, en otra investigación se observó mejora sintomática y fisiológica en la neuropatía tras administrar AAL en combinación con SOD. Recientemente se presentaron resultados de cuatro años de seguimiento realizado a sujetos diabéticos, quienes posterior al tratamiento con 600mg/día de AAL, mostraron mejora y prevención de los síntomas de la neuropatía, no así aquellos a quienes se les administró un placebo (cuadro III.3).<sup>131-133</sup>

Las múltiples propiedades del AAL lo han convertido en un compuesto de uso complementario para el tratamiento no sólo de las complicaciones de la diabetes sino de enfermedades neurodegenerativas, obesidad y también cáncer.<sup>87</sup>

Dado que se ha demostrado que la disfunción endotelial implicada en la fisiopatología de enfermedades neurodegenerativas, es resultado del EO, se ha recurrido al empleo de sustancias antioxidantes. En este sentido se ha demostrado que el AAL aumenta la captación de glucosa en el cerebro mejorando la plasticidad sináptica en ratones con enfermedad de Alzheimer. También ejerce cierto el efecto neuroprotector al mejorar la expresión de receptores muscarínicos en hipocampo y amígdala.<sup>134-135</sup>

Por otro lado, se han realizado estudios con la finalidad de observar el efecto terapéutico del AAL sobre enfermedades hepáticas ya sea de origen viral, alcohólico o autoinmune, mismas que cursan exacerbado proceso inflamatorio y EO. Los resultados obtenidos han sugerido que el AAL mejora la endotoxemia portal hepática inducida en ratas tratadas con lipopolisacáridos y una dieta rica en fructosa. Además, el AAL también disminuye los niveles de lipoperóxidos y aumenta la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y GPx, atenuando la hepatitis inducida por la concanavalina-A en ratas, aunado a ello modula la secreción de citocinas proinflamatorias y disminuye el EO.<sup>136-137</sup>

El AAL ha sido empleado en el tratamiento de la obesidad, debido a su relación con la RI, la elevación en las concentraciones de ácidos grasos, así como de citocinas proinflamatorias. Al respecto se tiene evidencia de que la suplementación con AAL induce pérdida de peso, mejora el perfil lipídico, disminuye la resistencia a la insulina y las concentraciones de TNF- $\alpha$ .<sup>138</sup>

**Cuadro III.3.** Usos clínicos del ácido alfa lipoico (AAL).

AUTOR	TIPO DE ESTUDIO	SUJETOS DE ESTUDIO	DOSIS ADMINISTRADA	PARÁMETROS MEDIDOS	HALLAZGOS
<i>AAL en el tratamiento de disfunción endotelial</i>					
Scaramuzza et al. (2015) <sup>118</sup>	Aleatorizado, doble ciego	1) 25 jóvenes con DM1 2) 27 jóvenes con DM1 3) 19 jóvenes con DM1	Dieta antioxidante + AAL (400mg/día) por 6 meses, v.o. Dieta antioxidante + placebo Control	Capacidad vasodilatadora endotelio-dependiente HbA1c	Mejora en la función endotelial, sin cambios aparentes en la HbA1c
McMackin et al. (2007) <sup>119</sup>	Doble ciego, controlado	1) 15 adultos con ECV 2) 21 adultos con ECV	200 mg de AAL+ 500 mg de L-carnitina /día, oral por 8 semanas Placebo	Función vascular Presión arterial	Disminución de la presión arterial
Heinisch et al. (2010) <sup>120</sup>	Aleatorizado, doble ciego	1) 15 diabéticos 2) 15 diabéticos	600 mg al día, i.v. por 3 semanas Placebo	Flujo sanguíneo del antebrazo	Mejora en la vasodilatación dependiente del endotelio
<i>Efectos anti-inflamatorio y antioxidante del AAL</i>					
Lee et al. (2007) <sup>121</sup>	Aleatorizado, controlado	1) 14 ratones 2) 13 ratones 3) 17 ratones los 3 grupos con artritis inducida	SSI 0.9% vía i.p. SSI 0.9%+10mg/kg de AAL vía i.p. SSI 0.9%+100mg/kg de AAL vía i.p. 5 veces a la semana durante 7 semanas en los 3 grupos	Citocinas proinflamatorias IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ . Concentración intracelular de EROs Evaluación histopatológica	Disminución de las concentraciones de IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ Inhibición de la formación de osteoclastos Prevención de la erosión de hueso Reducción de EROs, en todos los casos de manera dosis-dependiente
Castro et al. (2015) <sup>122</sup>	Aleatorizado, controlado	1) 20 ratas 2) 20 ratas 3) 20 ratas	Control Dieta con fructosa al 10% Dieta con fructosa al 10% + AAL (35mg/kg/día)	Glucosa, triglicéridos e insulina séricos. Marcadores inflamatorios Marcadores de estrés oxidante HOMA	Disminución de las concentraciones séricas de marcadores proinflamatorios TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ y PAI-1 Mejora en la IR

AUTOR	TIPO DE ESTUDIO	SUJETOS DE ESTUDIO	DOSIS ADMINISTRADA	PARÁMETROS MEDIDOS	HALLAZGOS
Sola et al. (2005) <sup>123</sup>	Aleatorizado, doble ciego	1) 15 diabéticos	300 mg de AAL /día, oral por 4 semanas	Función endotelial y marcadores proinflamatorios	Mejora en la función endotelial y disminución en los marcadores proinflamatorios (IL-6, PAI-1 e isoprostanos), superior con la combinación AAL/Irbesartán
ISLAND		2) 14 diabéticos	150 mg/día de Irbesartán		
		3) 15 diabéticos	150 mg Irbesartán + 300 mg AAL		
		4) 14 diabéticos	Placebo		
<i>AAL y su efecto hipoglucemiante</i>					
Yang et al. (2014) <sup>124</sup>	Aleatorizado, controlado	1) 15 ratas	Dieta baja en grasa (DBG)	Peso corporal, circunferencia abdominal, concentración sérica de glucosa	Disminución del peso corporal, circunferencia abdominal.  Disminución de la hiperglucemia y resistencia a la insulina. Resultados similares a los obtenidos con metformina.
		2) 15 ratas	Dieta rica en grasa (DRG)	HOMA	
		3) 15 ratas	DRG + 100 mg/kg de AAL, vía i.p.		
		4) 15 ratas	DRG + 200 mg/kg de AAL, vía i.p.		
		5) 15 ratas	DRG + 300 mg/kg de metformina, vía i.p.		
Porasuphatana et al. (2012) <sup>125</sup>	Aleatorizado, doble ciego	1) 7 diabéticos	300 mg/día de AAL v.o. por 6 meses	HbA1c	HbA1c disminuyó de manera dependiente a la dosis.  Isoprostanos aumentados en el grupo placebo  8-OHdG permaneció igual
		2) 7 diabéticos	600 mg/día de AAL v.o. por 6 meses	Isoprostanos	
		3) 7 diabéticos	900 mg/ día de AAL v.o. por 6 meses	8-hidroxi-deoxiguanosina (8-OHdG)	
		4) 7 diabéticos	1200 mg/ día de AAL v.o. por 6 meses		
		5) 6 diabéticos	Placebo		
Oliveira et al. (2011) <sup>126</sup>	Aleatorizado, doble ciego, controlado	1) 26 diabéticos	600 mg AAL, oral por 4 meses	Glucosa plasmática	No se afecta la sensibilidad a la insulina con la administración de AAL y $\alpha$ -tocoferol.  HOMA no mostró diferencia significativa  Mejora del perfil lipídico
		2) 25 diabéticos	800 mg $\alpha$ -tocoferol oral	Insulina plasmática	
		3) 25 diabéticos	600 mg AAL + 800 mg $\alpha$ -tocoferol	Índice HOMA	
		4) 26 diabéticos	Placebo		

AUTOR	TIPO DE ESTUDIO	SUJETOS DE ESTUDIO	DOSIS ADMINISTRADA	PARÁMETROS MEDIDOS	HALLAZGOS
<i>AAL en el tratamiento de retinopatía</i>					
Nebbioso et al. (2012) <sup>127</sup>	Aleatorizado, ciego	1) 16 diabéticos con pre-retinopatía 2) 16 diabéticos con pre-retinopatía	400 mg/día de AAL + vitaminas antioxidantes + genisteína, oral Placebo	Radicales libres Antioxidantes séricos Electroretinograma	Efecto protector sobre células de la retina
Voloboueba et al. (2005) <sup>128</sup>	Transversal	Cultivos de células de retina fetal	1) control 2) t-BuOOH 3) t-BuOOH + AAL 0.1 mM 4) t-BuOOH + AAL 0.2 mM 5) t-BuOOH + AAL 0.5 mM	Concentración de EROs Apoptosis celular	Disminución de la concentración de EROs en 23% y 49 % con AAL 0.2 y 0.5 mM, respectivamente.  Incremento de la viabilidad de células del epitelio pigmentario de la retina de 38% al 90%.
<i>AAL en el tratamiento de nefropatía</i>					
Feng et al. (2013) <sup>129</sup>	Aleatorizado, controlado	1) 5 ratas diabéticas 2) 5 ratas diabéticas 3) 4 ratas sanas	AAL 35mg/kg vía i.p. por 10 semanas Placebo Control	Glucosa plasmática, proteinuria, concentraciones de MDA, SOD y GSH	Disminución de concentraciones de glucosa y MDA. Aumento de SOD y GSH Disminución de proteinuria. Aumento de vitaminas C y E; en comparación con el placebo
Lin et al. (2015) <sup>130</sup>	Controlado	1) 30 voluntarios sanos 2) 36 diabéticos	a) control b) 600 mg/día por 6 meses	SOD y GPx plasmáticas MDA, 8-OHdG y creatinina en orina microalbuminuria,	Aumento en las concentraciones de SOD y GPx. Disminución de MDA, creatinina, 8-OHdG y microalbuminuria. HbA1c permaneció igual
<i>AAL en el tratamiento de la neuropatía</i>					
Ziegler et al. (1995) <sup>131</sup>	Aleatorizado, doble ciego	1) 65 diabéticos 2) 63 diabéticos 3) 66 diabéticos 4) 66 diabéticos	100 mg de AAL, i.v. por 3 semanas 600 mg de AAL, i.v. por 3 semanas 1 200 mg de AAL, i.v. por 3 semanas Placebo, por 3 semanas	Síntomas de neuropatía, según puntajes de HPAL y NDS.	Mejora en los síntomas de neuropatía periférica, disminución hasta en un 30% en los puntajes de HPAL, NDS con dosis de 600 mg

AUTOR	TIPO DE ESTUDIO	SUJETOS DE ESTUDIO	DOSIS ADMINISTRADA	PARÁMETROS MEDIDOS	HALLAZGOS
Bertolotto et al. (2012) <sup>132</sup>	Prospectivo, no aleatorizado	50 pacientes diabéticos	600 mg de AAL + SOD	Parámetros electroneurográficos Percepción del dolor	Mejora en la conducción nerviosa Percepción de disminución del dolor
Ziegler et al. (2016) <sup>133</sup> NATHAN 1	Aleatorizado	1) 233 diabéticos 2) 227 diabéticos	a) 600 mg de AAL / día b) placebo En ambos casos por 4 años	Síntomas de neuropatía, conducción nerviosa, presión arterial y función cardíaca	Mejora en la conducción nerviosa y en los síntomas de neuropatía Mejora en la función cardíaca

AAL, ácido alfa lipoico; CAT, capacidad antioxidante total; DM1, Diabetes mellitus 1; ECV, enfermedad cardiovascular; EROs, especies reactivas de oxígeno; GPx, glutatión peroxidasa; GSH, glutatión reducido; HbA1c, hemoglobina glicosilada; 8-OHdG, 8-hidroxi-deoxiguanosina; HOMA, modelo de evaluación homeostática para medir la resistencia a la insulina; HPAL, Hamburg Pain Adjective List; IL-1 $\beta$ , interleucina 1 $\beta$ ; IL-6, interleucina 6; i.p. intraperitoneal; IR, resistencia a la insulina; i.v. intravenosa; MDA, malondialdehído; mNPQ, cuestionario modificado para dolor de cuello; NDS, Neuropathy Disability Score; NO, óxido nítrico; OUU, obstrucción unilateral uretral; SOD, superóxido dismutasa; TNF- $\alpha$ , factor de necrosis tumoral  $\alpha$ ; t-BuOOH, ter-butil hidroperóxido; TGF- $\beta$ , factor de crecimiento transformante  $\beta$ ; UI, unidades internacionales.

En lo que respecta a los posibles beneficios del AAL en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, se ha propuesto que dado que las células tumorigénicas convierten la glucosa preferencialmente en lactato aún en presencia de oxígeno, el AAL ejerce un efecto inhibitor de la tumorigénesis gracias a que actúa como cofactor de la piruvato deshidrogenasa, complejo enzimático que convierte la acetil CoA en piruvato, con lo se previene la formación de lactato, inhibiendo la glucólisis en células cancerígenas. Al respecto, se ha encontrado que el AAL suprime la proliferación de células cancerígenas mediante la activación de la vía AMPK que inhibe la vía de señalización del factor de crecimiento transformante  $\beta$ , suprimiendo el crecimiento del tumor.<sup>139-142</sup>

Aun cuando se tiene evidencia de los efectos benéficos del AAL en el tratamiento de diversas patologías, dicho compuesto continúa siendo objeto de estudio de muchos investigadores ya que aunado a su potencial terapéutico se trata de una sustancia muy segura.

### *III.3.5. Toxicidad del AAL*

Los estudios realizados para conocer los efectos secundarios del AAL concluyen que se requieren elevadas dosis para provocar náusea y vómito, se ha reportado que la dosis necesaria debe ser mayor a 2400 mg/kg de peso. Aunado a ello la administración del AAL a largo plazo (1-2 años) no causa efectos adversos en ratas, no obstante, a dosis de 121 mg/kg causan cambios significativos en las enzimas hepáticas alanino-amino transferasa y glutamato deshidrogenasa, manifestándose también cambios histopatológicos en el hígado y glándulas mamarias de las ratas estudiadas.<sup>87,98</sup>

Para estudiar la toxicidad del AAL se han llevado a cabo investigaciones en las que se señala que en perros y ratones bastan de 400-500mg/kg de peso para alcanzar la DL50, en tanto las ratas requieren dosis mayores a 2000mg/kg de peso, tal como se observa en el cuadro III.4. Pese a ello, en algunas ratas la dosis referida provoca sedación, apatía, piloerección, postura encorvada y cierre de ojos. En humanos se han empleado dosis de hasta 2400mg/día sin que se presenten efectos adversos, aunque en dosis más elevadas es posible que aparezcan náuseas, vómito, dolor abdominal y dispepsia. En casos más raros puede aparecer prurito y ulceraciones en la piel. Algunos ensayos clínicos realizados han demostrado que dosis de 600mg/día vía i.v. durante tres semanas no provocan efectos adversos. De igual manera se han administrado dosis de 1800 mg/día vía oral durante seis meses sin observarse daños en la salud.<sup>98,143-145</sup>

**Cuadro III.4.** Toxicidad del AAL en algunos modelos animales

AUTOR	MODELO ANIMAL	DL <sub>50</sub>
Biewenga et al. (1997) <sup>98</sup>	Ratón	500 mg/kg
Carlson et al. (1995) <sup>143</sup>	Perro	400-500 mg/kg
Hill et al. (2004) <sup>144</sup>	Gato	30 mg/kg
Cremer et al. (2006) <sup>145</sup>	Rata	> 2000 mg/kg

Partiendo de toda la evidencia científica recabada hasta el momento, podríamos considerar que gracias a la gran capacidad antioxidante del AAL es posible disminuir la producción de RL, lo cual se vería reflejado en la reducción de los marcadores de proceso inflamatorio, repercutiendo también sobre el metabolismo de la glucosa debido a su acción sensibilizante a la insulina, lo que a su vez disminuiría la formación de AGEs; logrando retrasar la aparición de las complicaciones propias de la DM, impactando positivamente sobre la calidad de vida de los adultos mayores con diabetes. Sin embargo, los resultados de las diferentes investigaciones en cuanto a los efectos del AAL en adultos mayores diabéticos aún son incipientes; por tal motivo, el objetivo principal de la presente investigación es la evaluación de los efectos antioxidante, antiinflamatorio e hipoglucemiante de dicho compuesto.

#### IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Paralelamente al incremento en la esperanza de vida, se ha incrementado la incidencia de enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) tales como la obesidad, afecciones cardiovasculares, tumores malignos, síndrome metabólico y diabetes mellitus tipo 2 (DM2). En este contexto, se ha observado que la prevalencia de diabetes mellitus en adultos mayores es dos veces mayor respecto al resto de la población; lo cual demanda una mayor atención en materia de prevención y tratamiento de dicha enfermedad.

Por otra parte, dado que el envejecimiento *per se* constituye un factor de riesgo para la presencia de ECNT, han surgido algunas teorías para explicar el proceso que propicia dicha vulnerabilidad. En este sentido, se ha propuesto que el daño oxidativo que se acumula con el paso de los años en el organismo es responsable del deterioro celular relativo al envejecimiento, ocasionando disminución de la funcionalidad de órganos y vulnerabilidad para la aparición de ECNT entre las que destaca la DM2, cuya fisiopatología está vinculada con el estrés oxidativo (EO) y el proceso inflamatorio crónico (PIC). Por tal motivo, se han propuesto algunas alternativas terapéuticas para prevenir o disminuir el EO y el PIC, tales como las vitaminas C y E, la coenzima Q-10 y recientemente el ácido alfa lipoico (AAL). En este sentido, se ha demostrado que el consumo periódico de AAL tiene un efecto antioxidante, antiinflamatorio e hipoglucemiante que influye positivamente en la fisiopatología de la neuropatía diabética y mejora la sintomatología. Por tal motivo, inferimos que la administración complementaria de AAL al tratamiento hipoglucemiante para adultos mayores con DM2 podría atenuar el daño oxidativo, lo cual a su vez tendría un efecto benéfico sobre los marcadores de proceso inflamatorio crónico y consecuente disminución significativa de la formación de productos finales de glucosilación avanzada (AGEs). En este marco planteamos la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuál es el efecto de la administración oral de ácido alfa lipoico sobre los niveles de glucosa, AGEs, marcadores de inflamación crónica y estrés oxidativo en adultos mayores con diabetes mellitus 2?

## **V. HIPÓTESIS**

Considerando los estudios sobre el efecto hipoglucemiante, antioxidante y antiinflamatorio del ácido alfa lipoico, suponemos que los adultos mayores con diabetes mellitus tipo 2 que reciban tratamiento complementario con dicho compuesto mostrarán una disminución estadísticamente significativa de los niveles de glucosa, marcadores de estrés oxidativo, inflamación crónica y AGEs, en comparación con el grupo que no reciba dicho tratamiento.

## **VI. OBJETIVOS**

### **VI.1 Objetivo general**

Evaluar el efecto del ácido alfa lipoico sobre los niveles de glucosa, marcadores de estrés oxidativo, proceso inflamatorio crónico y AGEs en adultos mayores con diabetes tipo 2.

### **VI.2 Objetivos específicos**

- ❖ Evaluar el efecto del ácido alfa lipoico sobre las concentraciones de glucosa en adultos mayores con diabetes tipo 2.
- ❖ Evaluar el efecto de la administración de ácido alfa lipoico sobre los productos finales de la glucosilación avanzada en adultos mayores con diabetes mellitus tipo 2.
- ❖ Evaluar el efecto antioxidante y antiinflamatorio del ácido alfa lipoico en adultos mayores con diabetes tipo 2.

## VII. MATERIAL Y MÉTODOS

### VII.1 Universo y tipo de estudio

Se realizó un estudio cuasi-experimental en una muestra a conveniencia de 108 adultos mayores mexicanos, pacientes del Hospital Regional ISSSTE Ignacio Zaragoza, quienes además de padecer diabetes mellitus tipo 2 cumplieron con los siguientes criterios:

#### *Criterios de inclusión*

- ❖ De 60 a 74 años.
- ❖ Sexo indistinto.
- ❖ Sin daño renal.
- ❖ Sin tomar anti-inflamatorios.
- ❖ Estuvieron de acuerdo en firmar el consentimiento informado (ver Anexo 1 y anexo 2).

#### *Criterios de exclusión*

- ❖ Aquellos que estuvieran participando en algún otro proyecto de investigación.
- ❖ Hipersensibles al ácido alfa lipoico.
- ❖ Con trastornos mentales.
- ❖ Que padecieran hipotiroidismo.
- ❖ Que presentaran problemas de absorción de tubo digestivo o que hayan sido sometidos a cirugía gástrica.
- ❖ Con insuficiencia hepática aguda.
- ❖ Que padecieran algún tipo de cáncer.
- ❖ Que se encontraran ingiriendo vitaminas antioxidantes (A, C y/o E).

#### *Criterios de eliminación*

- ❖ Aquellos que presentaran reacciones adversas severas atribuibles al tratamiento.
- ❖ Que renunciaran voluntariamente al proyecto.
- ❖ Que interrumpieran la ingesta del medicamento durante el tratamiento.

Los participantes fueron asignados aleatoriamente a uno de los 3 grupos siguientes:

- (i) Grupo experimental (GE): 42 adultos mayores que recibieron dos cápsulas con ácido alfa lipoico en dosis de 300mg c/u diariamente.
- (ii) Grupo placebo (GP): 38 adultos mayores que recibieron dos cápsulas con las mismas características que las del grupo tratamiento, pero cuyo contenido era un placebo.
- (iii) Grupo control (GP): 28 adultos mayores sin tratamiento ni placebo.

La investigación tuvo una duración de 6 meses. Durante el seguimiento se eliminaron los datos de un total de 15 participantes, 4 de ellos decidieron abandonar el tratamiento por no sentir mejoría, 2 se retiraron manifestando que el tratamiento les elevó la tensión arterial y la glicemia, 3 por cambio de residencia, 1 abandonó por ingreso a hospital a causa de hepatitis, 2 manifestaron sentir incomodidad por pertenecer a un grupo experimental y 3 más se retiraron sin dar explicación alguna (figura VII.1). Cabe mencionar que tanto las cápsulas con ácido lipoico como aquellas con placebo, fueron proporcionadas por los Laboratorios Farmacéuticos Medix®.



Figura VII.1. Diagrama de la selección de participantes y conformación de los grupos de estudio. [Cambiar tratamiento por experimental](#)

## VII.2 Variables

Independiente:

- ❖ Tratamiento (600 mg/ día de ácido alfa lipoico, placebo, control)

Dependientes:

- ❖ Niveles de glucosa
- ❖ Concentración de AGEs
- ❖ Proceso inflamatorio crónico
- ❖ Estrés oxidativo

**Cuadro VII.1** Operacionalización de las variables del estudio

Variable	Definición	Nivel de medición	Categorías
<b>Tratamiento</b>	Administración complementaria de ácido alfa lipoico o placebo.	Cualitativa nominal	Tratamiento (600 mg/día de ácido alfa lipoico) Placebo Sin tratamiento complementario
<b>Niveles de glucosa</b>	Concentración sérica de glucosa	Cuantitativa continua	Concentración de glucosa expresada en mg/dL
<b>Concentración de AGEs</b>	Concentración de AGEs en suero o plasma.	Cuantitativa continua	Concentración sérica del receptor RAGE expresada en pg/mL
<b>Proceso inflamatorio crónico</b>	Respuesta del organismo ante el estímulo de agentes patógenos cuya finalidad es eliminar la causa inicial de la lesión celular	Cuantitativa continua	Concentración sérica de IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$ , expresada en pg/dL
<b>Estrés oxidativo</b>	Desequilibrio bioquímico entre los oxidantes y los antioxidantes, medido a través de la concentración plasmática de la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y GPx y la capacidad sérica antioxidante total, así como del marcador pro-oxidante F2-isoprostanos	Cuantitativa continua	Actividad enzimática de SOD expresada en U/L Actividad enzimática de GPx expresada en U/L Capacidad sérica antioxidante total expresada en mmol/L Concentración de F2-isoprostanos expresada en pg/mL

### *VII.2.1 Covariables: factores pro-oxidantes y/o proinflamatorios*

- ❖ Ingesta de alcohol: determinado por la cantidad de bebidas alcohólicas que se ingieren de manera regular.
- ❖ Ingesta de cafeína: determinada por el número de tazas de café o bebidas con cafeína que son ingeridas regularmente.
- ❖ Tabaquismo: número de cigarrillos que fuma diariamente para satisfacer su necesidad de nicotina.
- ❖ Sedentarismo: ausencia de toda actividad no laboral que requiera movimiento y provoque un consumo calórico considerable, así como desgaste físico, realizado de manera regular.

### **VII.3 Técnicas**

Se aplicó el instrumento de estilos de vida (Anexo 3) para determinar la presencia de factores pro-oxidantes (consumo de alcohol, ingesta de cafeína, tabaquismo, sedentarismo); además, previo al inicio del estudio y transcurridos seis meses, se realizaron las mediciones siguientes:

#### *VII.3.1. Mediciones antropométricas y tensión arterial*

- ❖ Peso: se midió el peso de los participantes en ropa interior empleando una báscula Torino calibrada en cada medición.
- ❖ Estatura: los participantes estando en posición de pie manteniendo los talones juntos, con los glúteos, hombros y cabeza en contacto con el estadímetro de aluminio graduado en milímetros, con la vista al frente y el plano de Frankfurt paralelo al suelo.
- ❖ Índice de masa corporal: se calculó dividiendo el peso entre la estatura al cuadrado ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ).
- ❖ Perímetro de cintura: se midió rodeando la cintura a la altura de la cicatriz umbilical, empleando una cinta métrica de asbesto, teniendo cuidado de no ejercer presión sobre el cuerpo.
- ❖ Perímetro de cadera: se obtuvo midiendo la parte más prominente de los glúteos con una cinta métrica de asbesto.
- ❖ Índice cintura/cadera: se calculó al dividir el valor de la circunferencia de la cintura entre el de la cadera.
- ❖ Tensión arterial: se determinó de acuerdo con lo establecido en la NOM-030-SSA-2-2009. Para la prevención, detección, diagnóstico, tratamiento y control de la hipertensión arterial. Para ello se solicitó a cada participante sentarse en una silla con buen respaldo, con un brazo

descubierto y flexionado sobre un soporte. Se empleó un estetoscopio y un esfigmomanómetro acoplado a una columna de mercurio para tomar la medida de la tensión arterial sistólica y diastólica.<sup>146</sup>

### *VII.3.2. Mediciones bioquímicas.*

Previo ayuno de al menos 8 horas, entre las 7:00 y 9:00 horas, se obtuvieron muestras sanguíneas con equipo Vacutainer, en tubos (Beckton-Dickinson) con EDTA para realizar la biometría hemática, la cuantificación del porcentaje de HbA1c y medir la concentración de isoprostanos. Asimismo, se tomaron muestras sin anticoagulante para las pruebas bioquímicas, concentración de AGEs medida a través de su receptor (RAGE) y marcadores de inflamación (concentraciones de glucosa, ácido úrico, urea, colesterol total, HDL-colesterol, triglicéridos, creatinina, albúmina, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$  y PCR). Además, se obtuvieron muestras de sangre en tubos con heparina para la medición de los marcadores de estrés oxidativo (SOD, GPx, Capacidad antioxidante total). Para las pruebas realizadas empleando suero o plasma, se centrifugaron las muestras a 3500 rpm durante 10 minutos y posteriormente se separó el paquete eritrocitario del suero o plasma, siendo estos últimos almacenados en ultracongelador a -70 °C hasta su uso en las pruebas correspondientes.

Las técnicas empleadas se describen a continuación:

- ❖ HbA1c (Randox Laboratories Ltd, HA 3830): en un primer paso se da un pretratamiento a la muestra de sangre total, consiste en lisar los glóbulos rojos y provocar la hidrólisis de la hemoglobina a cargo de una proteasa. En un segundo paso se determina, bajo principio turbidimétrico, la cantidad de HbA1c contenida en la muestra mediante aglutinación en látex. La glucohemoglobina compete con anticuerpos monoclonales HbA1c.
- ❖ Albúmina (Randox Laboratories Ltd, UK AB 362): la medición se basa en la unión cuantitativa de la albúmina con el indicador verde de bromocresol, el complejo formado (albúmina-verde de bromocresol) presenta absorción máxima a 578 nm, siendo la absorbancia directamente proporcional a la concentración de albúmina en la muestra.
- ❖ Colesterol (Randox Laboratories Ltd, UK CH 200): es determinado tras una hidrólisis enzimática y una oxidación. Se forma un indicador quinoneimina a partir de peróxido de hidrógeno y 4-aminoantipirina en presencia de fenol y peroxidasa. Se mide la absorbancia a 546 nm, siendo directamente proporcional al colesterol contenido en la muestra.

- ❖ Creatinina (Randox Laboratories Ltd UK CR 510): la creatinina en solución alcalina reacciona con ácido pícrico para formar un complejo coloreado cuya absorción a 492 nm es proporcional a la concentración de creatinina contenida en la muestra.
- ❖ Glucosa (Randox Laboratories Ltd, UK GL 364): se determina tras una oxidación enzimática en presencia de glucosa oxidasa. El peróxido de hidrógeno formado reacciona, catalizado por la peroxidasa, con fenol y 4-aminofenazona para formar un indicador de quinoneimina rojo-violeta. La absorbancia es medida a 500 nm y la intensidad es directamente proporcional a la concentración de glucosa en la muestra.
- ❖ Triglicéridos (Randox Laboratories Ltd, UK TG 210): se determinan tras hidrólisis enzimática con lipasas. El indicador es una quinoneimina formada a partir de peróxido de hidrógeno, 4-aminofenazona y clorofenol bajo la influencia catalítica de la peroxidasa. Se mide la absorbancia a 500 nm, siendo la intensidad proporcional a los triglicéridos contenidos en la muestra.
- ❖ Ácido úrico (Randox Laboratories Ltd, UK UA 230): se convierte en alantoína mediante una reacción catalizada por uricasa, formando además peróxido de hidrógeno, mismo que bajo la catálisis de la peroxidasa, oxida al ácido 3,5-dicloro-hidroxibencenosulfónico y 4-aminofenazona para formar un compuesto colorido de quinoneimina rojo-violeta cuya máxima absorción a 520 nm es proporcional a la cantidad de ácido úrico presente en la muestra.
- ❖ HDL-colesterol (Randox Laboratories Ltd, UK CH 204): la determinación se fundamenta en la precipitación cuantitativa de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), muy baja densidad (VLDL) y quilomicrones, bajo la acción de ácido fosfotúngstico y  $Mg^{2+}$ , el sobrenadante que contiene al HDL-colesterol, forma un compuesto quinoneimina por acción de esterasas de colesterol, dicho compuesto colorido presenta absorción máxima a 578 nm y su intensidad es proporcional a la concentración del analito en la muestra.
- ❖ Urea (Randox Laboratories Ltd, UK UR 220): la urea se hidroliza en presencia de agua y ureasa para producir amoníaco y dióxido de carbono. El amoníaco producido se combina con  $\alpha$ -oxoglutarato y NADH en presencia de glutamato deshidrogenasa para producir glutamato y  $NAD^+$ . La absorción máxima de los productos de la reacción es medida a 340 nm, siendo proporcional a la cantidad de urea contenida en la muestra.

Todas las mediciones incluyeron sueros control con valores normal y alto de la casa comercial Randox Laboratories Ltd. Las pruebas fueron realizadas en el equipo automatizado Selectra Junior.

- ❖ La biometría hemática fue realizada en un equipo automatizado Micros 60, se emplearon controles bajo, normal y alto, como control de calidad de cada medición.

#### *VII.3.2.1 Concentración de AGE's*

Se realizó la medición de los AGE's a través de su receptor (RAGE), mediante un ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA) con un estuche comercial de R&D (DRG00). Se emplea un anticuerpo monoclonal para RAGE humano, el cual ha sido unido al fondo de cada pocillo. Tras la correcta adición de reactivos, estándares y muestras, se dio la interacción RAGE-antiRAGE y luego de las correspondientes incubaciones y lavados, se procedió a leer la densidad óptica del complejo formado en un lector de microplacas ajustado a 450 nm. Siendo la concentración de RAGE, directamente proporcional a la intensidad del color desarrollado por el complejo RAGE-sustrato. A continuación, se describe la técnica empleada.

Previo al ensayo todos los reactivos y muestras fueron llevados a temperatura ambiente.

1. Se prepararon todos los reactivos y estándares de trabajo de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
2. Se añadieron 100  $\mu$ L de diluyente de ensayo RD1-60 a cada pocillo.
3. Se colocaron 50  $\mu$ L de estándar, control o muestra, a los pocillos correspondientes y se cubrió la placa por la parte superior con la tira con una tira plástica. Posteriormente se procedió a incubar durante 2 horas a temperatura ambiente.
4. Tras el periodo de incubación se aspiró el contenido de todos los pocillos y se lavaron con la solución tampón, enseguida se vaciaron nuevamente todos los pocillos. Se repitió este paso hasta completar 4 lavados y eliminar cualquier resto de solución tampón.
5. Se dispensaron 200  $\mu$ L de conjugado RAGE a cada pocillo, nuevamente se cubrió con una tira plástica y se incubó a temperatura ambiente durante otras 2 horas.
6. Se repitió completamente el paso 4.

7. Se adicionaron 200  $\mu$ L de solución sustrato a todos los pocillos y se incubó la placa durante 30 minutos a temperatura ambiente, pero en esta ocasión se protegió de la luz.
8. Se agregaron 50  $\mu$ L de solución de paro a cada pocillo y se mezcló suavemente. El color del contenido de los pocillos cambió de azul a amarillo.
9. Se determinó la densidad óptica de cada pocillo en un periodo de tiempo no mayor a 30 minutos tras la tercera incubación, para lo cual se empleó un lector de microplacas ajustado a 450 nm, se realizó corrección de lectura a 540 o 570 nm.

Para el cálculo de la concentración de RAGE se sustrajo la absorbancia del estándar de concentración 0 pg/mL al resto de los estándares y a todas las muestras. Posteriormente se construyó un gráfico de regresión lineal log-log con la absorbancia de los estándares en el eje Y vs la concentración de los mismos en el eje X, se obtuvo la ecuación de la recta y con ella se calculó la concentración de RAGE de cada muestra.

#### *VII.3.2.2 Medición de marcadores de proceso inflamatorio crónico*

Se determinaron las concentraciones de IL-1 $\beta$ , IL-12p70, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$  en un citómetro de flujo marca FACSAria de Beckton-Dickinson México, usando un estuche comercial de la misma marca (BD CBA Human Inflammatory Cytokines Kit, cat. 551811). Para ello se emplea una mezcla de seis perlas de captura, cada una conjugada con un anticuerpo específico para cada citocina mencionada y al que también se ha unido un compuesto fluorescente (ficoeritrina). Cuando se la mezcla de perlas y un reactivo de detección son incubadas con una muestra que contenga alguna de las citocinas, se forma un complejo que puede ser medido usando citometría de flujo para identificar las partículas con fluorescencia, cuya señal es directamente proporcional a la cantidad de analito (citocina) unido a la perla de captura. Durante la medición, se prepararon los estándares y las muestras de acuerdo con el inserto, posteriormente se llevaron al citómetro. Los resultados se analizaron mediante el uso de FCAP array software.<sup>147</sup>

La metodología empleada se describe a continuación.

1. Se reconstituyeron todos los reactivos y estándares con los diluyentes correspondientes, se mezclaron gentilmente y se mantuvieron en reposo hasta alcanzar la temperatura ambiente.
2. Se marcaron 8 tubos para la curva estándar y se prepararon diluciones de manera serial, de acuerdo con el siguiente orden: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 y 1:256, transfiriendo

300  $\mu\text{L}$  de la solución madre a cada tubo marcado, a los cuales previamente se les habían depositado 300  $\mu\text{L}$  de diluyente. Además, en un tubo extra se depositaron únicamente 300  $\mu\text{L}$  de diluyente, mismo que sirvió como control negativo (0 pg/mL).

3. Se calculó la cantidad necesaria de perlas para cada análisis, considerando el número de muestras y estándares, posteriormente se tomaron las cantidades correspondientes de cada perla y se realizó la mezcla, agitando vigorosamente antes y después de adicionar cada perla a la mezcla.
4. Se centrifugó la mezcla de perlas a 2500 rpm durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y el resto se dejó reposar durante 30 minutos protegido de la luz.
5. Se mezcló vigorosamente la mezcla de perlas y se depositaron 25  $\mu\text{L}$  de la misma dentro de cada tubo de ensayo.
6. Se añadieron 25  $\mu\text{L}$  de cada uno de los estándares en los tubos correspondientes.
7. Se adicionaron 25  $\mu\text{L}$  de cada muestra en el respectivo tubo de ensayo.
8. Se incubó durante 1.5 horas a temperatura ambiente, protegiendo todos los tubos de la luz.
9. Se adicionaron 500  $\mu\text{L}$  de solución buffer de lavado a cada tubo de ensayo y se centrifugó a 2500 rpm durante 5 min, se aspiró cuidadosamente el sobrenadante y se descartó.
10. Se agregaron 25  $\mu\text{L}$  de reactivo de detección (ficoeritrina) a cada tubo y nuevamente se incubó durante 1.5 horas a temperatura ambiente, cuidando de proteger los tubos de ensayo de la luz.
11. Se repitió el paso 9 con todas las muestras y el contenido restante se transfirió a tubos para citómetro (Falcon), diluyendo con 150  $\mu\text{L}$  de solución buffer de lavado.
12. Se resuspendió cuidadosamente el contenido de cada tubo y se llevó al citómetro de flujo para realizar la lectura.

Para el cálculo de la concentración de cada citocina se empleó el software FCAP Array.

Otro marcador de proceso inflamatorio medido fue la proteína C reactiva (PCR). Para ello se emplearon partículas recubiertas con anticuerpos anti-PCR humana, las cuales fueron aglutinadas por moléculas de PCR presentes en las muestras de suero analizadas. Dado que la aglutinación provoca cambios en la absorbancia de manera proporcional a la concentración de PCR y tras comparar con un calibrador, fue posible determinar la concentración exacta de la proteína. La prueba se realizó en el equipo automatizado Selectra Junior, bajo principio turbidimétrico, usando un estuche comercial de Spinreact S.A. (CRP TURBI 1107101L).

### VII.3.2.3 Medición de marcadores de estrés oxidativo

#### Sistema antioxidante

Se emplearon muestras de plasma y sangre total con heparina para medir la capacidad antioxidante total y la actividad de las enzimas antioxidantes (SOD y GPx) por métodos cinéticos colorimétricos, empleando estuches comerciales de Randox Laboratories, Ltd.

- ❖ Actividad de la superóxido dismutasa. Para la medir la actividad de esta enzima se empleó un estuche comercial (Ransod, Randox Laboratories Ltd, UK), cuyo método se basa en el trabajo realizado por Mc Cord y Fridovich, el cual hace uso de xantina y xantina oxidasa (XOD) para formar radicales superóxido:<sup>148</sup>



Posteriormente, los radicales superóxido formados reaccionan con cloruro de 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolio (I.N.T.) para formar un colorante formazán rojo:



Se mide la actividad de la SOD por el grado de inhibición de la siguiente reacción:



Para el ensayo se tomaron 500  $\mu\text{L}$  de sangre total heparinizada y se lavaron los eritrocitos con solución salina isotónica, posteriormente al botón de eritrocitos lavados se adicionaron 2 mL de agua bidestilada fría para provocar lisis celular, enseguida se diluyeron con 1.9 mL de tampón fosfato 0.01 mmol/L pH 7.0 (Sigma Chemical Co.). De la dilución se pipetearon 30  $\mu\text{L}$  y fueron colocados en baño María a 37°C, se adicionaron 1 mL de sustrato mixto (xantina 0.05 mmol/L, I.N.T. 0.025 mmol/L) y 150  $\mu\text{L}$  de xantina oxidasa (0.94 mmol/L), ambos previamente colocados en el baño a 37°C, se mezcló y se disparó el cronómetro para registrar la absorbancia A1 tras 30 segundos de la reacción y se leyó la absorbancia final A2 transcurridos 3 minutos más, a 505 nm; se calculó la diferencia de las absorbancias así como el delta por minuto. Se empleó un blanco de reacción, para lo cual se pipetearon 30  $\mu\text{L}$  de agua destilada y se siguió el mismo procedimiento que con los 30  $\mu\text{L}$  pipeteados a partir de la dilución con tampón fosfato. Para calcular el porcentaje de inhibición de la enzima se empleó el siguiente cálculo:

$$100 - \left( \frac{\text{delta} / \text{min muestra} * 100}{\text{delta} / \text{min blanco}} \right) = \% \text{ de inhibición.}$$

Para obtener la actividad de la SOD en UI/L se extrapolaron los porcentajes de inhibición en la siguiente ecuación de la recta de calibración:

$$\text{Actividad de la SOD} = [1.21 + (0.01 * \% \text{ de inhibición})] * 100$$

- ❖ Actividad de la glutatión peroxidasa (GPx), se empleó el método basado en el trabajo de Plagia y Valentine así como reactivos del estuche comercial Ransel, (Randox Laboratories Ltd).<sup>149</sup>

La GPx cataliza la oxidación del glutatión (GSH) por el hidroperóxido de cumeno.



El glutatión oxidado (GSSG) en presencia de glutatión reductasa (GR) y NADPH es inmediatamente convertido en su forma reducida con una oxidación concomitante de NADPH en NADP+. Se mide la disminución de la absorbancia a 340 nm.



Para la prueba se diluyeron 50 µL de sangre total heparinizada en 1 mL de solución diluyente (Randox Laboratories Ltd) y se incubó por 5 minutos, enseguida se adicionó 1 mL de reactivo de Drabkin a doble concentración (Sigma Chemical Co.), posteriormente se pipetearon 20 µL de la dilución y se colocaron en baño María a 37°C, se agregó 1 mL del reactivo de trabajo (glutatión 4 mmol/L, glutatión reductasa ≥ 0.5 U/L y NADPH 0.34 mmol/L), previamente colocado en el baño a 37°C, luego se adicionaron 40 µL del reactivo de cumeno (hidroperóxido de cumeno 0.18 mmol/L) bien agitado, se mezcló y simultáneamente se inició el cronómetro. Se registró la absorbancia A1 trascurrido 1 minuto, la A2 tras 2 minutos y la A3 después de 3 minutos del inicio de la reacción, a una longitud de onda de 340 nm. Para el blanco de reacción se pipetearon 20 µL de agua destilada y se siguió el mismo procedimiento que con los 20 µL de la dilución con muestras de pacientes. Se calcularon los deltas de absorbancia (Δ= A1 – A3) y se procedió a calcular la actividad de la enzima mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad GPx UI/L} = (\Delta \text{muestra} - \Delta \text{blanco}) * 8412 \text{ U/L} * 41$$

- ❖ Razón SOD/GPx: Se calculó como cociente entre la actividad de la SOD y la actividad de la GPx, en UI/L.
- ❖ Capacidad antioxidante total (CAT). Para esta prueba se hizo uso de un estuche comercial (Total antioxidant status, Randox Laboratories Ltd). Se trata de una prueba donde se combinan peroxidasa (metamioglobina) con peróxido de hidrógeno y ABTS (2,2'-azido-di etilbenzotiazolinsulfonato), que resultan en la formación de radical catión ABTS<sup>+</sup>. Dicho radical presenta una coloración verde azulada, la presencia de antioxidantes en la muestra produce la supresión de esta coloración, siendo ésta proporcional a la concentración de antioxidantes.<sup>150</sup>

Para la determinación se pipetearon 20 µL de plasma, 20 µL de agua destilada para ser usada como blanco y 20 µL de estándar (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroma - ácido carboxílico, concentración indicada en el estuche), en 3 tubos diferentes y se colocaron en baño María a 37°C, se adicionó a cada tubo 1 mL de cromógeno (metamioglobina 6.1 mmol/L, ABTS 610 mmol/L), se mezcló y se pasó a la celda para registrar la absorbancia A1 a 600 nm; posteriormente se adicionaron 200 µL de sustrato (peróxido de hidrógeno 250 mmol/L), se disparó el cronómetro y se mezcló para luego leer la absorbancia A2 transcurridos exactamente 3 minutos. Se calcularon los deltas de las absorbancias (A2-A1) y también se hizo el cálculo del factor empleando la siguiente ecuación:

$$\text{Factor} = \frac{\text{concentración del estándar}}{(\text{delta del blanco} - \text{delta del estándar})}$$

Por último, se calculó la concentración de antioxidantes en mmol/L con la siguiente ecuación:

$$\text{Aox mmol/L} = \text{Factor} + (\Delta\text{blanco} - \Delta\text{muestra})$$

La cinética de todas las reacciones se midió con un espectrofotómetro Shimadzu UV-1601 UV-Vis.

- ❖ Brecha antioxidante o GAP. Esta se define como los antioxidantes diferentes de albúmina y ácido úrico, no medidos en las técnicas para la determinación de antioxidantes totales. Se calcula a partir de la CAT en µmol/L y las concentraciones de albúmina y ácido úrico en las mismas unidades. Para ello se empleó la siguiente ecuación:<sup>41</sup>

$$\text{GAP} = [\text{CAT} - [\text{albúmina} (\mu\text{mol/L}) + \text{ácido úrico} (\mu\text{mol/L})]]$$

❖ **Medición de Isoprostanos como marcador pro-oxidante**

Se emplearon muestras de plasma con EDTA para la cuantificación de los isoprostanos mediante ensayo inmunoenzimático, empleando estuche comercial (8-isoprostane EIA kit 515351) de Cayman Chemical Company.

La prueba se basa en la competencia entre el 8-isoprostano y la 8-isoprostano-acetilcolinesterasa (AChE) conjugada (8-isoprostano trazador) ante un limitado número de sitios de unión de antisuero de conejo específico para 8-isoprostano, éste último se une a un anticuerpo monoclonal que ha sido previamente unido al pozo. Se realiza un lavado con solución tampón para remover todo reactivo no unido y posteriormente se agrega el reactivo de Ellman que contiene al sustrato de la AChE. El producto de esta reacción enzimática es un compuesto de color amarillo, cuya máxima absorción se da a 412 nm. La intensidad del color es es proporcional a la cantidad de 8-isoprostano trazador unido a el pozo, el cual es inversamente proporcional a la cantidad de 8-isoprostano libre presente en la muestra analizada.

El ensayo se realizó en varias etapas: purificación de la muestra, preparación de la curva estándar, adición de reactivos a la placa, incubación, desarrollo y lectura de la placa. A continuación, se describe la metodología utilizada.

**Purificación de la muestra.**

Se transfirió el absorbente a un tubo limpio y seco, se centrifugo a 1500 x G durante 3 minutos, posteriormente, se removió el sobrenadante, se adicionó buffer de columna al absorbente en una relación 1:4 y se mezcló cuidadosamente, luego se centrifugó nuevamente y se descartó el sobrenadante, esta operación se repitió hasta completar un total de 4 repeticiones. Se resuspendió el absorbente con un volumen equivalente de buffer de columna.

Se alicuotó 1mL de muestra en un tubo eppendorf y se agregaron 80 µL del absorbente previamente lavado y agitado, se mezcló suavemente por 45 minutos y pasado este tiempo se centrifugaron las muestras a 1500 x G por 5 minutos, con ayuda de una pipeta se removió cuidadosamente el sobrenadante, conservando el absorbente ya que a éste se ha unido el 8-isoprostano. Se lavó el absorbente con 1mL de buffer de columna, se centrifugó nuevamente y se descartó el sobrenadante, posteriormente se lavó el absorbente con 1mL de agua ultrapura, se centrifugó y se descartó el sobrenadante. Para extraer el 8-isoprostano del absorbente, se resuspendió el botón en 0.5 mL de solución de elución (EtOH/H<sub>2</sub>O 95:5), se agitó brevemente y se centrifugó. Después se transfirió

cuidadosamente el sobrenadante a un tubo limpio y seco. Esta acción se repitió una segunda vez combinando ambas eluciones en un mismo tubo de muestra. Se almacenaron las muestras a  $-80^{\circ}\text{C}$  (bajo estas condiciones las muestras son estables por 1 año), hasta la realización del ensayo. Previo a la realización del ensayo, las muestras se secaron bajo corriente de nitrógeno y posteriormente, se resuspendieron en  $150\ \mu\text{L}$  de buffer EIA

#### Preparación de la curva estándar.

Se equilibró la punta de una pipeta llenado y expulsando etanol en repetidas ocasiones. Con la punta equilibrada se transfirieron  $100\ \mu\text{L}$  del estándar de 8-isoprostanos a un tubo limpio, luego se diluyó con  $900\ \mu\text{L}$  de agua ultrapura, obteniendo una solución a concentración de  $5\ \text{ng/mL}$ . En 8 tubos numerados (#1 al #8) se dispensó buffer EIA:  $900\ \mu\text{L}$  en el tubo #1 y  $750\ \mu\text{L}$  en los tubos #2 a #8. Se transfirieron  $100\ \mu\text{L}$  estándar ( $5\ \text{ng/mL}$ ) al tubo #1 y se mezcló cuidadosamente, obteniendo una concentración  $500\ \text{pg/mL}$  en el primer punto de la curva. Posteriormente se hicieron diluciones de manera seriada, tomando  $500\ \mu\text{L}$  del tubo #1 y transfiriéndolos al tubo #2, después se tomaron  $500\ \mu\text{L}$  del tubo #2 y se transfirieron al tubo #3, se repitió este proceso hasta llegar al tubo #8, mezclando completamente tras cada adición. Se obtuvieron las siguientes concentraciones:  $500\ \text{pg/mL}$ ,  $200\ \text{pg/mL}$ ,  $80\ \text{pg/mL}$ ,  $32\ \text{pg/mL}$ ,  $12.8\ \text{pg/mL}$ ,  $5.1\ \text{pg/mL}$ ,  $2.0\ \text{pg/mL}$  y  $0.8\ \text{pg/mL}$ .

#### Adición de reactivos

Se adicionaron los reactivos de acuerdo con la plantilla de Cayman Chemical. Se colocaron  $100\ \mu\text{L}$  de buffer EIA al pozo de unión no específica (NSB) y  $50\ \mu\text{L}$  de buffer EIA al pozo de unión máxima (Bo). Se dispensaron  $50\ \mu\text{L}$  de cada tubo de la curva estándar a los pozos correspondientes, empezando por el tubo de menor concentración (tubo #8) al tubo de mayor concentración (tubo #1) de manera descendente, la curva se realizó por duplicado. Posteriormente se agregaron  $50\ \mu\text{L}$  de muestra por pozo (cada muestra fue analizada por duplicado), se adicionaron  $50\ \mu\text{L}$  del trazador de 8-isoprostanos en todos los pozos excepto en el de actividad total (TA) y el blanco (Blk), después se alicuotaron  $50\ \mu\text{L}$  del antisuero de 8-isoprostano para todos los pozos excepto para el de actividad total, el de unión no específica (NSB) y el blanco (Blk). Se cubrió la placa con una cubierta plástica y se incubó por 18 horas a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Transcurrido el tiempo de incubación se vaciaron completamente los pozos y se lavaron 5 veces con solución buffer de lavado, enseguida se adicionaron  $200\ \mu\text{L}$  del reactivo de Ellman en todos los pozos, se agregaron  $5\ \mu\text{L}$  de trazador al pozo de actividad total y se cubrió con una cubierta plástica, la placa se desarrolló a temperatura ambiente, protegida de la luz y con agitación muy suave durante 90

minutos. Tras el desarrollo de la placa, se limpió la base de la misma y se retiró cuidadosamente la cubierta plástica, se procedió a leer la placa a una absorbancia entre 405 y 420 nm en un espectrofotómetro para microplacas Thermoscientific™ Multiskan Go, la absorbancia fue leída cuando los pozos  $B_0$  estaban en un rango de 0.3-1.0 A.U (considerando sustracción de blanco). Si la absorbancia de  $B_0$  se encontraba por encima de 2.0 se procedía a re-desarrollar la placa, según las instrucciones de Cayman Chemical.

Para obtener las concentraciones se construyó la curva estándar de la razón  $B/B_0$  (eje Y) vs la concentración de los estándares (eje X), y se interpoló dando el mismo tratamiento al promedio de las absorbancias crudas de las muestras.

### *VII.3.3. Cuantificación del contenido de ácido alfa lipoico en las cápsulas administradas*

De manera paralela al seguimiento de los participantes se trabajó en el diseño, desarrollo y validación de un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución por fase reversa, el cual permitió la cuantificación de ácido alfa lipoico en las cápsulas que recibieron los voluntarios, esto para tener la certeza en cuanto a la dosis.

Para validar el método analítico que permitió cuantificar ácido alfa lipoico en cápsulas se evaluaron los siguientes parámetros:

- ❖ **Linealidad.** Habilidad del método analítico para demostrar que los resultados obtenidos son proporcionales a la concentración del analito en la muestra.
- ❖ **Exactitud.** Expresa el grado de concordancia entre el valor que se acepta ya sea como un valor verdadero convencional o aceptado como un valor de referencia y el valor encontrado.
- ❖ **Precisión.** Expresa el grado de concordancia entre una serie de mediciones obtenidas a partir de un muestreo múltiple de la misma muestra en las condiciones establecidas. Se puede considerar en 3 niveles: 1) repetibilidad, 2) precisión intermedia y 3) reproducibilidad
- ❖ **Especificidad.** Capacidad de evaluar inequívocamente al analito aún en presencia de otros componentes tales como impurezas, productos de degradación y componentes de la matriz.

A continuación, se detalla la metodología realizada para evaluar cada parámetro de la validación, así como para la cuantificación del contenido de las cápsulas y la uniformidad de dosis.

#### *VII.3.3.1 Linealidad del método analítico para determinación de AAL en cápsulas*

Se pesaron 100 mg de estándar de ácido alfa lipoico (Sigma Aldrich CAS 1077-28-7) y se disolvieron en 30 mL de metanol RA (J.T. Baker 9070-1) dentro de un matraz volumétrico de 100 mL, posteriormente se llevó al aforo con la mezcla de disolventes empleada como fase móvil (metanol/buffer de acetatos 0.01M pH=4 en proporción 60:40), obteniendo una solución stock a una concentración de 1 mg/mL. A partir de dicha solución se prepararon 5 disoluciones de la siguiente manera:

Se tomó una alícuota de 1 mL y se depositó en un matraz volumétrico de 10 mL, se llevó al aforo con fase móvil, la concentración final fue de 100 µg/mL. Las siguientes 4 disoluciones se prepararon tomando alícuotas de 2 mL, 3 mL, 4 mL y 5 mL, respectivamente, cada alícuota fue depositada en un matraz volumétrico de 10 mL y en todos los casos se aforó con fase móvil, obteniéndose así 5 diferentes concentraciones: 100 µg/mL, 200 µg/mL, 300 µg/mL, 400 µg/mL y 500 µg/mL.

De cada solución se inyectaron 50 µL en el cromatógrafo Varian Prostar bajo las siguientes condiciones:

- Fase móvil: metanol/buffer de acetatos pH=4 (60:40)
- Velocidad de flujo: 1 mL/minuto
- Temperatura ambiente
- Tiempo de retención: 1,2 minutos
- Tiempo de corrida: 10 minutos
- $\lambda$  detector: 336 nm

La separación fue realizada en una columna Hypersil Gold C18, 150 mm x 4.5 mm y 5 µm de tamaño de partícula (ThermoScientific™). Se obtuvo el área bajo la curva (mAU) de cada concentración, así como la ecuación de la recta y el coeficiente de variación.

### *VII.3.3.2 Precisión/repetibilidad y exactitud del método analítico para determinación de AAL en cápsulas*

Se preparó una mezcla de placebo con una cantidad de AAL correspondiente al 100% de éste en la muestra, respetando las proporciones según el contenido de cada cápsula. De la mezcla de polvo se pesaron por sextuplicado 100 mg que fueron disueltos con 30 mL de metanol RA en un matraz volumétrico de 100 mL y se llevó al aforo con fase móvil. Posteriormente se filtraron 50 mL de la solución a través de un filtro de nylon de 0,22  $\mu$  de tamaño de poro.

Del filtrado se tomó una alícuota de 5 mL y se depositó en un matraz volumétrico de 10 mL, se llevó al aforo con fase móvil, se inyectó al cromatógrafo bajo las mismas condiciones establecidas para la evaluación de linealidad y se obtuvo el área bajo la curva de cada cromatograma. Se calcularon los porcentajes de recobro, la media aritmética, desviación estándar y coeficiente de variación. Se prepararon mezclas de placebo con una cantidad adicionada de AAL correspondientes al 80%, 90%, 110% y 120% de éste en la muestra. Para cada caso se procedió de la misma manera que con el nivel al 100% de la muestra, se obtuvieron las áreas bajo la curva y se calcularon los porcentajes de recobro, la media aritmética, desviación estándar y coeficiente de variación.

### *VII.3.3.3 Especificidad del método analítico para la determinación de AAL en cápsulas*

Se pesaron exactamente 60 mg de AAL, se disolvieron en un matraz volumétrico de 100 mL con 50 mL de metanol RA y se llevó al aforo con buffer de acetatos pH=4. Se tomó una alícuota de 5 mL y se depositó en un matraz volumétrico de 10 mL, se aforó con una mezcla metanol/buffer (50:50) y se inyectó al cromatógrafo bajo las condiciones descritas para evaluar linealidad.

Se abrieron 3 cápsulas de AAL y se mezcló el contenido de las 3, de la mezcla de polvos se pesaron 100 mg que fueron depositados en un matraz de 100 mL y disueltos con 50 mL de metanol RA, se aforó con buffer de acetatos pH=4. De la solución se filtraron 50 mL a través de un filtro de nylon de 0,22  $\mu$  de tamaño de poro y del filtrado se tomó una alícuota de 5 mL que se depositó en un matraz volumétrico de 10 mL y se aforó con la mezcla metanol/buffer (50:50), se inyectó al cromatógrafo y se obtuvo el área bajo la curva. Se preparó una mezcla de placebo con AAL cuya cantidad correspondiera al 100% de éste en la muestra, se pesaron 100 mg y procedió de la misma manera que con la muestra anterior. Finalmente se pesaron 100 mg de placebo y dio el mismo tratamiento que a las cápsulas de AAL.

#### *VII.3.3.4 Cuantificación de AAL en cápsulas*

Se pesaron individualmente 10 cápsulas muestreadas al azar, se vació el contenido de las cápsulas y se pesó nuevamente la cápsula vacía para obtener el contenido de cada cápsula por diferencia de masas. Del contenido de cada cápsula se pesaron 100 mg, se depositaron en un matraz volumétrico de 100 mL y se disolvieron con 30 mL de metanol RA, posteriormente se aforó con fase móvil. De la solución se filtraron 50 mL a través de un filtro de nylon de 0,22  $\mu$  de tamaño de poro (Millipore MPGL04001), y del filtrado se tomó una alícuota de 5 mL, la cual fue depositada en un matraz de 10 mL y se aforó con fase móvil, se inyectó al cromatógrafo y se obtuvo el área bajo la curva.

Una vez realizado el mismo procedimiento para las 10 cápsulas, se calculó la media, desviación estándar y coeficiente de variación.

#### *VII.3.3.5 Uniformidad de contenido del AAL en las cápsulas*

Se seleccionaron y pesaron individualmente 10 cápsulas muestreadas aleatoriamente, se vació el contenido y se pesó la cápsula vacía, posteriormente se mezcló el contenido de las 10 cápsulas y se tomaron 10 muestras de 100 mg de polvo cada una y se procedió a disolver cada muestra con 30 mL de metanol RA en un matraz volumétrico de 100 mL y se aforó con fase móvil, enseguida se filtraron 50 mL de la solución a través de filtro de nylon de 0,22  $\mu$  de tamaño de poro y del filtrado se tomó una alícuota de 5 mL que fue depositada en un matraz volumétrico de 10 mL y se aforó con fase móvil. Se inyectaron todas las muestras al cromatógrafo, se obtuvo el área bajo la curva y se calcularon media, desviación estándar y coeficiente de variación.

En los cuadros VII.2 a VII.4 se observan los resultados generales de la validación del método analítico desarrollado, así como la uniformidad de dosis y de contenido de las cápsulas.

**Cuadro VII.2** Resultados generales de la validación del método analítico para la determinación en cápsulas.

Parámetro evaluado	Intervalo de aceptación	Resultados obtenidos	Cumple
Linealidad	$r^2 \geq 0.98$ $m \neq 0$ $b = 0$	$r^2 = 0.998$	✓
		$m = 0.06013$	✓
		$b = -0.88$	✓
Precisión Repetibilidad	$C.V. \leq 2$	80% = 1.22	
		90% = 1.91	
		100% = 0.58	✓
		110% = 1.16	
		120% = 1.48	
Exactitud	$C.V. \leq 2$	1,36	✓
Especificidad	Respuesta del analito= + Respuesta del placebo= - Respuesta de analito+placebo= +	Respuesta del analito= + Respuesta de placebo= - Respuesta de analito+placebo= +	✓

**Cuadro VII.3** Resultados de la cuantificación de ácido alfa lipoico en las cápsulas.

Muestra (No. Cápsula)	mAU	CONTENIDO AAL/cap (mg)	
1	16.4	296.99	<b>DS=1.44</b> <b>CV=0.48</b>
2	16.5	298.49	
3	16.7	301.5	
4	16.4	296.99	
5	16.8	303	
6	16.6	300	
7	17	306.01	
8	17.2	309.02	
9	16.3	295.49	
10	16.5	298.49	
	<b>MEDIA</b>	<b>300.6 mg</b>	

**Cuadro VII.4** Resultados de la uniformidad de contenido de ácido alfa lipoico en las cápsulas.

Muestra	mAU	Contenido de AAL	
1	16.8	303	DS=3.19
2	16.6	300	CV=1.04
3	16.7	301.5	
4	16.5	298.49	
5	16.8	303	
6	17	306.01	
7	16.9	304.51	
8	17	306.01	
9	17.2	309.02	
10	17	306.01	
	<b>MEDIA</b>	<b>306,01 mg</b>	

De acuerdo con los resultados obtenidos, el método analítico desarrollado es lineal, exacto, preciso y específico. Además, los resultados de la cuantificación de AAL en las cápsulas muestran que el contenido oscila los 300 mg por cápsula, cumpliendo con lo declarado por el fabricante y garantizando que el contenido de las cápsulas es uniforme; por lo tanto, se tiene la certeza de que la dosis de AAL que recibieron los voluntarios fue la correcta.

#### VII.3.4. Cuantificación del contenido de AAL en muestras de plasma de los voluntarios

Se diseñó un método analítico para la cuantificación del AAL en muestras de plasma de los voluntarios, con la finalidad de saber si el compuesto era absorbido y alcanzaba las concentraciones a las cuales aparecen los efectos terapéuticos de dicho compuesto. La metodología empleada para este método analítico se describe a continuación.

##### VII.3.4.1 Linealidad, precisión y exactitud del sistema

Se pesaron 10 mg de estándar de ácido alfa lipoico (Sigma Aldrich CAS 1077-28-7) y se disolvieron en 10 mL de metanol RA (J.T. Baker 9070-1) dentro de un matraz volumétrico de 100 mL, posteriormente se llevó al aforo con una mezcla de metanol/buffer de acetatos pH=4 a una proporción 60:40 (fase

móvil), obteniendo una solución stock a una concentración de 100 µg/mL. A partir de dicha solución se prepararon 7 disoluciones de la siguiente manera:

Se tomó una alícuota de 1 mL y se diluyó con 50 mL de la mezcla metanol/buffer de acetatos en un matraz volumétrico de 100 mL, se llevó al aforo con la misma mezcla, obteniéndose una dilución cuya concentración fue de 1 µg/mL. Las siguientes 6 disoluciones se prepararon tomando alícuotas de 3 mL, 5 mL, 7 mL, 9 mL, 11 mL y 13 mL, respectivamente, cada alícuota fue depositada en un matraz volumétrico de 100mL que previamente contenían 50 mL de la mezcla metanol/buffer de acetatos y en todos los casos se aforó con dicha mezcla, obteniéndose así 7 diferentes concentraciones: 1 µg/mL, 3 µg/mL, 5 µg/mL, 7 µg/mL, 9 µg/mL, 11 µg/mL y 13 µg/mL. Además, se preparó un blanco con la fase móvil.

El blanco y las 7 disoluciones se prepararon por triplicado y posteriormente se inyectaron 50 µL de cada una en el cromatógrafo Knauer Smartline acoplado a un detector amperométrico de corriente directa (Recipe EC3000) y a un detector con arreglo de diodos UV-Visible Knauer bajo las siguientes condiciones:

- Fase móvil: metanol/buffer de acetatos pH=4 (60:40)
- Velocidad de flujo: 1 mL/minuto
- Temperatura: 25 °C
- Presión: 1500 psi
- Tiempo de retención: 1,2 minutos
- Tiempo de corrida: 7 minutos
- Detección:
  - UV:  $\lambda$  336nm
  - Electroquímica:  $\pm$  1000mV

La separación se llevó a cabo en una columna Hypersil Gold C18, 150 mm x 4.5 mm y 5 µm de tamaño de partícula (ThermoScientific™). Se obtuvo el área bajo la curva (mAU) de los tres puntos de cada nivel de concentración, se calcularon las medias aritméticas y el coeficiente de variación, asimismo se obtuvo la ecuación de la recta mediante análisis de regresión lineal para determinar la linealidad, exactitud y precisión del sistema.

#### *VII.3.4.2. Linealidad y exactitud del método analítico para la cuantificación de AAL en muestras de plasma*

Para la linealidad del método analítico muestra biológica se emplearon muestras de plasma obtenidas a partir de sangre total anticoagulada con EDTA de 3 individuos jóvenes y sanos. Las muestras de plasma fueron adicionadas con estándar de AAL para conseguir concentraciones iguales a las de la curva construida a partir de las soluciones estándar. Para ello se adicionaron 10  $\mu\text{L}$  de la solución stock a 990  $\mu\text{L}$  de plasma, se mezcló y se obtuvo 1 mL de plasma a concentración de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Para las siguientes concentraciones se mezclaron 30  $\mu\text{L}$ , 50  $\mu\text{L}$ , 70  $\mu\text{L}$ , 90  $\mu\text{L}$ , 110  $\mu\text{L}$  y 130  $\mu\text{L}$  de la solución stock con volúmenes de 970  $\mu\text{L}$ , 950  $\mu\text{L}$ , 930  $\mu\text{L}$ , 910  $\mu\text{L}$ , 890  $\mu\text{L}$  y 870  $\mu\text{L}$  de plasma respectivamente. Se preparó cada muestra por triplicado, obteniéndose las siguientes concentraciones: 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 9  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 11  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 13  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Se procedió a dar tratamiento a las muestras de la siguiente manera:

A 1 mL de cada muestra se adicionó 1 mL de acetonitrilo RA (Merck Millipore CAS 75-05-8) y se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min para precipitar las proteínas presentes en las muestras de plasma. Se separó el sobrenadante y se sometió a un proceso de extracción en fase sólida, para ello se utilizaron cartuchos C18 de 100 mg (Hypersep Thermo Scientific <sup>TM</sup>). Los cartuchos se acondicionaron adicionando 3 mL de metanol RA seguidos por 2 mL de agua y 2 mL de buffer de acetatos 0,01 M pH=4. El sobrenadante separado se transfirió a los cartuchos de extracción y se realizó un lavado con 3 mL de metanol RA, un segundo lavado fue realizado con 2 mL de solución buffer de acetatos 0,01 M pH=4. El eluato resultante se evaporó a sequedad bajo corriente de nitrógeno a temperatura ambiente y el residuo fue reconstituido con 1 mL de la fase móvil (metanol/ buffer de acetatos 0,01 M pH=4); posteriormente se inyectaron 50  $\mu\text{L}$  de cada muestra tratada al cromatógrafo, acompañadas del respectivo blanco, bajo las mismas condiciones que las soluciones estándar.

Se obtuvo el área bajo la curva y se calcularon los porcentajes de recobro, la media aritmética, desviación estándar y coeficiente de variación de cada nivel de concentración, datos con los cuales se determinó la exactitud del método. Mediante análisis de regresión lineal se determinó la linealidad del método analítico, obteniéndose la ecuación de la recta.

#### *VII.3.4.3 Precisión/repetibilidad del método analítico para cuantificación de AAL en muestras de plasma*

Se adicionaron muestras de plasma de voluntarios sanos con estándar de AAL a concentraciones de 3 µg/mL, 5 µg/mL y 7 µg/mL. Las tres concentraciones fueron preparadas por sextuplicado. Todas las muestras fueron sometidas al mismo proceso de purificación y extracción en fase sólida que las empleadas para linealidad. Posteriormente se inyectaron 50 µL de cada muestra al cromatógrafo y se analizaron bajo las condiciones descritas para la determinación de linealidad; se calcularon la media aritmética, desviación estándar, coeficiente de variación y porcentaje de recobro, con estos datos se determinó la repetibilidad y precisión del método analítico.

#### *VII.3.4.4 Especificidad*

Se pesaron exactamente 10 mg del estándar de AAL y se disolvieron con 10 mL de metanol RA dentro de un matraz volumétrico de 100 mL, se llevó al aforo con fase móvil, alcanzando una concentración de 100 µg/mL. De esta disolución se tomó una alícuota de 5 mL y se depositó en un matraz volumétrico de 100 mL, se aforó con la fase móvil y se obtuvo una disolución a concentración de 5 µg/mL.

Se adicionaron 50 µL de una solución de estándar de AAL de concentración conocida (100 µg/mL) a 950 µL de una muestra de plasma para obtener una concentración de 5 µg/mL. La muestra fue purificada y sometida al proceso de extracción que ya ha sido descrito.

Una segunda muestra de plasma fue purificada y tratada de la misma forma que la anterior, sin embargo, esta segunda muestra no fue adicionada con estándar de AAL.

Se inyectaron al cromatógrafo 50 µL tanto de la solución estándar de AAL como de las dos muestras de plasma reconstituidas con fase móvil y se procedió a la separación cromatográfica bajo las mismas condiciones que se han empleado para todas las muestras.

#### *VII.3.4.5 Estabilidad*

Se pesaron con exactitud 10 mg del estándar de AAL y se disolvieron con 10 mL de metanol RA dentro de un matraz volumétrico de 100 mL y se llevó al aforo con fase móvil. De esta solución, se se tomaron alícuotas de 50 µL y se adicionaron a 950 µL de plasma para obtener una concentración de 5 µg/mL, lo anterior se repitió hasta obtener 14 muestras de plasma adicionadas con AAL. Se purificaron y sometieron a extracción en fase sólida 2 de las muestras, mismas que, posteriormente fueron

analizadas en el cromatógrafo. Las muestras restantes fueron almacenadas en grupos de 3 a las temperaturas siguientes: 25 °C, 4 °C, -20 °C y a -70 °C. Tras 24 horas, 72 horas y 7 días, respectivamente, se purificó una muestra de cada grupo y se inyectaron por duplicado en el cromatógrafo. Se calcularon los porcentajes de recobro y con ello se determinó la estabilidad de las muestras almacenadas.

#### *VII.3.3.6 Límite de cuantificación*

Se pesaron exactamente 10 mg de estándar de AAL y se disolvieron en 10 mL de metanol RA dentro de un matraz volumétrico de 100 mL, posteriormente se llevó al aforo con fase móvil, obteniendo una solución a concentración de 100 µg/mL. Se tomó una alícuota de 1 mL y se diluyó con 50 mL de fase móvil en un matraz volumétrico de 100 mL, se llevó al aforo con la misma mezcla, obteniéndose una dilución cuya concentración fue de 1 µg/mL. A partir de esta solución se prepararon 5 disoluciones, para lo cual se tomaron alícuotas de 2 mL, 4 mL, 6 mL, 8 mL y 10 mL, respectivamente, las cuales fueron depositadas dentro de matraces volumétricos de 100 mL que contenían 50 mL de fase móvil, se mezclaron y se llevó al aforo con la misma fase móvil. Las concentraciones finales de las 5 disoluciones fueron 0,020 µg/mL, 0,040 µg/mL, 0,060 µg/mL, 0,080 µg/mL y 1 µg/mL. Cada una de las soluciones fueron preparadas y analizadas por triplicado en el cromatógrafo bajo las mismas condiciones descritas con anterioridad.

Se calcularon las medias, desviaciones estándar, coeficientes de variación y los porcentajes de recobro para cada concentración y se encontró el límite de cuantificación del método analítico.

Los resultados generales de la validación del método analítico para la cuantificación de AAL en muestras de plasma se muestran en el cuadro VII.5

**Cuadro VII.5** Resultados generales de la validación del método analítico para cuantificación de ácido alfa lipoico en plasma.

Parámetro evaluado	Intervalo de aceptación	Resultados obtenidos	Cumple
<b>Especificidad</b>	Respuesta del estándar= + Respuesta de muestra= - Respuesta de muestra+estándar= +	Respuesta del analito= + Respuesta de muestra= - Respuesta de analito+placebo= +	✓
<b>Linealidad</b>	$r^2 \geq 0.98$ $m \neq 0$ $b=0$	$r^2= 0.9987$ $m= 32.26$ $b= 0.1884$	✓ ✓ ✓
<b>Precisión Repetibilidad</b>	$C.V \leq 2$	3 $\mu\text{g/mL} = 1.58$ 5 $\mu\text{g/mL} = 0.93$ 7 $\mu\text{g/mL} = 0.87$	✓
<b>Exactitud</b>	$C.V \leq 2$	$C.V= 1.79$	✓
<b>Estabilidad</b>	25 °C 4 °C -20 °C -70 °C	Inestable a las 24 horas Estable por 24 horas Estable por 7 días Estable por 7 días	<b>Muestras estables a -20 °C y -70 °C.</b>
<b>Límite de cuantificación</b>	Cantidad mínima de sustancia que puede ser cuantificada con fiabilidad por un método analítico determinado.	$C.V \leq 2$	<b>0,040 <math>\mu\text{g/mL}</math> <math>C.V = 1.78</math></b>

### VII.3.5 Cuantificación de AAL en las muestras de plasma

Las muestras de plasma de los participantes fueron obtenidas por venopunción en tubos al vacío con EDTA como anticoagulante, las muestras fueron alicuotadas en volúmenes de 1 mL y congeladas a -70 °C hasta su análisis. Para ello, todas las muestras fueron adicionadas con 1 mL de acetonitrilo RA y centrifugadas a 3000 rpm, se separó el sobrenadante y se depositó en los cartuchos de extracción en fase sólida. Tras los posteriores lavados con metanol y buffer de acetatos, los eluatos se secaron bajo corriente de nitrógeno, se reconstituyeron con 1 mL de fase móvil y se inyectaron al cromatógrafo, siguiendo las condiciones descritas para la validación del método. Se obtuvieron las áreas bajo la curva y se interpolaron en la curva estándar para obtener la cantidad de AAL contenida en cada muestra.

Posterior a la realización de las mediciones basales se procedió a la intervención y, tras 6 meses, se realizaron nuevamente todas las mediciones para evaluar el efecto de dicha intervención en los tres grupos de estudio.

#### **VII.4. Diseño estadístico**

Se efectuó el cálculo de las medidas descriptivas, frecuencias y porcentajes en las variables cualitativas; así como cálculo de la media y desviación estándar para variables cuantitativas. Una vez realizada la intervención, la comparación se realizó mediante las pruebas estadísticas de ANOVA de medidas repetidas, correlación y regresión lineal empleando un intervalo de confianza del 95%. Se consideró una prueba estadísticamente significativa aquella con valor de  $p < 0.05$ . El análisis estadístico fue realizado con el paquete estadístico SPSS versión 15.0.

#### **VII.5. Aspectos éticos y legales**

A todos los participantes, que en un inicio manifestaron interés en el proyecto, se les entregó un consentimiento informado (anexo 1) de acuerdo con lo que establece la declaración de Helsinki (Tokio 2004). Una vez que hubieron leído y comprendido en qué consistía el proyecto, los procedimientos a los que serían sometidos, así como los beneficios y posibles riesgos, firmaron dicho documento en presencia de dos testigos, aceptando así su participación en la investigación.

## VIII. RESULTADOS

En la figura VIII.1 se muestra la concentración sanguínea de AAL de los participantes en los grupos experimental (GE) (basal, 0.222 vs. post-tratamiento, 3.503), placebo (GP) (basal, 0.2 vs. post-tratamiento, 0.179) y control (GC) (basal, 0.202 vs. 6 meses, 0.197), en la que se observan diferencias estadísticamente significativas en el GE respecto a los GP y GC ( $p < 0.01$ ).

En el cuadro VIII.1 presentan los datos de índice de masa corporal, tensión arterial y estilos de vida de los grupos de estudio, en los cuales no se observan diferencias estadísticamente significativas después de seis meses de tratamiento.

Respecto a los parámetros bioquímicos se observó un incremento estadísticamente significativo en la concentración sanguínea de HDL en los GE y GP respecto al GC ( $p < 0.05$ ). También se encontró una disminución estadísticamente significativa en la concentración de colesterol total y ácido urico en el GP en comparación con los GE y GC ( $p < 0.05$ ), el resto de los parámetros bioquímicos no mostró cambios significativos (Cuadro VIII.2).

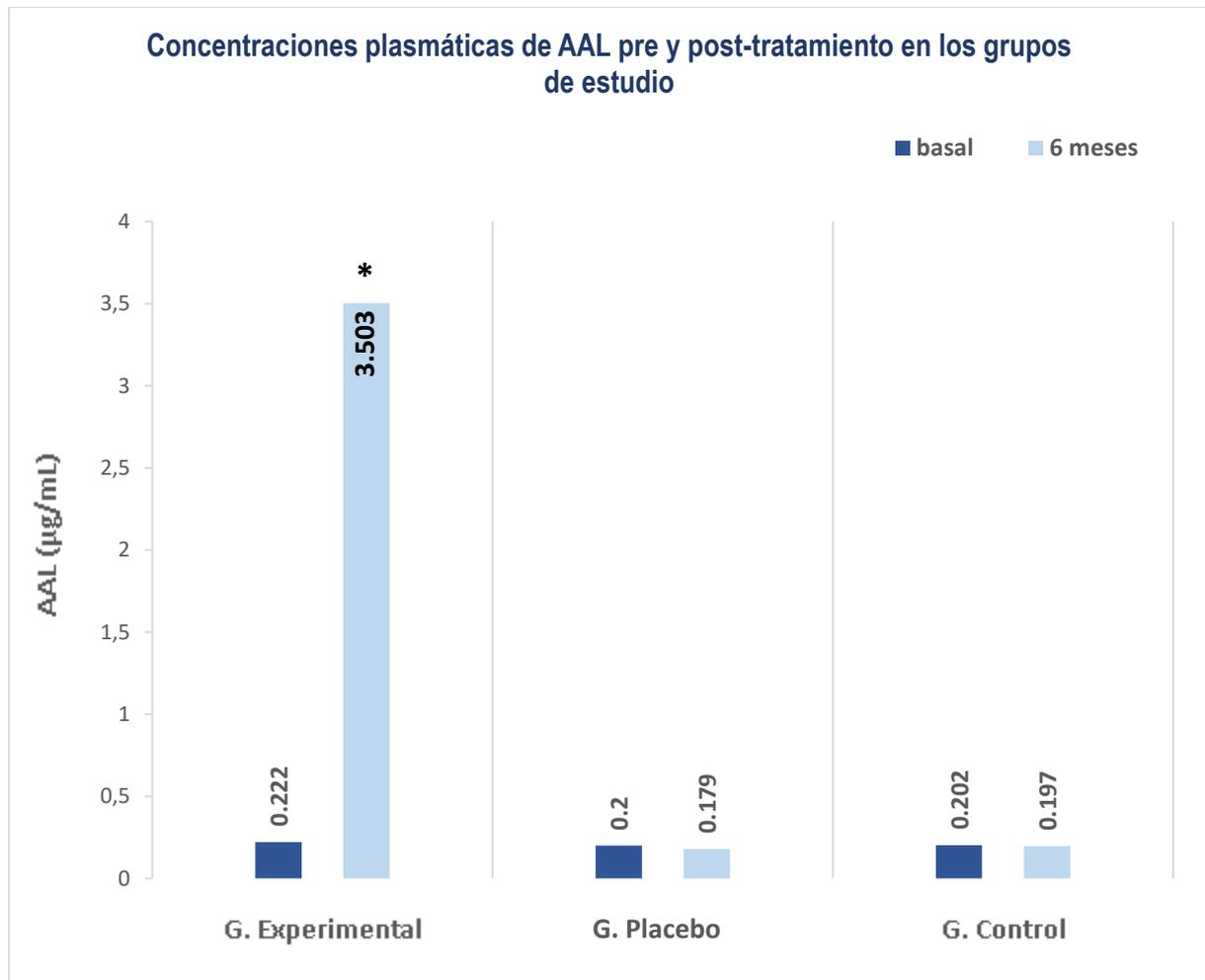
Por otro lado, los GE y GP mostraron una disminución estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) en la concentración sanguínea de 8-isoprostanos respecto al GC (GE: basal,  $100 \pm 3$  vs. post-tratamiento,  $57 \pm 3$ ; GP: basal,  $106 \pm$  vs. post-tratamiento,  $77 \pm 5$ ; GC: basal,  $94 \pm 10$  vs. 6 meses  $107 \pm 11$  pg/mL). También se observó una disminución estadísticamente significativa en la actividad de la SOD en el GC (basal,  $182 \pm 2$  vs. 6 meses,  $172 \pm 1$  UI/L,  $p < 0.05$ ) respecto a los GE (basal,  $178 \pm 1$  vs. post-tratamiento,  $177 \pm 1$  UI/L) y GP (basal,  $176 \pm 1$  vs. post-tratamiento,  $172 \pm 1$  UI/L). Asimismo, la actividad de la GPx mostró una disminución estadísticamente significativa en el GC (basal,  $9531 \pm 815$  vs. 6 meses,  $6223 \pm 613$  UI/L,  $p < 0.05$ ) en comparación con el GE (basal,  $8409 \pm 507$  vs. post-tratamiento,  $9694 \pm 458$  UI/L) y el GP (basal,  $8273 \pm 575$  vs. post-tratamiento,  $8691 \pm 355$  UI/L). Consecuentemente dichos cambios se reflejaron en un incremento estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ) de la razón SOD/GPx. La capacidad antioxidante total y la brecha antioxidante no mostraron diferencias estadísticamente significativas (Cuadro VIII.3).

Con relación al efecto del AAL sobre la HbA1c, se observó una disminución en el GE (basal, 8.9 vs. post-tratamiento, 8.6 HbA1c%) y en el GP (basal, 8.8 vs. post-tratamiento, 8.4 HbA1c%) en comparación con el GC (basal, 8.8 vs. 6 meses, 9.1 HbA1c%), aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ ) (Figura VIII.2). Asimismo, se encontró una disminución

estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) en la concentración de los RAGEs en el GE (basal, 1636 vs. post-tratamiento, 1144) y en el GP (basal, 1506 vs. post-tratamiento, 1016) en comparación con el GC (basal, 1407 vs. 6 meses, 1506) (Figura VIII.3).

Respecto a los marcadores pro-inflamatorios, en todos los parámetros evaluados el GC mostró un incremento estadísticamente significativo después de 6 meses ( $p < 0.05$ ) respecto a los GE y GP (Cuadro VIII.4).

Asimismo, se observó una correlación positiva entre la concentración sanguínea de AAL con la actividad de la SOD ( $r = 0.279$ ,  $p < 0.01$ ) y de la GPx ( $r = 0.249$ ,  $p < 0.05$ ), aunada a una correlación negativa con la concentración de 8-isoprostanos ( $r = -0.247$ ,  $p < 0.05$ ) (Cuadro VIII.5). También se encontró una correlación negativa entre la concentración sanguínea de AAL con IL12p70 ( $r = -0.220$ ,  $p < 0.05$ ), TNF $\alpha$  ( $r = -0.250$ ,  $p < 0.05$ ), IL6 ( $r = -0.249$ ,  $p < 0.05$ ) y IL1 $\beta$  ( $r = -0.329$ ,  $p < 0.01$ ) (Cuadro VIII.6).



ANOVA de medidas repetidas y Dunnet como post hoc \* $p < 0.01$

**Figura VIII.1.** Concentración plasmática de AAL pre y post-tratamiento en los los grupos de estudio. Se observa un aumento significativo en la concentración de AAL en el grupo experimental en comparación con los grupos placebo y control.

**Cuadro VIII.1** Índice de masa corporal, tensión arterial y estilos de vida pre y post-tratamiento en los grupos de estudio.

Variable	G. Experimental (n=42)		G. Placebo (n=38)		G. Control (n=28)	
	Basal	post-tratamiento	Basal	Post-tratamiento	Basal	6 meses
Edad (años)		63 ± 1		64 ± 1		66 ± 1
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	28.69 ± 0.64	28.32 ± 0.63	28.96 ± 1.03	28.83 ± 0.70	29.70 ± 0.98	29.44 ± 1.43
TAS (mmHg)	124 ± 3	126 ± 3	126 ± 3	127 ± 2	136 ± 3	136 ± 3
TAD (mmHg)	78 ± 2	77 ± 2	77 ± 2	77 ± 2	79 ± 2	81 ± 2
Tabaquismo (≥ 2 cigarros/día)	9 (21%)	9 (21%)	8 (21%)	8 (21%)	7 (25%)	6 (21%)
Ingestión de alcohol (≥ 2 copas/día)	3 (7%)	2 (5%)	2 (5%)	2 (5%)	1 (4%)	1 (4%)
Ingestión de cafeína (≥ 2 tazas/día)	18 (43%)	18 (43%)	17 (45%)	16 (42%)	12 (43%)	12 (43%)
Sedentarismo (≤ 30 min/día)	20 (48%)	22 (48%)	19 (50%)	20 (52%)	16 (57%)	15 (54%)

Abreviaturas: IMC: índice de masa corporal, TAS: tensión arterial sistólica, TAD: tensión arterial diastólica  
 Los datos presentados son media ± error estándar para variables cuantitativas y frecuencias (%) para cualitativas.

**Cuadro VIII.2** Parámetros bioquímicos pre y post-tratamiento en los grupos de estudio.

Variable	G. Experimental (n=42)		G. Placebo (n=38)		G. Control (n=28)	
	Basal	post-tratamiento	Basal	post-tratamiento	Basal	6 meses
Hb (g/dL)	14.1 ± 0.3	13.8 ± 0.3	13.8 ± 0.3	13.6 ± 0.3	14.4 ± 0.3	14.7 ± 0.3
Hto (%)	42 ± 1	41 ± 1	41 ± 1	40 ± 1	42 ± 1	42 ± 1
GR (x10 <sup>6</sup> cel/mm <sup>3</sup> )	4.9 ± 0.1	4.8 ± 0.1	4.7 ± 0.1	4.7 ± 0.1	4.8 ± 0.1	4.8 ± 0.1
GB (cel/mm <sup>3</sup> )	6686 ± 298	6592 ± 241	6518 ± 260	6595 ± 422	6692 ± 296	6560 ± 337
Glucosa (mg/dL)	156 ± 9	147 ± 8	153 ± 7	145 ± 8	149 ± 12	159 ± 13
Urea (mg/dL)	35 ± 2	35 ± 2	34 ± 2	35 ± 2	35 ± 2	35 ± 2
Creatinina (mg/dL)	0.65 ± 0.02	0.78 ± 0.03	0.64 ± 0.02	0.82 ± 0.03	0.70 ± 0.06	0.59 ± 0.07
Ácido úrico (mg/dL)	<b>4.4 ± 0.2</b>	<b>4.0 ± 0.2</b>	<b>4.8 ± 0.2</b>	<b>4.2 ± 0.2</b>	<b>4.1 ± 0.4</b>	<b>4.0 ± 0.2*</b>
Colesterol total (mg/dL)	<b>180 ± 8</b>	<b>180 ± 9</b>	<b>176 ± 7</b>	<b>158 ± 8</b>	<b>198 ± 10</b>	<b>215 ± 8*</b>
Triglicéridos (md/dL)	152 ± 12	145 ± 12	142 ± 11	155 ± 13	150 ± 15	161 ± 14
Colesterol-HDL (mg/dL)	<b>48 ± 1</b>	<b>54 ± 2</b>	<b>46 ± 2</b>	<b>51 ± 2</b>	<b>64 ± 2</b>	<b>58 ± 3*</b>
Albúmina (g/dL)	4.6 ± 0.1	4.6 ± 0.1	4.5 ± 0.1	4.6 ± 0.1	4.5 ± 0.1	4.5 ± 0.1

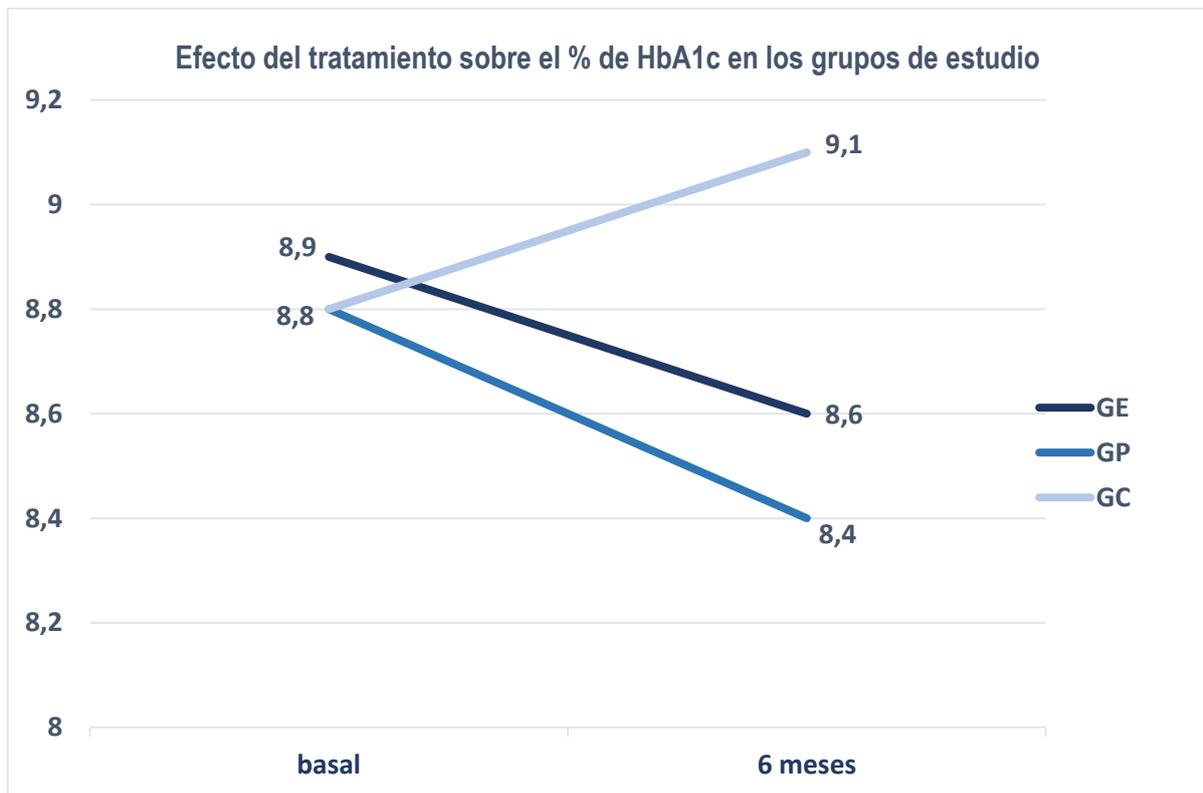
Abreviaturas: Hb: hemoglobina, Hto: hematocrito, GR: glóbulos rojos, GB: glóbulos blancos

Los datos presentados son media ± error estándar. ANOVA de medidas repetidas y Dunnet como post hoc. \* p<0.05

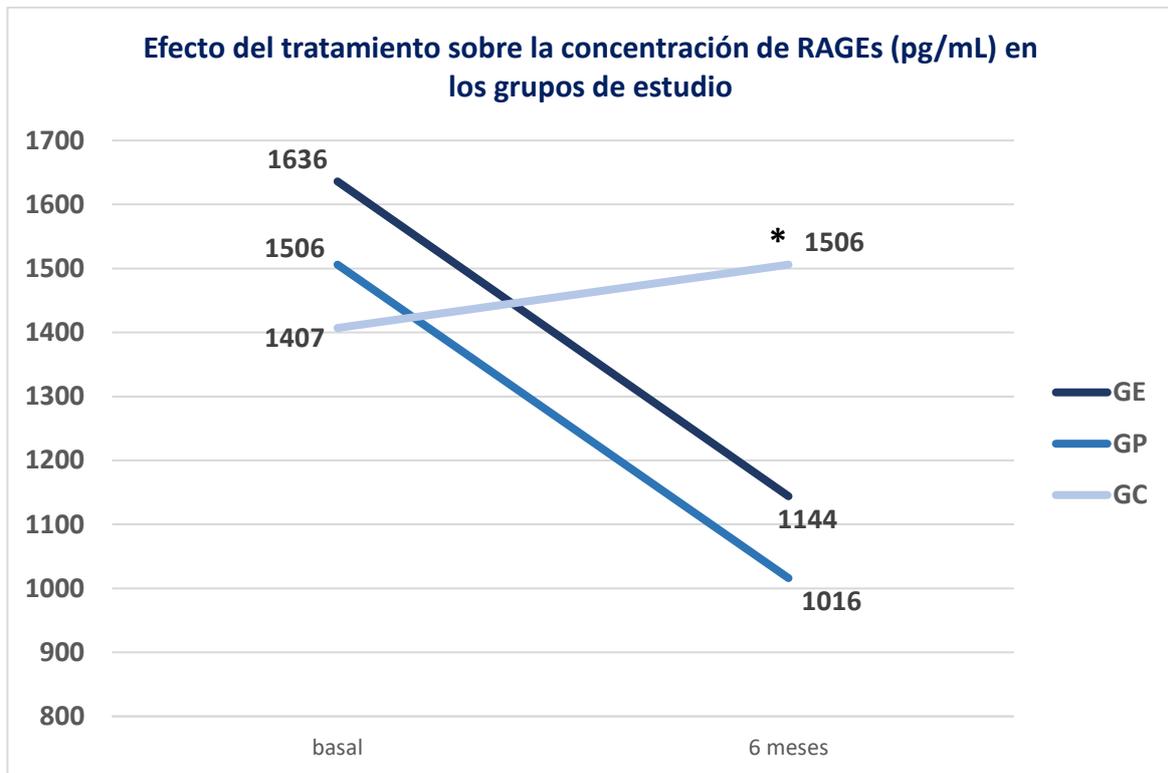
**Cuadro VIII.3** Marcadores de estrés oxidativo pre y post-tratamiento en los grupos de estudio.

Marcador	G. Experimental (n=42)		G. Placebo (n=38)		G. Control (n=28)	
	Basal	post-tratamiento	Basal	post-tratamiento	Basal	6 meses
8-Isoprostanos (pg/mL)	100 ± 3	57 ± 3	106 ± 7	77 ± 5	94 ± 10	107 ± 11*
Superóxido dismutasa (UI/L)	178 ± 1	177 ± 1	176 ± 1	172 ± 1	182 ± 2	172 ± 1*
Glutación peroxidasa (UI/L)	8409 ± 507	9694 ± 458	8273 ± 575	8691 ± 355	9531 ± 815	6223 ± 613*
Capacidad antioxidante total (µmol/L)	1045 ± 27	986 ± 24	1144 ± 34	951 ± 34	1107 ± 51	1060 ± 52
Brecha antioxidante (µmol/L)	796 ± 20	729 ± 21	843 ± 29	702 ± 27	978 ± 49	883 ± 58
Razón SOD/GPx	0.024 ± 0.001	0.020 ± 0.001	0.026 ± 0.002	0.021 ± 0.001	0.026 ± 0.004	0.031 ± 0.002*

Abreviaturas: SOD: superóxido dismutasa, GPx: glutación peroxidasa, CAT: capacidad antioxidante total  
 Los tados presentados son media ± error estándar. ANOVA de medidas repetidas y Dunnet como post hoc. \* p<0.05



**Figura VIII.2.** Efecto del ácido alfa lipoico sobre la HbA1c en los grupos de estudio. Se observa disminución en los % de HbA1c en los grupos experimental y placebo, mientras que en el grupo control se observa aumento.



ANOVA de medidas repetidas y Dunnet como post hoc. \* $p < 0,05$

**Figura VIII.3.** Efecto del ácido alfa lipoico sobre la concentración de RAGEs en los grupos de estudio. Se observa disminución en los grupos experimental y placebo, mientras que en el grupo control se observa aumento de la concentración de RAGEs.

**Cuadro VIII. 4.** Efecto del ácido alfa lipoico sobre el proceso inflamatorio en los grupos de estudio.

Variable	G. Experimental (n=42)		G. Placebo (n=38)		G. Control (n=28)	
	Basal	post-tratamiento	Basal	post-tratamiento	Basal	6 meses
PCR (mg/dL)	0.26 ± 0.04	0.26 ± 0.04	0.25 ± 0.04	0.29 ± 0.05	0.25 ± 0.05	0.37 ± 0.06*
IL12p70 (pg/mL)	4.19 ± 0.13	4.05 ± 0.13	4.06 ± 0.11	4.94 ± 0.10	4.28 ± 0.13	5.20 ± 0.14*
TNF-α (pg/mL)	6.56 ± 0.20	6.48 ± 0.20	6.62 ± 0.17	6.66 ± 0.16	7.99 ± 0.24	8.87 ± 0.25*
IL10 (pg/mL)	3.31 ± 0.17	3.41 ± 0.19	3.07 ± 0.09	3.16 ± 0.05	2.96 ± 0.11	3.58 ± 0.10*
IL6 (pg/mL)	5.07 ± 0,23	5.06 ± 0.21	5.27 ± 0.19	5.24 ± 0.31	5.17 ± 0.19	6.13 ± 0.17*
IL1-β (pg/mL)	9.46 ± 0.27	9.30 ± 0.18	9.51 ± 0.20	9.45 ± 0.12	9.78 ± 0.23	10.96 ± 0.20*
IL8 (pg/mL)	16.20 ± 0.9	15.61 ± 1.0	17.20 ± 1.4	16.74 ± 1.2	15.5 ± 0.75	18.10 ± 1.57*

Abreviaturas: PCR: proteína C reactiva, TNF-α: factor de necrosis tumoral α, IL: interleucina  
 Los datos presentados son media ± error estándar. ANOVA de medidas repetidas y Dunnet como post hoc. \*p<0.05

**Cuadro VIII.5** Regresión lineal múltiple para la concentración de AAL con RAGEs y marcadores de estrés oxidativo, post-tratamiento.

	<b>AAL</b>	<b>HbA1c</b>	<b>RAGE</b>	<b>SOD</b>	<b>GPX</b>	<b>CAT</b>	<b>GAP</b>	<b>SODGPX</b>	<b>8-ISOP</b>
<b>AAL</b>	1	0.084	-0.100	<b>0.279</b>	<b>0.249</b>	0.038	0.006	-0.180	<b>-0.247</b>
<b>HbA1c</b>	0.084	1	-0.020	-0.131	-0.041	0.017	0.061	-0.004	0.157
<b>RAGE</b>	-0.100	-0.020	1	-0.084	-0.302	-0.245	-0.069	0.290	-0.026
<b>SOD</b>	0.279	-0.131	-0.084	1	0.134	0.119	0.165	-0.076	-0.109
<b>GPX</b>	0.249	-0.041	-0.302	0.134	1	-0.060	-0.020	-0.828	-0.145
<b>CAT</b>	0.038	0.017	-0.245	0.119	-0.060	1	0.649	0.137	0.187
<b>GAP</b>	0.006	0.061	-0.069	0.165	-0.020	0.649	1	0.047	0.079
<b>SODGPX</b>	-0.180	-0.004	0.290	-0.076	-0.828	0.137	0.047	1	0.139
<b>8-ISOP</b>	-0.247	0.157	-0.026	-0.109	-0.145	0.187	0.079	0.139	1
<b>AAL</b>		0.402	0.329	<b>0.005</b>	<b>0.012</b>	0.702	0.952	0.077	<b>0.017</b>
<b>HbA1c</b>	0.402		0.845	0.194	0.690	0.862	0.546	0.969	0.134
<b>RAGE</b>	0.329	0.845		0.415	0.003	0.014	0.504	0.005	0.810
<b>SOD</b>	0.005	0.194	0.415		0.186	0.233	0.103	0.457	0.303
<b>GPX</b>	0.012	0.690	0.003	0.186		0.546	0.841	0.000	0.170
<b>CAT</b>	0.702	0.862	0.014	0.233	0.546		0.000	0.177	0.068
<b>GAP</b>	0.952	0.546	0.504	0.103	0.841	0.000		0.653	0.453
<b>SODGPX</b>	0.077	0.969	0.005	0.457	0.000	0.177	0.653		0.200
<b>8-ISOP</b>	0.017	0.134	0.810	0.303	0.170	0.068	0.453	0.200	

Abreviaturas: AAL: ácido alfa lipoico, SOD: Superóxido dismutasa, GPX: glutatión peroxidasa, CAT, capacidad antioxidante total, GAP: brecha antioxidante, 8-ISOP: 8-isoprostanos. Análisis de regresión lineal múltiple, nivel de confianza al 95%. R= 0.244, R<sup>2</sup>= 0.059, p=0.097, n=108

**Cuadro VIII.6** Regresión lineal múltiple para la concentración de AAL con marcadores de inflamación crónica, post-tratamiento.

	AAL	IL12p70	TNF $\alpha$	IL10	IL6	IL1 $\beta$	IL8	PCR
<b>AAL</b>	1	<b>-0.220</b>	<b>-0.250</b>	0.041	<b>-0.249</b>	<b>-0.329</b>	0.067	-0.100
<b>IL12p70</b>	-0.220	1	<b>0.579</b>	<b>0.430</b>	<b>0.576</b>	<b>0.450</b>	0.100	0.134
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	-0.250	0.579	1	<b>0.289</b>	0.188	<b>0.574</b>	0.126	0.030
<b>IL10</b>	0.041	0.430	0.289	1	<b>0.370</b>	<b>0.361</b>	<b>0.222</b>	-0.010
<b>IL6</b>	-0.249	0.576	0.188	0.370	1	<b>0.230</b>	0.154	<b>0.290</b>
<b>IL1<math>\beta</math></b>	-0.329	0.450	0.574	0.361	0.233	1	0.136	0.003
<b>IL8</b>	0.067	0.100	0.126	0.222	0.154	0.136	1	0.085
<b>PCR</b>	-0.100	0.134	0.030	-0.010	0.290	0.003	0.085	1
<b>AAL</b>		<b>0.030</b>	<b>0.014</b>	0.694	<b>0.019</b>	<b>0.001</b>	0.545	-0.100
<b>IL12p70</b>	0.030		<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	0.359	0.193
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	0.014	0.000		<b>0.005</b>	0.076	<b>0.000</b>	0.249	0.775
<b>IL10</b>	0.694	0.000	0.005		<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.041</b>	0.922
<b>IL6</b>	0.019	0.000	0.076	0.000		<b>0.028</b>	0.169	<b>0.006</b>
<b>IL1<math>\beta</math></b>	0.001	0.000	0.000	0.000	0.028		0.213	0.977
<b>IL8</b>	0.545	0.359	0.249	0.041	0.169	0.213		0.440
<b>PCR</b>	0.319	0.193	0.775	0.922	0.006	0.977	0.440	

Abreviaturas: AAL: ácido alfa lipoico, IL: interleucina, TNF $\alpha$ : factor de necrosis tumoral  $\alpha$ , PCR: proteína C reactiva  
 Análisis de regresión lineal múltiple, nivel de confianza al 95%. R= 0.522, R<sup>2</sup>= 0.273, p=0.013, n=108

## IX. DISCUSIÓN

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es una enfermedad cuya prevalencia e incidencia se ha incrementado rápidamente en años recientes, convirtiéndose en la epidemia del siglo XXI, así como en un reto de salud global. Actualmente la DM2 es la segunda causa de muerte en México, siendo los adultos mayores, los más afectados, debido a que la prevalencia de dicha enfermedad en ellos es dos veces mayor con respecto al resto de la población. Aunado a ello, las complicaciones inherentes a la DM2 tales como: enfermedad cardiovascular, enfermedad renal, neuropatía y ceguera, por citar algunas, se presentan con mucha frecuencia, afectando severamente la calidad de vida de las personas diabéticas, llevando en última instancia a la muerte.<sup>26,28,151</sup>

Algunos estudios han demostrado que el estrés oxidativo (EO) y la inflamación crónica, son procesos involucrados en la fisiopatología de la DM2. Asimismo, se ha señalado que tanto el EO como la IC, están implicados en el proceso de envejecimiento; siendo la interacción entre ambos, un factor de riesgo y desencadenante de las enfermedades crónicas no transmisibles (ECNT) que se presentan con mayor frecuencia en la vejez.<sup>15,40,79</sup>

Por otro lado, se ha evidenciado que en personas diabéticas se establecen interacciones entre la hiperglucemia, el EO y la IC. En este sentido, se han propuesto mecanismos que explican la manera en que las elevadas concentraciones de glucosa activan vías metabólicas poco usuales (auto-oxidación de la glucosa, activación de la vía de los polioles, glucosilación de proteínas), mismas que resultan en un aumento en la producción de EROs con el consecuente daño oxidativo. Además, las EROs participan en la respuesta inflamatoria al inducir la vía de activación del NF- $\kappa$ B que promueve la síntesis de proteínas proinflamatorias, así como de moléculas de adhesión y factores procoagulantes, exacerbando el daño celular y tisular, que deriva en la aparición de las complicaciones a nivel micro y macrovascular.<sup>50-51,79,152</sup>

Con la finalidad de prevenir, en medida de lo posible, la aparición y desarrollo de las complicaciones, en los últimos años se ha recurrido al empleo de agentes terapéuticos con propiedades antioxidantes y anti-inflamatorias; entre ellos, el ácido alfa lipoico (AAL).<sup>153</sup> En la presente investigación se evaluó el efecto de dicho compuesto (600 mg/día vía oral) durante 6 meses de tratamiento sobre parámetros clínicos, antropométricos, bioquímicos y marcadores de estrés oxidativo e inflamación crónica en adultos mayores con DM2.

Respecto al efecto del AAL sobre la hipertensión, se ha descrito que dicho compuesto es capaz de promover la síntesis de óxido nítrico, molécula encargada de regular la elasticidad de las paredes de los vasos sanguíneos y mejorar la función endotelial, lo que resulta en una disminución de la tensión arterial. Además, el AAL reduce los niveles de EROs y la peroxidación lipídica, con lo cual también se favorece la función endotelial y por ende disminuye la presión sanguínea. Pese a ello, en nuestro estudio no se observaron diferencias estadísticamente significativas después del tratamiento durante seis meses. En este sentido, nuestros hallazgos son similares a lo reportado en la revisión sistemática publicada por Mohammadi et al. (2017), quienes señalaron que la administración del AAL con dosis desde 300 mg hasta 1800 mg/día no tiene un efecto sobre la hipertensión arterial.<sup>118,120,154-155</sup>

Por otro lado, se ha observado que la administración de AAL disminuye el peso corporal y consecuentemente el IMC tanto en animales como en humanos. En este sentido, aunque se desconocen los mecanismos precisos, se ha sugerido que el AAL participa en la modulación de algunas vías involucradas en la homeostasis energética, la síntesis y oxidación de lípidos, así como la eliminación del colesterol por parte del hígado. Una de estas vías es la de la proteína cinasa activada por adenosin monofosfato (AMPK), conocida por integrar señales hormonales y de nutrientes en el hipotálamo, lo que le confiere un papel funcional en el comportamiento relacionado al consumo de alimentos y el gasto energético. Se ha sugerido que el AAL modula la vía previamente mencionada, ejerciendo un efecto anorexigénico, el cual es más evidente durante las 2 primeras semanas de suplementación y se disipa gradualmente durante la suplementación. Al respecto, en nuestro estudio no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el IMC después del tratamiento con AAL, lo cual se contrapone a lo reportado en otros estudios (Koh et al. 2011, Kucukgoncu et al. 2017 y Namazi et al. 2018), quienes encontraron que la administración de AAL dirige a una moderada pérdida del peso corporal, disminuyendo el IMC; no obstante, es importante señalar que el efecto reportado sobre el IMC es principalmente con dosis de 1200 mg/día y 1800 mg/día y en nuestro estudio la dosis fue de 600 mg/día. Asimismo, el tiempo es otro factor determinante, ya que como se señaló anteriormente el efecto anorexigénico solo se presenta durante las primeras semanas, no así en estudios a largo plazo.<sup>156-159</sup>

Respecto al efecto del AAL sobre el metabolismo lipídico, se ha señalado que además de la modulación que ejerce sobre el hipotálamo (efecto anorexigénico), a nivel periférico parece jugar un papel particularmente importante reduciendo la lipogénesis, aumentando la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, y mejorando el gasto de energía de todo el cuerpo, efecto que logra al reducir la expresión de

la acetil-CoA carboxilasa y la sintetasa de ácidos grasos, ambas enzimas involucradas en la síntesis de ácidos grasos. En este sentido, en nuestro estudio se observó un incremento estadísticamente significativo en la concentración sanguínea de HDL en el grupo experimental después del tratamiento ( $p < 0.05$ ), aunque dicho efecto fue similar en el grupo placebo, lo cual sugiere que la administración de AAL a dosis de 600 mg/día tiene un efecto placebo. Bajo este contexto, dicho efecto placebo también fue observado por Khabbazi et al. (2012) en un estudio realizado en pacientes con insuficiencia renal. Asimismo, Koh et al. (2011), McNeilly et al. (2011) y De Oliveira et al. (2011), no observaron cambios estadísticamente significativos sobre el perfil lipídico con dosis de 1800 mg/día en adultos obesos, 1000 mg/día en adultos obesos con intolerancia a la glucosa y 600 mg/día en adultos con DM2, respectivamente. Aunado a ello, se observó una disminución estadísticamente significativa del colesterol total en el grupo placebo ( $p < 0.05$ ). No obstante, Zhang et al. (2011) observaron un incremento estadísticamente significativo en la concentración de HDL en personas obesas después de la administración de 600 mg/día de AAL vía intravenosa, aunque es importante aclarar que su estudio se limitó a un tratamiento de dos semanas.<sup>126,156,160-162.</sup>

En lo que respecta al ácido úrico en nuestro estudio se observó una disminución en los GE y GP, siendo en este último grupo estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ), lo que sugiere la presencia de un efecto placebo. En este sentido, no se ha reportado que el AAL ejerza un efecto directo sobre las concentraciones sanguíneas de ácido úrico; sin embargo, se ha demostrado clínica y experimentalmente que el ácido úrico desempeña un importante rol como antioxidante in vivo, ya que dada su naturaleza química, posee la capacidad de interactuar directamente con los RL, así como de quelar iones metálicos. Cabe señalar que el papel antioxidante del ácido úrico depende del equilibrio existente entre el resto de las sustancias pro-oxidantes y antioxidantes del plasma (entre ellas el AAL), y cualquier aumento o disminución de tales sustancias repercute directamente sobre la concentración y acción del ácido úrico.<sup>48,163-164</sup>

En cuanto al efecto del AAL sobre el EO se observó una disminución estadísticamente significativa en la concentración sanguínea de 8-isoprostanos tanto en el GE como en el GP ( $p < 0.05$ ). Al respecto, la literatura señala que los isoprostanos son el producto de la interacción de los RL sobre el ácido araquidónico encontrado en las membranas celulares y, dado que el AAL interactúa directamente con los RL, es capaz de disminuir los niveles de dicho marcador pro-oxidante. Esto coincide con lo reportado en otras investigaciones (Sola et al. 2005, Porasuphatana et al. 2012 y Lin et al. 2015), quienes observaron disminución de 8-isoprostanos y malonaldehído (ambos marcadores pro-oxidantes) tras la administración de AAL en dosis desde 300 mg/día hasta 1200 mg/día durante seis meses en

adultos jóvenes, aunque tal efecto se presentó de manera dosis-dependiente. No obstante, en nuestro estudio la disminución de 8-isoprostanos se presentó también en el GP, lo cual sugiere la presencia de efecto placebo, tal como lo reportado por Khabbazi et al. (2012) en pacientes con insuficiencia renal tratados con 600 mg/día de AAL <sup>107,123,125,130,160</sup>

Con respecto a los marcadores antioxidantes, se ha señalado que el AAL y su forma reducida (ADHL) forman un potente par redox capaz de neutralizar diferentes EROs. Además, el ADHL posee la habilidad de restablecer la razón glutatión reducido/oxidado (GSH/GSSG) ya sea cediendo electrones directamente al GSSG para reducirlo o incrementando la síntesis de glutatión al mejorar la captación plasmática de cistina para posteriormente reducirla a cisteína que es el precursor del glutatión. El AAL también es capaz de regenerar las formas reducidas de otros antioxidantes como las vitaminas C y E, así como de quelar metales iónicos y contrarrestar sus efectos oxidantes, lo que le confiere una enorme capacidad antioxidante. Esto coincide con lo reportado por Sun et al. (2012) y Lin et al. (2015), quienes observaron aumento significativo en la actividad de la SOD y de la GPx, así como disminución significativa de la lipoperoxidación en pacientes con degeneración macular (600 mg/día de AAL durante tres meses) y adultos jóvenes con DM2 (600 mg/día de AAL durante seis meses), respectivamente. En nuestro caso, pese al aumento en la actividad de la GPx observada en el GE, no hubo diferencia significativa con respecto al GP. En tanto, en el GC se encontró una disminución estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) en la actividad de la SOD y de la GPx, así como un aumento de la razón SOD/GPx ( $p < 0.05$ ), la cual aporta información acerca del dinamismo de estas dos enzimas que trabajan de manera conjunta para atenuar el daño oxidativo causado por la elevada producción del anión superóxido ( $O_2^-$ ) en las células; así un valor  $> 0.22$  de la razón denota acumulación del  $H_2O_2$  formado a partir de la dismutación del  $O_2^-$  que es llevada a cabo por la SOD, y se acumula por una ineficiente actividad de la GPx, favoreciendo el daño oxidativo vinculado al mecanismo fisiopatológico de la DM2. Aun cuando nuestros resultados sugieren mejoría en el estado oxidativo del GE con respecto al GC dicho efecto se observó también en el GP, sugiriendo la presencia de efecto placebo.<sup>41,107,130,160</sup> En este sentido, nuestros hallazgos coinciden con lo reportado por Retana et al. (2009) y Khabbazi et al. (2012) quienes no encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimental y placebo con respecto a la lipoperoxidación y la capacidad antioxidante total después de un tratamiento antioxidante <sup>165,166</sup>

Por otra parte, en la literatura científica se refiere que el AAL posee propiedades hipoglucemiantes puesto que mejora la captación y aprovechamiento de la glucosa por parte de las células adiposas y del músculo esquelético al inducir la traslocación de los transportadores de glucosa (GLUT 1 Y GLUT

4) desde el complejo de Golgi hacia la membrana celular. Paralelamente, el AAL estimula la actividad del receptor de insulina y su sustrato (IR e IRS1) así como de la fosfoinositol-3-cinasa (PI3K), propiciando la fosforilación de tirosina en el IR y mejorando la captación de glucosa dependiente de la PI3K. Dado lo anterior, el AAL es capaz de atenuar la formación de AGEs al reducir la concentración de glucosa circulante y evitar que ésta reaccione con proteínas de vida media prolongada, lo que a su vez disminuye la expresión del receptor de los AGEs (RAGE) en la membrana celular. Acorde con ello, Gu et al. (2010) y Porasuphatana et al. (2012) observaron disminución del % de HbA1c en pacientes con DM2 tratados con AAL; no obstante, en nuestra investigación se observó disminución tanto del % de HbA1c como de la concentración de RAGE en los GE y GP en comparación con el GC, aunque sólo la disminución de los RAGE resultó estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ). Estos resultados coinciden con lo reportado por De Oliveira et al. (2011) y Bao et al. (2014) quienes no encontraron diferencias significativas de las concentraciones de glucosa y % de HbA1c en pacientes con DM2 tratados con AAL en dosis de 600mg/día durante cuatro y seis meses, respectivamente. Además, cabe resaltar que en los estudios realizados por Gu et al. (2010) y Porasuphatana et al. (2012) los efectos se presentaron tras administrar dosis de 1800 mg/día de AAL en adultos jóvenes, mientras que en nuestro estudio empleamos una dosis menor (600 mg/día) en adultos mayores.<sup>106,125-126,167-168</sup>

De acuerdo con lo señalado en la literatura el AAL tiene la capacidad de disminuir la producción de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 tanto en modelos animales como en humanos, ya que actúa a nivel de la fosforilación de la proteína inhibidora del factor nuclear  $\kappa$ B (IKK), impidiendo la activación y liberación del NF- $\kappa$ B, con lo que además se impide su traslocación al núcleo y la subsecuente transcripción de genes que dirigen la síntesis de proteínas pro-inflamatorias (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6). En este contexto, Sola et al. (2005) y Ahmadi et al. (2013), reportaron disminución en la concentración de IL-6 en pacientes diabéticos tratados con AAL e irbesartán, y en pacientes con enfermedad renal crónica tratados con AAL en dosis de 600 mg/día, respectivamente; pese a ello, en nuestro estudio observamos un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) de todos los parámetros proinflamatorios evaluados en el GC después de seis meses en comparación con los GE y GP. Resultados similares a los nuestros fueron observados por Sardú et al. (2017) quienes no encontraron diferencias significativas en las concentraciones de IL-8 e IL-6 e IL-10 entre el grupo tratado con AAL y el placebo tras 12 meses en pacientes con ablación de catéter. Por su parte El-Nakib et al. (2013) y Khalili et al. (2014) encontraron resultados similares al observar que no hubo diferencia significativa en las concentraciones de IL-6 y TNF $\alpha$  entre los grupos con tratados con AAL y placebo tras la administración en pacientes con anemia (600 mg/ día de AAL) y pacientes con esclerosis múltiple (1200 mg/día de AAL), respectivamente. Nuestros resultados sugieren la presencia de cierto efecto placebo, coincidiendo con lo observado en

las concentraciones de colesterol HDL actividad de las enzimas SOD y GPx, así como en las concentraciones de isoprostanos y RAGE.<sup>112,123,169-172</sup>

En cuanto al análisis de regresión múltiple, se observó correlación positiva entre la concentración sanguínea del AAL y la actividad de las enzimas antioxidantes SOD ( $r=0.279$ ,  $p<0.05$ ) y GPx ( $r=0.249$ ,  $p<0.05$ ), sugiriendo que los cambios observados en dichos marcadores son debidos a la administración del compuesto. Asimismo, la concentración sanguínea de AAL se correlacionó negativamente con la concentración sanguínea de isoprostanos ( $r= -0.247$ ,  $p<0.05$ ), es decir, que a mayor concentración de AAL es menor la cantidad de isoprostanos que se producen en el organismo. Estos resultados son consistentes con lo reportado en la literatura, donde refieren que la administración de AAL mejora la actividad de las enzimas SOD y GPx, siendo además capaz de atenuar el daño oxidativo causado a las membranas celulares por las EROs y los RL, lo que a su vez disminuye la producción de isoprostanos. Respecto a este punto cabe señalar que la relación que guarda la concentración sanguínea del compuesto con los parámetros indicados oscila alrededor del 25%, lo que resulta congruente con lo señalado en la literatura respecto a la magnitud que alcanza el efecto placebo (hasta 30%). Esto coincide con nuestros resultados puesto que se observa que el efecto de AAL sobre estos marcadores de EO es muy similar al observado en el grupo que recibió un placebo.<sup>123,125,166</sup>

En lo que respecta a la relación entre la concentración sanguínea de AAL y los marcadores del PIC, se observó una correlación negativa con las proteínas proinflamatorias: IL-12p70 ( $r= -0.220$ ,  $p<0.05$ ), TNF $\alpha$  ( $r= -0.250$ ,  $p<0.05$ ), IL-6 ( $r =-0.259$ ,  $p<0.05$ ) e IL-1 $\beta$  ( $r= -0.329$ ,  $p<0.01$ ). En este sentido todas las correlaciones observadas son congruentes con lo reportado en la literatura, ya que denotan el efecto descrito del AAL sobre los marcadores del proceso inflamatorio. A partir de nuestros hallazgos se sugiere que la administración oral de AAL (600 mg/día) no es suficiente para atenuar el daño causado por el proceso inflamatorio, ya que el efecto fue similar a lo encontrado en el GP.<sup>106,107</sup>

Por otro lado, observamos que el AAL fue absorbido por el organismo en concentraciones terapéuticas suficientes, ya que, tras 6 meses de tratamiento, las concentraciones de AAL en el GE aumentaron significativamente ( $p<0.05$ ) en comparación con los GP y GC. Al respecto la literatura científica señala que, al tratarse de una molécula con propiedades anfipáticas, el AAL es soluble tanto en medio acuoso como orgánico, característica que le permite atravesar las membranas celulares y distribuirse por todo el organismo. En este contexto, se ha encontrado que tras una dosis de 600 mg de AAL administradas vía oral se alcanzan concentraciones

sanguíneas que van de 1 a 3  $\mu\text{g/mL}$ , mientras que las concentraciones basales alcanzan de 0,1 a 0,3  $\mu\text{g/mL}$  debido a que dicho compuesto además de producirse de manera endógena se obtiene a partir de la dieta. Aunado a ello se ha señalado que los efectos terapéuticos del AAL se manifiestan toda vez que se alcanza una concentración sanguínea de 2  $\mu\text{g/mL}$ . Sin embargo, en algunos estudios se ha observado que el efecto terapéutico del AAL se presentó de manera dosis-dependiente, apreciándose un mayor efecto a dosis de 1800 mg/día en adultos jóvenes y en nuestro estudio la dosis empleada fue de 600 mg/día en adultos mayores. Cabe resaltar que nuestros sujetos de estudio además de presentar DM2, cursaban con un grado de EO e inflamming inherentes al envejecimiento, razón por la cual es posible que la dosis de 600 mg/día de AAL resultara no ser suficiente para esta población, ya que se ha observado que la DM2 y la edad tienen un efecto aditivo, lo que tiende a empeorar el grado de EO y PIC de los adultos mayores con respecto a los adultos jóvenes.<sup>99,101,125,167,173</sup>

A partir de nuestros hallazgos, se ha planteado la presencia de un efecto placebo, es decir, que los efectos observados sobre los diferentes marcadores de EO, proceso inflamatorio y grado de control glucémico se debe en gran medida a un efecto placebo y no a un efecto farmacológico en su totalidad. En este sentido, la medicina actual acepta el uso de placebos en la práctica clínica, siendo extensamente reconocido por la comunidad científica y muy a menudo, puesto en práctica en la realización de ensayos clínicos. Los mecanismos implicados ante la presencia de un efecto placebo se encuentran parcialmente dilucidados ya que la estrecha relación que este fenómeno guarda con los procesos de la mente, son extremadamente complejos. Hoy en día un placebo es definido como una sustancia o procedimiento que no tiene poder inherente para producir el efecto que es buscado o esperado, asimismo, el efecto placebo es definido como todo efecto psicológico o fisiológico atribuible al hecho de recibir una sustancia o estar bajo un procedimiento determinado, sin que dicho efecto sea adjudicable al poder inherente de la sustancia o procedimiento empleado.<sup>174-175</sup> Además, se se ha documentado que el éxito terapéutico de muchos fármacos se debe hasta en un 30% a la presencia de efecto placebo, lo cual coincide con nuestros resultados y con los observados por Retana et al. (2009) quienes demostraron que el uso de placebo puede generar un efecto antioxidante.<sup>166</sup>

Por otro lado, aún cuando son múltiples las interacciones que se establecen entre los neurotransmisores y los mecanismos fisiológicos, los investigadores de este campo coinciden en que el efecto placebo puede ser, en general, causado por dos situaciones: 1) el condicionamiento, donde el efecto es inducido por la exposición repetida a los tratamientos farmacológicos y produce efectos similares a los medicamentos cuando el fármaco se sustituye por un placebo; y 2) la expectativa, en la cual las acciones sugestivas junto con la administración del placebo desencadenan una respuesta

fisiológica. Aunque estos dos mecanismos son los más aceptados, también tienen lugar otra serie de mecanismos psicológicos tales como: la memoria, el aprendizaje, la motivación, el enfoque somático, la recompensa y la reducción de la ansiedad. En nuestro estudio cabe la posibilidad de que el efecto placebo observado sea a causa de la expectativa junto con otros factores que influyen en el efecto, tales como la forma farmacéutica pues una cápsula provoca mayor efecto que una tableta y el color de la cápsula administrada, rojo en el caso de nuestra investigación, que se relaciona con un mayor efecto en comparación de aquellas con colores convencionales como azul o blanco. Sin embargo, el factor más influyente ha sido el apego al tratamiento ya que la totalidad de la población estudiada se mostró entusiasmada y comprometida durante todo el seguimiento, lo que aunado al previo conocimiento de los posibles efectos benéficos que el AAL les brindaría, resultaron ser una potente combinación causante de los efectos antioxidante, anti-inflamatorio e hipoglucemiante, observados tras 6 meses de intervención tanto en el GE como en el GP.<sup>174,176-177</sup>

Los hallazgos de la presente investigación sugieren la presencia de un efecto placebo con dosis de 600 mg/día de AAL durante seis meses, sin embargo, podría ser conveniente prolongar la intervención terapéutica a 12 meses, ya que se ha observado que el efecto placebo se agota a los 6 meses, con lo cual se demostraría un efecto terapéutico con dicha dosis de AAL. También se ha señalado que el AAL puede comportarse como pro-oxidante dependiendo del tipo de célula en cuestión, así como del estado oxidante/antioxidante en el que se encuentre dicha célula, razón por la cual se ha señalado que son necesarios más estudios para determinar si su empleo beneficia a los diabéticos. Derivado de ello surge la necesidad de realizar más estudios en adultos mayores con DM2 para corroborar los resultados obtenidos por nuestro grupo de investigación, ya que hasta ahora los resultados obtenidos de las diferentes investigaciones que se han llevado a cabo no son concluyentes respecto a la utilidad clínica del AAL en adultos mayores diabéticos.<sup>178</sup>

## X. CONCLUSIONES

### HIPÓTESIS

*Considerando los estudios sobre el efecto antioxidante e hipoglucemiante del ácido alfa lipoico, suponemos que los adultos mayores con diabetes que reciban tratamiento complementario con dicho compuesto mostrarán una disminución estadísticamente significativa de los niveles de glucosa, AGEs, marcadores de inflamación crónica y estrés oxidativo en comparación con el grupo que no reciba dicho tratamiento.*

### CONCLUSIONES

- ❖ La administración de AAL a dosis de 600 mg/día durante seis meses tiene un efecto antioxidante similar al del placebo en adultos mayores con diabetes mellitus tipo 2.
- ❖ La administración de AAL a dosis de 600 mg/día durante seis meses tiene un efecto anti-inflamatorio similar al del placebo en adultos mayores con diabetes mellitus tipo 2.
- ❖ La concentración sanguínea de AAL tiene un efecto directamente proporcional de más del 20% en la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y GPx e inversamente proporcional con la concentración de 8-isoprostanos.
- ❖ La concentración sanguínea de AAL tiene un efecto inversamente proporcional de más del 20% en la concentración de los marcadores pro-inflamatorios IL12p70, TNF $\alpha$ , IL6 e IL1 $\beta$ .

## XI. PERSPECTIVAS

- ❖ Acorde con los resultados de la presente investigación, se justifica extender el seguimiento a 12 meses con la finalidad de observar si el efecto placebo persiste, o por el contrario desaparece.
- ❖ Sería conveniente aumentar el tamaño de la muestra e incrementar la dosis a 1 200 mg/día para corroborar si el suplemento solo tiene un efecto placebo o si la dosis efectiva para adultos mayores debe ser mayor que para los adultos jóvenes, considerando el estrés oxidativo e inflamming inherentes al envejecimiento aunados a la diabetes mellitus.
- ❖ También sería pertinente ampliar el tiempo de la investigación a 12 meses con la finalidad de observar si el efecto placebo persiste, o por el contrario desaparece.

## XII. REFERENCIAS

1. Castro-Obregón S. Historia de las explicaciones al envejecimiento y de los intentos por evitarlo. En: Konigsberg M. ¿Por qué envejecemos? Y otras historias. Ciudad de México: Red Temática Envejecimiento, Salud y Desarrollo Social, CONACyT, Instituto Nacional de Geriátria, Universidad Autónoma Metropolitana; 2016. p. 1-22.
2. Del Bosque-Plata L. El envejecimiento y las enfermedades comunes en nuestra sociedad. En: Konigsberg M. ¿Por qué envejecemos? Y otras historias. Ciudad de México: Red Temática Envejecimiento, Salud y Desarrollo Social, CONACyT, Instituto Nacional de Geriátria, Universidad Autónoma Metropolitana; 2016. p. 43-56.
3. Mendoza-Núñez VM. Envejecimiento humano: Un marco conceptual para la intervención comunitaria. En: Mendoza-Núñez VM, Martínez-Maldonado ML. Promoción de la salud en la mujer adulta mayor. Ciudad de México: Instituto Nacional de Geriátria; 2015. p. 13-40.
4. Castillo-Quan JI, Kinghorn KJ. Gerontología molecular: hacia un envejecimiento saludable. *Gac Med Mex.* 2013; 149(1):680-685.
5. Cardona-Arango D, Peláez E. Envejecimiento poblacional en el siglo XXI: oportunidades, retos y preocupaciones. *Salud Uninorte.* 2012; 28(2): 335-348.
6. Niccoli T, Partridge L. Ageing is a risk factor for disease. *Curr Biol.* 2012; 22(17): R741-752.
7. Leeson GW. The demographics of population ageing in Latin America, the Caribbean and the Iberian Peninsula, 1950-2050. En: Montes de Oca V. Envejecimiento en América Latina y el Caribe: enfoques en investigación y docencia de la Red Latinoamericana de Investigación en envejecimiento. Ciudad de México: Instituto de Investigaciones Sociales, Universidad Nacional Autónoma de México; 2013. p. 53-71.
8. Hernández-Triana M. Aging. *Revista Cubana de Salud Pública.* 2014; 40(4): 361-378.
9. Consejo Nacional de Población. La situación demográfica de México 2016. Distribución de la población de México por grandes grupos de edad, 1950-2050. México; 2017. Disponible en: <https://www.gob.mx/conapo>
10. Manrique-Espinoza B, Salinas-Rodríguez A, Moreno-Tamayo KM, Acosta-Castillo I, Sosa-Ortiz AL, Gutiérrez-Robledo LM, Téllez-Rojo MM. Condiciones de salud y estado funcional de los adultos mayores en México. *Salud Pública Méx.* 2013; 55(supl 2): S323-S331.
11. Kennedy BK, Berger SL, Brunet A, Campisi J, Cuervo AM, Epel ES, et al. Geroscience: linking aging to chronic disease. *Cell.* 2014; 159(4): 709-713.
12. Miquel J. Integración de teorías del envejecimiento. *Rev Esp Geriatr Gerontol.* 2006; 41(1): 55-63.

13. Hernández-González CD, González-Martínez JF. Teorías del envejecimiento. En: Rocha-Durán L. La vejez en movimiento: un enfoque integral. Buenos Aires: Dunken, 2013. p. 43-50.
14. Viña J, Borrás C, Miquel J. Theories of ageing. IUBMB Life. 2007; 59(4-5): 249-254.
15. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. Cell. 2013; 153(6): 1194-1217.
16. Sierra F. Gerociencia: la última frontera en salud. En: Konigsberg M. ¿Por qué envejecemos? Y otras historias. Ciudad de México: Red Temática Envejecimiento, Salud y Desarrollo Social, CONACyT, Instituto Nacional de Geriatria, Universidad Autónoma Metropolitana; 2016. p. 23-41.
17. Berrío-Valencia MI. Envejecimiento de la población: un reto para la salud pública. Rev Colomb Anestesiol. 2012; 40(3): 192-194.
18. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016. Informe final de resultados. Salud: historia de enfermedades crónicas. México; 2016. Disponible en: <https://www.gob.mx/ENSANUT>
19. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Estadística a propósito del día de muertos. México; 2017. Disponible en: <http://www.inegi.org.mx>
20. Castro-Vilela ME, Quílez-Pina RM, Bonafonte-Marteles JL, Morlanes-Navarro T, Calvo-Gracia F. Prevalencia de síndrome metabólico en los ancianos hospitalizados. Rev Esp Geriatr Gerontol. 2014; 49(1): 20-23.
21. Canadian Diabetes Association Clinical Practice Guidelines Expert Committee. Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes, Prediabetes and Metabolic Syndrome. Can J Diabetes. 2013; 37 (supl 1): S8-S11.
22. Jiménez-Osorio AS, Ramos-Martínez AJ. Envejecimiento y diabetes. En: Konigsberg M. ¿Por qué envejecemos? Y otras historias. Ciudad de México: Red Temática Envejecimiento, Salud y Desarrollo Social, CONACyT, Instituto Nacional de Geriatria, Universidad Autónoma Metropolitana; 2016. p.159-176.
23. Gastaldelli A. Rol of beta-cell dysfunction, ectopic fat accumulation and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. Diabetes Research and Clinical Practice. 2011; 93 (supl 1): S60-S65.
24. Thomas CC, Philipson LH. Update on Diabetes Classification. Med Clin N Am. 2015; 99(1): 1-16.
25. American Diabetes Association. Classification and diagnosis of diabetes. Diabetes Care. 2017; 40(supl 1): S11-S24. Disponible en: <https://doi.org/10.2337/dc17-S005>
26. Organización Mundial de la Salud. Informe mundial sobre la diabetes. Resumen de orientación. Ginebra; 2016. Disponible en: [www.who.int/diabetes/global-report](http://www.who.int/diabetes/global-report)

27. Rothberg AE, Halter JB. Obesity and diabetes in an aging population. Time to rethink definitions and management? *Clin Geriatr Med*. 2015; 31(1): 1-15.
28. Hernández-Ávila M, Gutiérrez JP, Reynoso-Noverón N. Diabetes mellitus en México. El estado de la epidemia. *Salud Pública Mex*. 2013; 55(supl 2): S129-S136.
29. Organización Mundial de la Salud. Diabetes. Nota descriptiva. Ginebra; 2017. Disponible en: [www.who.int/mediacentre/factsheets](http://www.who.int/mediacentre/factsheets)
30. Aznar-Rodríguez S, Lomas-Meneses A, Quílez-Toboso RP, Huguet-Moreno I. Diabetes mellitus. *Medicine*. 2012; 11(17): 995-1002.
31. Leahy JL. Pathogenesis of type 2 Diabetes Mellitus. *Archives of Medical Research*. 2005; 36(1):197-209.
32. Pietropaolo M, Le Roith D. Pathogenesis of diabetes: Our current understanding. *Diabetes*. 2001; 4(2): 1-16.
33. Olivares-Reyes JA, Arellano-Plancarte A. Bases moleculares de las acciones de la insulina. *REB*. 2008; 27 (1): 9-18.
34. Sah SP, Singh B, Choudhary S, Kumar A. Animal models of insulin resistance: A review. *Pharmacol Rep*. 2016; 68(6): 1165-1177.
35. Unger J. Pathogenesis of Type 2 Diabetes. A comprehensive analysis. En: *Nutritional and Therapeutic Interventions for Diabetes and Metabolic Syndrome*. London: Elsevier; 2012. p. 29-41.
36. DeFronzo RA. Pathogenesis of type 2 diabetes. *Med Clin N Am*. 2004; 88(1): 787-835.
37. Contreras-Zambrano MA. Disfunción beta pancreática. *Rev Venez Endocrinol Metabol*. 2008; 6(3): 1-5.
38. Cervantes-Villagrana RD, Presno-Bernal JM. Fisiopatología de la diabetes y los mecanismos de muerte de las células  $\beta$  pancreáticas. *Revista de Endocrinología y Nutrición*. 2013; 21(3): 98-106.
39. Calderón-Salinas JV, Muñoz-Reyes EG, Quintana-Escorza MA. Estrés oxidativo y diabetes mellitus. *REB*. 2013; 32(2): 53-66.
40. Cruz-Hernández J, Licea-Puig ME, Hernández-García P, Abraham-Marcel EA, Yanes-Quesada M. Estrés oxidativo y diabetes mellitus. *Rev Mex Patol Clin*. 2011; 58(1): 4-15.
41. Sánchez-Rodríguez MA, Santiago-Osorio E, Vargas LA, Mendoza-Núñez VM. Propuesta de un constructo para evaluar integralmente el estrés oxidativo. *Bioquímica* 2004; 29(3):81-90.
42. Coz RJ, Villavicencio VJ. Indicadores de estrés oxidativo en eritrocitos de una población de Huaraz [tesis doctoral]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2013.

43. González TM, Betancourt RM, Ortiz MR. Daño oxidativo y antioxidantes. *Bioquímica* 2000; 25(1):3-9.
44. Korsager LM, Matchkov VV. Hypertension and physical exercise: The role of oxidative stress. *Medicina*. 2016; 52(1): 19-27.
45. Dani G, Falco A, Patrono C. Lipid peroxidation in diabetes mellitus. *Antioxid Redox Signal*. 2005; 7(1-2): 256-268.
46. Obregón O, Lares MC, Castro J, Garzazo G. Potencial de oxidación de las lipoproteínas de baja densidad en una población normal y en una población con diabetes mellitus tipo 2. *Arch Venez Farmacol Terap*. 2004; 23(1): 1-12.
47. Seghrouchni I, Draï J, Bannier E, Riviere J, Calmard P, García I et al. Oxidative stress parameters in type 1, type 2 and insulin-treated type 2 diabetes mellitus; insulin treatment efficiency. *Clin Chim Acta*. 2002; 321(1-2): 89-96.
48. Sánchez-Rodríguez MA, Mendoza-Núñez VM. Envejecimiento, enfermedades crónicas y antioxidantes. Ciudad de México: FES Zaragoza, UNAM; 2003. p. 23-45
49. Clapés S, Armas D, Marquetty A, Lemani M, Márquez I, Díaz D et al. Disminución de la capacidad antioxidante en niños y adolescentes diabéticos. *Rev Cub Invest Biomed*. 2006; 25(2): 1-7.
50. Pennathur S, Heinecke JW. Mechanisms of oxidative stress in diabetes: Implications for the pathogenesis of vascular disease and antioxidant therapy. *Front Biosci*. 2004; 9(1): 565-574.
51. Weirnsperger NF. Oxidative stress: Special case of diabetes. *Biofactors*. 2003; 19(1-2): 11-8.
52. Núñez RI, Socarrás EL, González Z, Chávez J, Cano C, Amell A et al. Determinación de agentes antioxidantes séricos en diabéticos tipo 2. *Med Interna (Caracas)*. 2001; 17(4): 1-10.
53. Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity: Implication for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis and cancer. *Obesity Research & Clinical Practice*. 2013; 7(1): e330-e341.
54. Singh PP, Mahadi F, Roy A, Sharma P. Reactive Oxygen Species, Reactive Nitrogen Species and antioxidants in etiopathogenesis of diabetes mellitus type-2. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 2009; 24(4): 324-242.
55. Gugliucci A. Glicación de proteínas: el rol protagónico de la hiperglicemia en las complicaciones crónicas de la diabetes. *Rev Med Uruguay*. 2000; 16(1): 58-75.
56. Yamagishi S, Matsui T. Pathologic role of dietary advanced glycation end products in cardiometabolic disorders, and therapeutic intervention. *Nutrition*. 2016; 32(1): 157-165.

57. Rasposseiras-Roubín S, Rodiño-Janeiro B, Grigorian-Shamagian L, Mouré-González M. Productos de glicación avanzada: nuevo marcador de disfunción renal en pacientes con insuficiencia cardiaca crónica. *Med Clín Barc.* 2011; 136(12): 513-521.
58. Rossi JP. La combinación de los azúcares con las biomoléculas o como alimentarse en forma saludable. *J. Phys. Chem. A.* 2003; 107(1): 409-414.
59. Cohen SE. La glicosilación no enzimática: una vía común en la diabetes y el envejecimiento. *Med Cutan Iber Lat Am.* 2011; 39(6): 243-247.
60. Gudiño A, Chediak MC. Insulin resistance and generation of advanced glycation end products. *Medwave.* 2013; 13(3): 1-7.
61. Ottum MS, Mistry AM. Advanced glycation end-products: Modifiable environmental factors profoundly mediate insulin resistance. *J Clin Biochem Nutr.* 2015; 57(1): 1-12.
62. Ott C, Jacobs K, Haucke E, Navarrete-Santos A, Grune T, Simm A. Role of advanced glycation end products in cellular signal. *Redox Biology.* 2014; 2(1): 411-429.
63. Van-Puyvelde K, Mets T, Njemini R, Beyer I, Bautmans I. Effect of advanced glycation end product intake on inflammation and aging: a systematic review. *Nutrition Reviews.* 2014; 72(10): 638-650.
64. Rojas A, Delgado López F, González I, Pérez-Castro R, Romero J, Rojas I. Receptor for advanced glycation end-products: A complex signaling scenario for a promiscuous receptor. *Cellula Signalling.* 2013; 25(1): 609-614.
65. Stirban A, Gawlowski T, Roden M. Vascular effects of advanced glycation end products: Clinical effects and molecular mechanisms. *Molecular Metabolism.* 2013; 3(1): 94-108.
66. Bengmark S, Gil A. Productos finales de la glicación y de la lipoperoxidación como amplificadores de la inflamación: papel de los alimentos. *Nutr Hosp.* 2007; 22(6): 625-640.
67. Osorio FG, Soria-Valles C, Santiago-Fernández O, Freije JMP, López-Otín C. NF-kb signaling as a driver of ageing. *Internacional Review of Cell and Molecular Biology.* 2016; 326(1): 133-162.
68. Aronson D, Rayfield E. How hyperglycemia promotes atherosclerosis: molecular mechanisms. *Cardiovasc Diabetol.* 2002; 1(1):1-10.
69. Sorci G, Riuzzi F, Giambanco I, Donato R. RAGE in tissue homeostasis, repair and regeneration. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2013; 1833(1): 101-109.
70. Rubio-Pérez JM, Morillas-Ruiz JM. Proceso inflamatorio en la enfermedad de Alzheimer. Papel de las citoquinas. En García-Rodríguez JC. *Neuroprotección en enfermedades neuro y heredo degenerativas.* Barcelona: Omnia Science; 2014. 121-156.
71. Pálmai-Pallag T, Bachrati CZ. Inflammation-induced DNA damage and damage-induced inflammation: a vicious cycle. *Microbes and Infection.* 2014; 16(1): 822-832.

72. Vasto S, Candore G, Balistreri CR, Caruso M, Colonna-Romano G, Grimaldi MP, et al. Inflammatory networks in ageing, age-related diseases and longevity. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2007; 128(1): 83-91.
73. Blancas-Flores G, Almanza-Pérez JC, López-Roa RI, Alarcón-Aguilar FJ, García-Macedo R. La obesidad como un proceso inflamatorio. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 2010; 67(1): 88-97.
74. Goldsby RA, Kindt T, Osborne B, Kuby J. *Inmunología*. Ciudad de México: McGraw Hill Interamericana; 2004. p. 357-380
75. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Cellular and molecular immunology*. 5a ed. Philadelphia: WB Saunders, 2005. p. 216-223.
76. Amézcu-Guerra LM, Springal RV, Bojalil PR. Proteína C reactiva: aspectos cardiovasculares de una proteína de fase aguda. *Arch Cardio Mex*. 2007; 77(1): 58-66.
77. Barros-De-Oliveira CM, Kimiko-Sakata R, TSA, Machado-Issy A, Gerola LR, Salomao R. Citocinas y dolor. *Rev Bras Anesthesiol*. 2011; 61(2): 137-142.
78. Alonso-Fernández P, De la fuente M. Marcadores inmunológicos de envejecimiento. *Rev Esp Geriatr Gerontol*. 2008; 43(3):167-179.
79. Franceschi C, Campisi J. Chronic inflammation (inflammaging) and its potencial contribution to age- associated diseases. *J Gerontol A Biol Sci Med*. 2014; 69(1): 4-9.
80. Xia S, Zhang X, Zheng S, Khanabdali R, Kalionis B, Wu J, et al. An update on inflamm-aging: Mechanisms, prevention and treatment. *J Immunol Res*. 2016; doi:10.1155/2016/8426874.
81. Manzur MD, Ciro QF, Alayón AN. Adipocitos, obesidad visceral, inflamación y enfermedad cardiovascular. *Rev Colomb Cardiol*. 2010; 17(5): 207-213.
82. Harman D. Free radical theory of ageing. *Mutat Res*. 1992; 275(1): 257-266.
83. Belenguer VA, Mohamed AK, Avellana ZJ. El estrés oxidativo como predictor de longevidad: estudio de casos y controles. *Rev Esp Geriatr Gerontol*. 2015; 50(1): 6-21.
84. Holvoet P. Relations between metabolic syndrome, oxidative stress and inflammation and cardiovascular disease. *Verhandelingen*. 2008; 70(3):193-219.
85. Packer L, Witt E, Tritschler H. Alpha lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic Biol Med*. 1995; 29(1):227-250.
86. Gorąca A, Huk-Kolega H, Piechota A, Kleniewska P, Ciejka E, Skibska B. Lipoic acid-biological activity and therapeutic potential. *Pharmacological Reports*. 2011; 63(1): 849-858.
87. Shay KP, Moreau RF, Smith EJ, Smith AR, Hagen TM. Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: Molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009; 1790(1): 1149-1160.

88. Maldonado-Rojas W, Oliveira-Verbel J. Searching of protein targets for alpha lipoic acid. *J. Braz Chem Soc.* 2011; 22(12): 2250-2259.
89. Snell EE, Strong FM, Peterson WH. Growth factors for bacteria. VI: Fractionation and properties of an accessory factor for lactic acid bacteria. *Biochem J.* 1937; 31(10): 1789-1799.
90. Parry RJ, Trainor DA. Biosynthesis of lipoic acid 2. Stereochemistry of sulfur introduction at C-6 of octanoic acid. *J Am Chem Soc.* 1978; 100(16): 5243-5244.
91. Yang YS, Frey PA. 2-Ketoacid dehydrogenase complexes of *Escherichia coli*: Stereospecificities of the three components for (R)-lipoate. *Arch Biochem Biophys.* 1989; 268(2): 465-474.
92. Teichert J, Kern J, Tritschler HJ, Ulrich H, Preiss R. Investigation on the pharmacokinetics of alpha-lipoic acid in healthy volunteers. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 1998; 36(1): 625-628.
93. Carlson DA, Smith AR, Fisher SJ, Young KL, Packer L. The plasma pharmacokinetics of R-(+)-lipoic acid administered as sodium R-(+)-lipoate to healthy human subjects. *Altern Med Rev.* 2007; 12(4): 343-351.
94. Uchida R, Okamoto H, Ikuta N, Terao K, Hirota T. Enantioselective pharmacokinetics of  $\alpha$ -lipoic acid in rats. *Int J Mol Sci.* 2015; 16(1): 22781-22794.
95. Kagan VE, Shvedova A, Serbinova E, Khan S, Swanson C, Powell R, et al. Dihydrolipoic acid: a universal antioxidant both in the membrane and in the aqueous phase. Reduction of peroxy, ascorbyl and chromanoxyl radicals. *Biochem Pharmacol* 1992; 44(8): 637-649.
96. Moini H, Packer L, Saris N. Antioxidant and prooxidant activities of  $\alpha$ -lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2002; 182(1): 84-90.
97. Panigrahi M, Sadguna Y, Shivakumar BR, Kolluri SV, Roy S, Packer L, et al. Alpha-lipoic acid protects against reperfusion injury following cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* 1996; 717(1): 184-188.
98. Biewenga GP, Haenen GR, Bast A. The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *Gen Pharmacol.* 1997; 29(1): 315-331.
99. Breithaupt-Grögler K, Niebch G, Schneider E, Erb K, Hermann R, Blume HH, et al. Dose-proportionality of oral thioctic acid: coincidence of assessments via pooled plasma and individual data. *Eur J Pharm Sci.* 1999; (8): 57-65.
100. Mignini F, Streccioni V, Tomassoni D, Traini E, Amenta F. Comparative crossover, randomized, open-label bioequivalence study on the bioequivalence of two formulations of thioctic acid in healthy volunteers. *Clin Exp Hypertens.* 2007; 29(1): 575-586.
101. Amenta F, Traini E, Tomassoni D, Mignini F. Pharmacokinetics of different formulations of thioctic (alpha-lipoic) acid in healthy volunteers. *Clin Exp Hypertens.* 2008; 30(1): 767-775.

102. Packer L, Witt EH, Tritschler HJ. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Rad Biol Med.* 1995; 19(2): 227-250.
103. Packer L, Kraemer K, Rimbach G. Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. *Nutrition.* 2001; 17(10): 888-895.
104. Bustamante J, Lodge JK, Marcocci L, Tritschler HJ, Packer L, Rihn BH. Alpha-lipoic acid in liver metabolism and disease. *Free Radic Biol Med.* 1998; 24(6): 1023–1039.
105. Michels AJ, Joisher N, Hagen TM. Age-related decline of sodium-dependent ascorbic acid transport in isolated rat hepatocytes. *Arch Biochem Biophys.* 2003; 410(1): 112-120.
106. Gomes MB, Negrato CA. Alpha-lipoic acid as a pleiotropic compound with potential therapeutic use in diabetes and other chronic diseases. *Diabetol Metabol Syndr.* 2014; 6(8): 1-18.
107. Rochette L, Ghibu S, Muresan A, Vergely C. Alpha-lipoic acid: molecular mechanisms and therapeutic potential in diabetes. *Can J Physiol Pharmacol.* 2015; 93(1): 1021-1027.
108. Yaworsky K, Somwar R, Ramlal T, Tritschler HJ, Klip A. Engagement of the insulin-sensitive pathway in the stimulation of glucose transport by alpha-lipoic acid in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetologia.* 2000; 43(3): 294-303.
109. Moini H, Tirosh O, Park YC, Cho KJ, Packer L. R-alpha-lipoic acid action on cell redox status, the insulin receptor and glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Arch Biochem Biophys.* 2002; 397(2): 384-391.
110. Yang L, Li W, Liu Y, Li Y, Gao L, Zhao JJ. Alpha-lipoic acid attenuates insulin resistance and improves glucose metabolism in high fat diet-fed mice. *Acta Pharmacol Sin.* 2014; 35 (10): 1285-1292.
111. Nakajima S, Kitamura M. Bidirectional regulation of NF- $\kappa$ B by reactive oxygen species: a role of unfolded protein response. *Free Radical Biol Med.* 2013; 65(1): 162-174.
112. Ying Z, Kampfrath T, Sun Q, Parthasathy S, Rajagopalan S. Evidence that  $\alpha$ -lipoic acid inhibits NF- $\kappa$ B activation independent of its antioxidant function. *Inflamm Res.* 2011; 60(3): 219-225.
113. Shay KP, Hagen TM. Age-associated impairment of Akt phosphorylation in primary rat hepatocytes is remediated by alpha-lipoic acid through PI3 kinase, PTEN and PP2A. *Biogerontology.* 2009; 10(1): 443-456.
114. Steinberg GK, Kemp BE. AMPK in health and disease. *Physiol Rev.* 2009; 89(3): 1025-1078.
115. Jessen N, Goodyear LJ. Contraction signaling to glucose transport in skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 2005; 99(1): 330-337
116. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest.* 2001; 108(8): 1167-1174.

117. Sena CM, Nunes E, Louro T, Proenca T, Fernandes R, Boarder MR, et al. Effects of alpha-lipoic acid on endothelial function in aged diabetic and high-fat fed rats. *Br J Pharmacol.* 2008; 153(5): 894-906.
118. Scaramuzza A, Giani E, Redaelli F, Ungheri S, Macedoni M, Giudici V, et al. Alpha-lipoic acid and antioxidant diet help to improve endothelial dysfunction in adolescents with type 1 diabetes: a pilot trial. *J Diabetes Res.* 2015; doi:10.1155/2015/474561.
119. McMackin CJ, Widlansky ME, Hamburg NM, Huang AL, Weller S, Holbrook M, et al. Effect of combined treatment with alpha-lipoic acid and acetyl-L-carnitine on vascular function and blood pressure in patients with coronary artery disease. *J Clin Hypertens.* 2007; 9(1): 249-255.
120. Heinisch BB, Francesconi M, Mittermayer F, Schaller G, Gouya G, Woltz M, et al. Alpha-lipoic acid improves vascular endothelial function in patients with type 2 diabetes: placebo-controlled randomized trial. *Eur J Clin Invest.* 2010; 40(2): 148-154.
121. Lee EY, Lee CK, Lee KU, Park JY, Cho KJ, Cho YS, et al. Alpha-lipoic acid suppresses the development of collagen-induced arthritis and protects against bone destruction in mice. *Rheumatol Int.* 2007; 27(3): 225-233.
122. Castro MC, Massa ML, González LG, Schinella G, Gagliardino JJ, Francini F. Fructose-induced inflammation, insuline resistance and oxidative stress: A liver pathological triad effectively disrupted by lipoic acid. *Life Sci.* 2015; 137(1): 1-6.
123. Sola S, Mir MQ, Cheema F, Khan-Merchant N, Menon RG, Parthasarathy S, et al. Irbesartan and lipoic acid improve endothelial function and reduce markers of inflammation in the metabolic syndrome: results of the Irbesartan and Lipoic Acid in Endothelial Dysfunction (ISLAND) study. *Circulation.* 2005; 111(3): 343-348.
124. Yang L, Li W, Liu Y, Li Y, Gao L, Zhao JJ. Alpha-lipoic acid attenuates insulin resistance and improves glucose metabolism in high fat diet-fed mice. *Acta Pharmacol Sin.* 2014; 35 (10): 1285-1292.
125. Porasuphatana S, Suddee S, Nartnampong A, Konsil J, Harnwong B, Santaweek A. Glycemic and oxidative status of patients with type 2 diabetes mellitus following oral administration of alpha-lipoic acid: a randomized double-blinded placebo-controlled study. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2012; 21(1): 12-21.
126. De Oliveira AM, Rondó PH, Luzia LA, D'Abranzo FH, Illison VK. The effects of lipoic acid and  $\alpha$ -tocopherol supplementation on the lipid profile and insulin sensitivity of patients with type 2 diabetes mellitus: a randomized double-blind, placebo-controlled trial. *Diabetes Res Clin Pract.* 2011; 92(2): 253-260

127. Nebbioso M, Federici M, Rusciano D, Evangelista M, Pescosolido N. Oxidative stress in preretinal diabetic subjects and antioxidants. *Diabetes Technol Ther.* 2012; 14(3): 257-263.
128. Voloboueva LA, Liu J, Suh JH, Ames BN, Miller SS. (R)-alpha-lipoic acid protects retinal pigment epithelial cells from oxidative damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005; 46(11): 4302-4310.
129. Feng B, Yang X-F, Xue J-L, Xu L, Wang H. The protective effects of  $\alpha$ -lipoic acid on kidneys in type 2 diabetic Goto-Kakisaki rats via reducing oxidative stress. *Int J Mol Sci.* 2013; 14(4): 6746-6756.
130. Lin H, Ye S, Xu J, Wang W. The alpha-lipoic acid decreases urinary podocalyxin excretion in type 2 diabetics by inhibiting oxidative stress in vivo. *Journal of Diabetes and Its Complications.* 2015; 29(1): 64-67
131. Ziegler D, Hanefeld M, Ruhnau KJ, Meissner HP, Lobish M, Schütte K, et al. Treatment of symptomatic diabetic peripheral neuropathy with the antioxidant alpha-lipoic acid. A 3-week multicentre randomized controlled trial (ALADIN study), *Diabetologia.* 1995; 38(1): 1425-1433.
132. Bertolotto F, Massone A. Combination of alpha-lipoic acid and superoxide dismutase leads to physiological and symptomatic improvements in diabetic neuropathy. *Drugs R D.* 2012; 12(1): 29-34.
133. Ziegler D, Low PA, Freeman R, Tritschler H, Vinik AI. Predictors of improvement and progression of diabetic polyneuropathy following treatment with  $\alpha$ -lipoic acid for 4 years in the NATHAN 1 trial. *Journal of Diabetes and Its Complications.* 2016; 30(2): 350-356.
134. Tomassoni D, Amenta F, Amantini C, Farfariello V, Di Cesare ML, Nwankwo IE, et al. Brain activity of thioctic acid enantiomers: in vitro and in vivo studies in an animal model of cerebrovascular injury. *Int J Mol Sci.* 2013; 14(3): 4580-4595.
135. Mahboob A, Farhat SM, Iqbal G, Babar MM, Zaidi NU, Nabavi SM, et al. Alpha-lipoic acid-mediated activation of muscarinic receptors improves hippocampus-and amygdala-dependent memory. *Brain Res Bull.* 2016; 122(1): 19-28.
136. Tian Y-F, He C-T, Chen Y-T, Hsieh P-S. Lipoic acid suppresses portal endotoxemia-induced steatohepatitis and pancreatic inflammation in rats. *World J Gastroenterol.* 2013; 19(18): 2761-2771.
137. Fei M, Xie Q, Zou Y, He R, Zhang Y, Wang J, et al. Alpha-lipoic acid protects mice against concanavalin-A-induced hepatitis by modulating cytokine secretion and reducing reactive oxygen species generation. *International Immunopharmacology.* 2016; 35(1): 53-60.

138. Cho KJ, Moon HE, Moini H, Packer L, Yoon DY, Chung AS. Alpha-lipoic acid inhibits adipocyte differentiation by regulating pro-adipogenic transcription factors via mitogen-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem.* 2003; 278(37): 34823-34833.
139. Prieto-Hontoria PL, Pérez-Matute P, Fernández-Galilea M, Martínez JA, Moreno-Aliaga MJ. Effects of lipoic acid on AMPK and adiponectin in adipose tissue of low-and high-fat-fed rats. *Eur J Nutr.* 2013; 52(2): 779-787.
140. Feuerecker B, Pirsig S, Seidl C, Aichler M, Feuchtinger A, Bruchel G, et al. Lipoic acid inhibits cell proliferation of tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther.* 2012; 13(14): 1425-1435.
141. Durand M, Mach N. Alpha lipoic acid and its antioxidant against cancer and diseases of central sensitization. *Nutr Hosp.* 2013; 28(4): 1031-1038.
142. Jeon MJ, Kim WG, Lim S, Choi HJ, Sim S, Kim TY, et al. Alpha lipoic acid inhibits proliferation and epithelial mesenchymal transition of thyroid cancer cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2016; 419(1): 113-123.
143. Carlson D, Smith A, Fischer S, Young K, Packer L. The plasma pharmacokinetics of R-(+)-lipoic acid administered as sodium R-(+)-lipoate to healthy human subjects. *Altern Med Rev.* 2007; 12(1): 343-351.
144. Hill A, Werner J, Rogers Q, O'Neill S, Christopher M. Lipoic acid is 10 times more toxic in cats than reported in humans, dogs or rats. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 2004; 88(1): 150-156.
145. Cremer D, Rabeler R, Roberts A, Lynch B. Safety evaluation of alpha lipoic acid (ALA). *Regul Toxicol Pharmacol.* 2006; 46(1): 29-41.
146. Secretaría de Salud. Proyecto de Norma Oficial Mexicana NOM-030-SSA2-2009, Para la prevención, detección, diagnóstico, tratamiento y control de la hipertensión arterial sistémica. Ciudad de México, Diario Oficial de la Federación. Disponible en: <http://www.dof.gob.mx>
147. Chen R, Lowe L, Wilson JD. Simultaneous quantification of six human cytokines in a single sample using microparticle-based flow cytometric technology. *Clin Chem.* 1997; 43(1): 1749-1756.
148. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase an enzyme function for erythrocyte. *J.B.C.* 1969; 244(22): 6049-6053.
149. Plagia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative characterization of erythrocyte of glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70(1): 158-169.
150. Miller NJ, Rice EC, Davies MJ. Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods Enzymol* 1994; 234(24): 279-293.
151. Li W, Katzmarzyk PT, Horswell R, et al. HbA1c and all-cause mortality risk among patients with type 2 diabetes. *International Journal of Cardiology.* 2016; 202(1): 490-96.

152. Pereira DC, Sant'Ana DL, Gracas CM, et al. Diabetes mellitus: the linkage between oxidative stress, inflammation, hypercoagulability and vascular complications. *Journal of Diabetes and Its Complications*. 2016; 30(1): 738-745.
153. Abdali D, Samson SE, Kumar GA. How effective are antioxidant supplements in obesity and diabetes? *Med Princ Pract*. 2015; 24(1): 201-215.
154. Mohammadi V, Dehghani S, Askari G. Does alpha lipoic acid supplement regulate blood pressure? A systematic review of randomized, double-blind placebo-controlled clinical trials. *International Journal of Preventive Medicine*. 2017; 8(33): 1-5.
155. Xiang G, Pu G, Yue L, Hou J, Sun H.  $\alpha$ -Lipoic acid can improve endothelial dysfunction in subjects with impaired fasting glucose. *Metabolism Clinical and Experimental*. 2011; 60(1): 480-485.
156. Carrier B, Rideout T. Anti-obesity and lipid-lowering properties of alpha lipoic acid. *J Hum Nutr Food Sci*. 2013;1(1): 1-6.
157. Koh EH, Lee SA, Kim EH, Cho EH, Jeong E, Kim DW, et al. Effects of alpha-lipoic acid on body weight in obese subjects. *Amer J Med*. 2011; 124(85): 1-8.
158. Kucukgoncu S, Zhou E, Lucas KB, Tek C. Alpha-lipoic acid (ALA) as a supplementation for weight loss: results from a meta-analysis of randomized controlled trials. *Obesity Reviews*. 2017; 18(1): 594-601.
159. Namazi N, Larijani B, Azadbakht L. Alpha-lipoic acid supplement in obesity treatment: a systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Clinical Nutrition*. 2018; 37(1): 419-428.
160. Khabbazi T, Mahdavi R, Safa J, Pour-Abdollahi P. Effects of alpha-lipoic acid supplementation on inflammation, oxidative stress, and serum lipid profile levels in patients with end-stage renal disease on hemodialysis. *J Ren Nutr*. 2012; 22(1): 244-250.
161. McNeilly AM, Davison GW, Murphy MH, Nadeem N, Trinick T, Duly E, et al. Effect of  $\alpha$ -lipoic acid and exercise training on cardiovascular disease risk in obesity with impaired glucose tolerance. *Lipids Health Dis*. 2011; 10(1): 217.
162. Zhang Y, Han P, Wu N, He B, Lu Y, Li S, et al. Amelioration of lipid abnormalities by lipoic acid through antioxidative and anti-inflammatory effects. *Obesity*. 2011; 19(1): 1647-1653.
163. Glantzounis GK, Tsimoyiannis EC, Kappas AM, Galaris DA. Uric acid and oxidative stress. *Current Pharmaceutical Design*. 2005; 11(32). DOI : [10.2174/138161205774913255](https://doi.org/10.2174/138161205774913255)
164. Ruiz G, Sauki A, Martínez S, Cano C, Vargas ME, García M, et al. Ácido úrico: antioxidante o factor de riesgo cardiovascular. Dos caras de una misma moneda. *Síndrome cardiometabólico*. 2013; 3(1): 1-5.

165. Sun YD, Dong YD, Fan R, Zhai LL, Bai YL, Jia LH. Effect of [R]- $\alpha$ -lipoic acid supplementation on serum lipids and antioxidative ability in patients with age-related macular degeneration. *Ann. Nutr. Metab.* 2012; 60(1): 293–297.
166. Retana-Ugalde R, Vargas LA, Altamirano-Lozano M, Mendoza-Núñez VM. Influence of the placebo effect on oxidative stress in healthy older adults of Mexico City. *J Clin Pharm Ther* 2009; 34(1): 1–7.
167. Gu X, Zhang S, Wu J, Tang Z, Lu Z, Li H, et al. Efficacy and safety of high-dose  $\alpha$ -lipoic acid in the treatment of diabetic polyneuropathy. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2010; (90): 2473–2476.
168. Bao XH, Xu J, Chen Y, Yang CL, Ye SD. Alleviation of podocyte injury: the possible pathway implicated in antiinflammation of alpha-lipoic acid in type 2 diabetics. *Aging Clin. Exp. Res.* 2014; 26(5):483–489.
169. Ahmadi A, Mazooji N. Effect of alpha-lipoic acid and vitamin E supplementation on oxidative stress, inflammation, and malnutrition in hemodialysis patients. *Iran. J. Kidney Dis.* 2013;(7): 461– 467.
170. Sardú S, Santulli G, Santamaria M, Barbieri M, et al. Effects of alpha lipoic acid on multiple cytokines and biomarkers and recurrence of atrial fibrillation within 1 year of catheter ablation. *Am J Cardiol.* 2017; 119(1):1382-1386.
171. Khalili M, Azimi A, Izadi V, Egtesadi S, Mirshafiey A, Sahraian MA, et al. Does lipoic acid consumption affect the cytokine profile in multiple sclerosis patients: a double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial. *Neuroimmunomodulation.* 2014; (21): 291–296.
172. El-Nakib G, Mostafa T. Role of alpha-lipoic acid in the management of anemia in patients with chronic renal failure undergoing hemodialysis. *Int. J. Nephrol. Renovasc. Dis.* 2013; 6(1): 161–168.
173. Mendoza-Núñez VM, Rosado-Pérez J, Santiago-Osorio E, Ortíz R, Sánchez-Rodríguez MA, Galván-Duarte RE. Aging linked to type 2 diabetes increases oxidative stress and chronic inflammation. *Rejuvenation Research.* 2011; 14(1): 25-31.
174. Brody H. The placebo response. *J Fam Pract.* 2000; 49(1): 649–654.
175. Velásquez-Paz A, Téllez-Zenteno JF. El efecto placebo. *Rev Eviden Invest Clin.* 2011; 4(1): 21-35
176. Macedo A, Farré M, Baños JE. Placebo effect and placebos: what are we talking about? Some conceptual and historical considerations. *Eur J Clin Pharmacol.* 2003; 59(1): 337–342.
177. Lam DR, Hernández RP. Placebo and placebo effect. *Revista Cubana de Hematol, Inmunol y Hemoter.* 2014; 30(3): 214-222.

178. Cakatay U. Pro-oxidant actions of  $\alpha$ -lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Medical Hypotheses*. 2006; 66(1): 110-117.

## ANEXO 1



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**  
**UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN GERONTOLOGÍA**



### **CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO**

**“Efecto del ácido alfa lipoico sobre el estrés oxidativo, proceso inflamatorio crónico y productos finales de la glucosilación avanzada en adultos mayores con diabetes mellitus.**

#### **Antecedente y Objetivo**

Se ha demostrado que el consumo constante de ácido alfa lipoico tiene un efecto positivo sobre el grado de control de los pacientes diabéticos, ya que dada su amplia actividad como antioxidante favorece un mejor efecto del tratamiento, por lo que mejoran los niveles de glucosa y disminuye el riesgo de complicaciones en los pacientes. Sin embargo, en población adulta mayor mexicana, este efecto no ha sido investigado de manera formal. Por tal motivo, en el presente estudio se evaluará los efectos beneficios de la administración de ácido alfa lipoico vs placebo, por un periodo de seis y doce meses en pacientes diabéticos.

#### **Procedimiento**

Se invitarán a personas adultas mayores con síndrome metabólico que asisten a consulta al Hospital Regional Ignacio Zaragoza del ISSSTE, para que participen de manera voluntaria al proyecto. A todas las personas incluidas en el estudio se les realizará un examen médico, incluyendo una historia clínica, toma de tres tubos de sangre para mediciones bioquímicas, solicitud de muestra de orina, medición de composición corporal, así como de tensión arterial, antes de iniciar la administración del ácido alfa lipoico y después de seis y doce meses de intervención.

#### **Condiciones para ingresar al estudio**

- Pacientes con diagnóstico clínico de síndrome metabólico.
- Mayores de 60 años, sin distinción de sexo.
- Firmar o poner su huella digital en esta carta de compromiso.

#### **Riesgos**

No existe ningún riesgo para su salud, se ha demostrado que el ácido alfa lipoico es una sustancia segura aprobada para su uso en humanos. Las tomas de muestras sanguíneas serán llevadas a cabo por personal experimentado con material nuevo y desechable.

#### **Beneficios**

Las pruebas **no tendrán ningún costo** y los resultados de glucosa, perfil lipídico, perfil renal, biometría hemática, hemoglobina glucosilada, así como los del examen general de orina se les entregarán a los participantes para el control y vigilancia de su estado de salud.

**Confidencialidad**

Toda la información obtenida es **ESTRICTAMENTE CONFIDENCIAL**, por lo que sólo se le proporcionará al participante y a su médico tratante.

**Preguntas**

Toda duda que tenga durante el tiempo que dura la investigación la podrá consultar con su médico tratante y con los participantes de la Unidad de Investigación en Gerontología.

**Derecho a rehusar**

La aceptación a participar en este estudio es enteramente **VOLUNTARIA**. Por lo que si decide no hacerlo no le afectará en la atención que le brinda el ISSSTE. Asimismo, puede decidir abandonar el estudio en el momento que usted lo considere conveniente.

**CONSENTIMIENTO**

DECLARO QUE HE LEÍDO O ME HAN LEÍDO EN PRESENCIA DE UN FAMILIAR RESPONSABLE EL CONTENIDO DEL PRESENTE DOCUMENTO, COMPRENDO LOS COMPROMISOS QUE ASUMO Y LOS ACEPTO EXPRESAMENTE. POR ELLO, MANIFESTO MI DESEO DE PARTICIPAR EN ESTA INVESTIGACIÓN CON TÍTULO: **EFFECTO DEL ÁCIDO ALFA LIPOICO SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO, PROCESO INFLAMATORIO CRÓNICO Y PRODUCTOS FINALES DE LA GLUCOSILACIÓN AVANZADA EN ADULTOS MAYORES CON SÍNDROME METABÓLICO.** Y FIRMO VOLUNTARIAMENTE ESTE CONSENTIMIENTO INFORMADO.

Al firmar este consentimiento no renuncio a ninguno de mis derechos y he recibido una copia de este impreso.

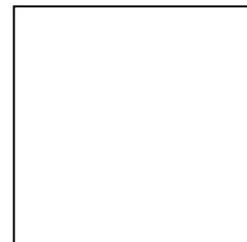
Nombre y firma del participante \_\_\_\_\_

Nombre y firma de un familiar (testigo): \_\_\_\_\_

Nombre y firma del investigador: \_\_\_\_\_

México D.F. a \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ del \_\_\_\_\_.

***En caso de no saber leer y escribir poner huella digital en el cuadro después de haberle leído el documento al participante en presencia del testigo.***





FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES \* Z A R A G O Z A \*  
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN GERONTOLOGÍA

CUESTIONARIO ESTADO DE SALUD Y POLIFARMACIA

Clave:

I. INFORMACIÓN GENERAL

Nombre(s) \_\_\_\_\_ Apellido Paterno \_\_\_\_\_ Apellido Materno \_\_\_\_\_

1. Fecha de nacimiento: \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_

2. Sexo M  F  3. Lugar de nacimiento: \_\_\_\_\_

4. Estado Civil: \_\_\_\_\_ 5. Religión: \_\_\_\_\_

6. Lugar de residencia en los últimos 5 años (marque con una **X** la opción):  
Urbano  Suburbano  Rural  Cd. de México

Especifique el lugar: \_\_\_\_\_

¿Desde hace cuánto tiempo vive ahí? \_\_\_\_\_ años.

7. Escolaridad

- Ninguna
- Sabe leer y escribir
- Primaria completa o incompleta
- Secundaria completa o incompleta
- Bachillerato completo o incompleto
- Carrera técnica completa o incompleta
- Estudios de licenciatura incompletos
- Estudios de licenciatura completos

Número de años de escolaridad \_\_\_\_\_  
Especificar \_\_\_\_\_

8. Ocupación(es) anterior(es): \_\_\_\_\_  
Por más de 5 años

9. Ocupación(es) actual(es): \_\_\_\_\_  
Por más de 2 años

10. ¿Con quién vive?

- Solo
- Esposo(a)
- Hijo(a)(s)

- Nieto(a)(s)
- Otros familiares. Especifique: \_\_\_\_\_
- Amigos
- Otros, especifique: \_\_\_\_\_

11. ¿Con cuántas personas vive?: \_\_\_\_\_

## II. ASPECTOS SOCIOECONÓMICOS

12. Fuentes de ingreso económico:

- Trabaja
- Apoyo del esposo
- Pensión de jubilación
- Pensión de invalidez
- Pensión de viudez
- Apoyo familiar
- Otros

13. Ingreso económico familiar mensual: \$ \_\_\_\_\_

## III. ASPECTOS DE SALUD

14. ¿Tiene alguna(s) enfermedad(es) actualmente? SI  NO   
Si su respuesta es **Sí**, especifique el tiempo de diagnóstico en años o meses

- Diabetes mellitus (tiempo de diagnóstico) \_\_\_\_\_
- Hipertensión arterial (tiempo de diagnóstico) \_\_\_\_\_
- Cardiopatía (tiempo de diagnóstico) \_\_\_\_\_
- Trastornos articulares (tiempo de diagnóstico) \_\_\_\_\_
- Otros, especifique diagnóstico y tiempo \_\_\_\_\_

15. ¿Actualmente consume algún medicamento por largos periodos por alguna enfermedad crónica? (Considerar laxantes, antiácidos, vitamínicos específicos, homeopáticos y herbolaria). (Especificar el número de semanas, meses o años que lleva consumiéndolos en la columna Tiempo de consumo)

Medicamento	Indicado para	Dosis	Indicado por	Tiempo de consumo

16. De acuerdo con la respuesta anterior ¿existe polifarmacia (consume 5 o más medicamentos al día por más de un mes)? SI  NO

17. ¿En los últimos doce meses ha tenido diagnósticos nuevos (Incluyendo padecimientos crónicos, agudos y hospitalizaciones)?

SI  NO

