



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL
ESTADO DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
AREA ACADEMICA DE NUTRICION**

“Efecto Comparativo de la Suplementación de Vitamina C contra Vitamina E sobre el Daño Oxidativo y la Resistencia Física en Ratas Diabéticas.”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
LICENCIADO EN NUTRICION

P R E S E N T A N:
PÉREZ AVILA OFELIA
PLUMA CORTES VIANEY

D I R E C T O R:
DR. ABELARDO CAMACHO LUIS

C O D I R E C T O R:
DR. JOSE ANTONIO MORALES GONZALEZ



Pachuca, Hidalgo Mayo 2008

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Tecnología Farmacéutica del Área Académica de Farmacia, bajo la dirección del Dr. Abelardo Camacho Luis y codirección del Dr. José Antonio Morales González.

Este trabajo fue financiado parcialmente por el donativo de PROMEP UAEHGO-PTC-334 (1er y 2do año), por el PAI – UAEH (55B) y por el PAI – UAEH (57B).

AGRADECIMIENTOS

Gracias Dios por haberme permitido llegar a este momento tan importante de mi vida y por poner en mi camino a personas llenas de buena voluntad.

En primer lugar deseo manifestar mi mas sincero agradecimiento y admiración al Dr. José Antonio y al Dr. Abelardo, por su enseñanza, dedicación, confianza, paciencia, por el apoyo y conocimiento brindado para la realización de esta tesis.

A los distinguidos miembros del jurado quienes dedicaron su tiempo y empeño que con sus críticas y opiniones me ayudaron a enriquecer y fortalecer este trabajo.

Agradezco de todo corazón a mis padres por su apoyo incondicional en el cumplimiento de mis sueños, por su confianza, amor pero sobre todo por su esfuerzo.

En todo momento los llevo conmigo. ¡GRACIAS!

A mis tíos Susy y Pedro, por ser simplemente un ejemplo a seguir, al vencer todo tipo de adversidades, y tener un gran valor de la familia.

A mis hermanas por su compañía y sus interminables consejos, por que se que cuento con ellas siempre.

Jesús gracias por haber llegado a mi vida en el momento indicado por todo tu amor y por la enseñanza y madurez que has forjado en mí.

Y con el orgullo de ser universitario expreso mi reconocimiento a la máxima casa de estudios del estado de Hidalgo que a través de sus catedráticos nos impulsa a construir el futuro para decidir el presente, gracias a todos ellos por hacer lo posible.

Ofelia Pérez Ávila.

...A DIOS:

*Por darme la vida, salud
y fortaleza para terminar
esta etapa de mi vida.*

....A MI MADRE:

*Ma. Luisa por su paciencia, motivación,
esfuerzo y apoyo incondicional para que
terminara mi carrera y simplemente por
haberme dado la vida.*

....A MIS HERMANOS:

*Ma. Eugenia y Arnulfo
por su apoyo y preocupación
hacia mí y por ser parte de mi vida.*

....A DAVID RODRIGUEZ:

*por tu apoyo, paciencia,
comprensión, amor y cuidados*

.....AL DR. JOSE ANTONIO Y ABELARDO

*Por su amistad y por compartir
sus conocimientos y su tiempo
para realizar este proyecto.*

....A MI AMIGA:

*Nubia por su amistad,
apoyo incondicional y
por todos los momentos
que compartimos juntas.*

....A TODOS MIS CATEDRATICOS:

*Por compartir sus conocimientos
durante mi formación académica.*

Vianey Pluma Cortes.

ÍNDICE

I. Resumen	1
II. Marco teórico	
Capítulo 1. Antecedentes de la diabetes mellitus.	
1.1. Etimología.	3
1.2. Definición.....	3
1.3. Signos y síntomas.....	4
1.4. Epidemiología de la diabetes mellitus.....	5
1.5. Etiología.....	6
1.6. Complicaciones de la diabetes y relación con los radicales libres.....	6
Capítulo 2. Clasificación de los radicales libres y su relación con el estrés oxidativo.	
2.1. Radicales libres.....	7
2.2. Fuentes de radicales libres.....	11
2.2.1. Fuentes exógenas.	
2.2.2. Fuentes endógenas.	
2.3. Estrés oxidativo.....	14
2.3.1. Estrés oxidativo y daño a las biomoléculas.	
2.4. Medición del estrés oxidativo.....	18
Capítulo 3 Radicales libres y el ejercicio físico en el paciente diabético.	
3.1. Ejercicio físico.....	19
3.1.1 Ejercicio físico aeróbico.	
3.1.2 Ejercicio físico anaeróbico.	
3.1.3 Acondicionamiento físico.	
3.1.4 Rendimiento físico.	
3.2. Radicales libres y ejercicio físico.....	24
3.3. Radicales libres y ejercicio físico excesivo.....	24
3.4. Entrenamiento y estrés oxidativo.....	25
3.5. Generación de radicales libres durante la contracción muscular.....	25
3.6. Efecto de las EROS en la contracción muscular.....	26

Capítulo 4.- Mecanismos de protección contra el estrés oxidativo.

4.1. Antioxidantes.....	27
4.2. Clasificación de los antioxidantes.....	27
4.2.1 Antioxidantes enzimáticos.	
4.2.2 Antioxidantes no enzimáticos.	

Capítulo 5. Efecto antioxidante de las vitaminas.

5.1. Vitaminas.....	31
5.2. Efecto antioxidante de la vitamina C.....	31
5.3. Efecto antioxidante de la vitamina E.....	33

III. Antecedentes.....

IV. Planteamiento del problema.....

V. Justificación.....

VI. Hipótesis.....

VII. Objetivos.

 Objetivo general..... 43

 Objetivos específicos..... 44

VIII. Metodología.....

1. Diseño de estudio.
2. Delimitación espacial.
3. Delimitación temporal.
4. Material y métodos
5. Animales de experimentación.
6. Grupos experimentales.
7. Inducción a diabetes mellitus
8. Medición de glucosa
9. Suplementación de antioxidantes.
10. Programa de ejercicio físico.
11. Obtención de las muestras.

- a) Determinación de metabolitos en suero.
- b) Ensayo enzimáticos en suero.
- c) Obtención de homogenado total.
- d) Determinación de malonaldeído.
- e) Determinación de la actividad de la superoxidodismutasa.
- f) Determinación de la resistencia física.

IX. Análisis estadístico.....	51
--------------------------------------	-----------

X. Aspectos éticos.....	51
--------------------------------	-----------

XI.- Resultados.

1 Efecto de los antioxidantes en la concentración sérica de glucosa.....	52
2 Efecto de los antioxidantes en la concentración sérica de bilirrubina.	53
3 Efecto de los antioxidantes en la concentración sérica de albúmina.	53
4 Efecto de los antioxidantes en concentración sérica de colesterol.	54
5 Efecto de los antioxidantes en la concentración sérica de ALT.	54
6 Efecto de los antioxidantes en la concentración sérica de AST.	54
7 Efecto de los antioxidantes en la concentración de MDA.	55
En homogenado total de riñón	
En homogenado total de hígado	
En homogenado total de corazón	
En homogenado total de músculo	
8 Efecto de los antioxidantes en la concentración de SOD.....	57
En homogenado total de riñón	
En homogenado total de hígado	
En homogenado total de corazón	
En homogenado total de músculo	
9 Efecto de los antioxidantes en el resistencia físico en rata diabéticas.....	59

XII. Discusión.....	67
XIII. Conclusión.....	72
XIV. Referencias bibliográficas.....	73
XV. Anexos.	
1. Determinación de glucosa.....	83
2. Determinación de bilirrubina	84
3. Determinación de albúmina.....	85
4. Determinación de colesterol.....	86
5. Determinación de ALT	87
6. Determinación de AST.....	88
7. Método de lowry.....	89

INDICE DE TABLAS

TABLA 1.- Valores diagnósticos de diabetes	4
TABLA 2.- Clasificación de la Intensidad del ejercicio físico.....	20
TABLA 3.- Cantidad de vitamina C en mg presente en una porción de alimento.....	32
TABLA 4.- Cantidad de vitamina E en mg presente en una porción de alimento.....	34

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la cadena de transporte electrónico mitocondrial.....	12
Figura 2. Sistemas antioxidantes celulares.....	29
Figura 3. Estructura de la vitamina C.....	32
Figura 4. Estructura de la vitamina E.....	34
Figura 5. Antioxidantes en los niveles de glucosa en ratas diabéticas.....	60
Figura 6. Efecto de los antioxidantes en los niveles de bilirrubina en ratas diabéticas	60
Figura 7. Efecto de los antioxidantes en los niveles de albumina de ratas diabéticas.....	61
figura 8. Efecto de los antioxidantes en los niveles de colesterol de ratas diabéticas.....	61
figura 9. Efecto de los antioxidantes en los niveles de tgo en ratas diabéticas.....	62
Figura 10. Efecto de los antioxidantes en los niveles de GTP en ratas diabéticas	62
Figura 11. Efecto de los antioxidantes en las concentraciones de MDA en muestras de riñón de ratas diabéticas.....	63
Figura 12. Efecto de los antioxidantes en los niveles de MDA en muestras de hígado en ratas diabéticas.....	63
Figura 13.Efecto de los antioxidantes en la concentración de MDA en muestras de corazón de ratas diabéticas.....	64
Figura 14.- Efecto de los antioxidantes en la concentración de los niveles de MDA en muestras de músculo de ratas diabéticas.....	64
Figura 15.- Efectos de los antioxidantes en la concentración de SOD en muestras de riñón de ratas diabéticas.....	65
Figura 16.- Efectos de los antioxidantes en los niveles de SOD en muestras de hígado en ratas diabéticas.....	65
Figura 17 Efecto de los antioxidantes en los niveles de SOD en homogenado total de corazón.	66
Figura 18.- efecto de los antioxidantes en los niveles de SOD en homogenado total de músculo	66
Figura 19.- Efecto de los antioxidantes en la resistencia física.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS.

ADA: American Diabetes Association.

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

ADP: Adenosín-5-difosfato.

ALT: Alanino Aminotransferasa.

ANOVA: Análisis de varianza.

RNA: Ácido ribonucleico.

RNA m: Ácido ribonucleico mensajero.

AST: Aspartato Aminotransferasa.

ATP: 5- Adenosín trifosfato.

DM: Diabetes Mellitus.

DNPH: 2,4-dinitrofenilhidrazina.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

ERN: Especies reactivas de nitrógeno.

EF: Ejercicio físico.

ENSANUT: Encuesta Nacional de Salud y Nutrición.

EROS: Especies Reactivas de Oxígeno.

EOX: Estrés Oxidativo.

GOT: Glutámico-Oxalacético-Transaminasa.

GPx: Glutación peroxidasa.

GS: Glutación sintetasa.

GSH: Glutación reducido.

GSSG: Glutación oxidado.

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno.

MDA: Malondialdehído.

NO•: Óxido nítrico.

NO₂•: Radical nitrógeno dióxido.

NOS: Óxido nítrico sintasa (e-NOS, NOS endotelial; iNOS, NOS inducible; nNOS, NOS neuronal).

O₂: Oxígeno singulete.

O₂^{•-} : Anión superóxido.

OH•: Radical hidroxilo.

OR: Óxidoreductasa.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

RL: Radicales libres.

ROO•: Radical peroxilo.

RPE: Resonancia Paramagnética de electrones.

RPM: Revoluciones por minuto.

SOD: Súper óxido dismutasa.

TBARS: Sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico.

Vit C: Vitamina C.

Vit E: Vitamina E.

I.- RESUMEN.

La diabetes mellitus es una enfermedad no transmisible que tiene como característica presentarse de forma crónica degenerativa, en la cual se muestran alteración en el metabolismo de hidratos de carbono, proteínas y grasas, originando un aumento de glucosa y lípidos sanguíneos (hiperglucemia e hiperlipidemia respectivamente), y es una de las principales causas de morbi-mortalidad. En México se ha observado una tendencia ascendente de esta enfermedad, lo que condiciona que la demanda de hospitalización en los últimos años sea cinco veces mayor que la de otros padecimientos, esto debido a que existe una mayor incidencia de complicaciones, las cuales se producen principalmente por un desequilibrio bioquímico favorecido por la producción excesiva de radicales libres, además se ha observado que durante el ejercicio físico agotador se genera tal cantidad de especies reactivas de oxígeno que las defensas antioxidantes del paciente diabético se ven superadas e incapaces de prevenir el daño que éstas producen.

El objetivo central de este estudio fue comparar el efecto de la suplementación de vitamina E contra Vitamina C sobre el daño oxidativo producido por la diabetes mellitus durante un programa de ejercicio físico en ratas. Para lo cual se utilizaron ratas Wistar de 200 ± 20 g, organizándolos en los siguientes grupos. Grupo control (ratas sanas), Grupo ejercicio físico, Grupo diabético, Grupo diabético + ejercicio físico, Grupo diabético + vitamina C (65mg/Kg.), Grupo diabético + vitamina E (400UI), Grupo diabético + ejercicio físico + vitamina C (65mg/Kg.), Grupo diabético + ejercicio físico + vitamina E (400UI). Se determinaron los niveles séricos de glucosa, albúmina, bilirrubina y colesterol como indicadores de alteraciones fisiológicas provocadas por los RL, se determinó la actividad de Superóxido dismutasa como indicador de la protección de los sistemas antioxidantes en muestras de corazón, riñón, hígado y músculo, también de AST y ALT como marcadores de daño en estos mismos órganos. Igualmente, se determinó la actividad de Malonaldehído como indicador de lipoperoxidación.

Así mismo se pretendió saber si el ejercicio físico regular puede mostrar un efecto protector contra el estrés oxidativo y si la suplementación de alguno de estos antioxidantes incrementa la resistencia físico, entonces esto podría tener un impacto directo en la implementación del ejercicio físico como una modalidad terapéutica en la diabetes, lo que permitirá a los pacientes diabéticos tener una mejor calidad de vida, con un tratamiento interdisciplinario.

Los resultados demostraron que el ejercicio físico por si solo reduce de manera importante los niveles de colesterol y bilirrubina, pero se observa que al ser combinado con un antioxidante, primordialmente con la vitamina C potencializa esta disminución.

Así mismo se muestra disminución en la actividad de MDA y un aumento en la actividad de SOD al suplementar ambas vitaminas, siendo más significativo nuevamente con vitamina C, principalmente en los grupos inducidos con diabetes.

Palabras clave: ***diabetes mellitus, radicales libres, estrés oxidativo, antioxidantes, ejercicio físico, vitamina C, vitamina E.***

SUMMARY.

Diabetes mellitus is a disease that is not transmissible feature presented with chronic degenerative diabetes, which showed alteration in the metabolism of carbohydrates, fats and proteins, causing an increase in blood lipids and glucose (hyperglycemia and hyperlipidemia respectively), and is one of the major causes of morbidity and mortality.

In Mexico there has been a rising trend of this disease, which has affected the demand for hospitalization in recent years. It is five times higher than that other illnesses, because of this there is a higher incidence of complications, which occur mainly by a biochemical imbalance favored by the excessive production of free radicals. Also has been observed that during exhausting physical exercise it generates such a large amount of reactive oxygen species that antioxidant defenses of diabetic patients are overwhelmed and unable to prevent the damage that they produce.

The central objective of this study was to compare the effect of vitamin E supplementation against vitamin C, on oxidative damage caused by diabetes mellitus during an exercise program in rats. To which Wistar rats were used in 200 ± 20g, making the following groups. 1.- Control group (healthy rats), 2.- group physical activity, 3.- diabetic group, 4.- Group diabetic + physical activity, 5.- Group diabetic + Vitamin C (65mg/Kg.), 6.- Group diabetic vitamin E (400UI), 7.- Group diabetic physical activity vitamin C (65mg/Kg.), 8.- Group diabetic physical activity + vitamin E (400UI). They determined the serum levels of glucose, albumin, bilirubin and cholesterol as indicators of physiological changes caused by the RL were determined activity overcame oxide dismutase as an indicator of the protection of antioxidant systems in samples from heart, kidney, liver and muscle also AST and ALT as markers of damage to these organs. Similarly, it determines the activity as an indicator of lipoperoxidation Malonilaldehido.

They also sought to know whether the regular physical exercise may show a protective effect against stress and whether supplementation of any of these antioxidants favored physical performance. Then this could have a direct impact on the use of physical exercise as a therapeutic modality in diabetes, allowing diabetic patients to have a better quality of life, with an interdisciplinary treatment.

The results showed that exercise by itself significantly reduces cholesterol levels and bilirubin, but notes that when combined with an antioxidant, primarily with vitamin C potentiates this decline.

Was a decrease in the activity of MDA and an increase in the activity of SOD supplement to both vitamins, being more meaningful again with vitamin C, especially in groups with induced diabetes

Keywords: *diabetes mellitus, free radicals, oxidative stress, antioxidants, physical exercise, vitamin C, vitamin E.*

II.- MARCO TEORICO.

CAPITULO 1.- ANTECEDENTES DE LA DIABETES MELLITUS.

1.1 ETIMOLOGIA.

Diabetes proviene del latín *diabētes*, y éste del griego διαβήτης (diabetes) que significa "correr a través". Como término para referirse a la enfermedad caracterizada por la eliminación de grandes cantidades de orina (signo clínico referido como "poliuria").

Mellitus también del latín *mellis* que significa miel, hace referencia a que sabe dulce o a miel debido a que en estas personas se encuentra glucosa en la orina y los médicos pasados solían probar la orina para examinarla. ⁽¹⁾

1.2 DEFINICION.

La norma oficial mexicana **NOM-015-SSA2-1994** la define como "un grupo heterogéneo de enfermedades sistémicas, crónicas, de etiología desconocida, con grados variables de predisposición hereditaria y la participación de diversos factores ambientales que afectan al metabolismo intermedio de los hidratos de carbono, proteínas y grasas que se asocian fisiopatológicamente con una deficiencia en la cantidad, cronología de secreción y/o en la acción de la insulina" provocando alteraciones en múltiples órganos. ⁽²⁾ Se caracterizan por hiperglucemia, que es la concentración anormal elevada de glucosa en sangre.

La identificación del paciente con diabetes mellitus se debe llevar mediante la comprobación del diagnóstico, lo cual requiere cualquiera de las siguientes condiciones:

- Elevación de los niveles de glucosa sanguínea en sujetos con cuadro clínico Elevación de glucosa de ayunas en más de una ocasión.
- Curva de tolerancia a la glucosa anormal en más de una ocasión.

De acuerdo con las condiciones y los valores que se señalan en la tabla 1

	Glucemia de Ayuno	Prueba de Tolerancia oral a la glucosa (75 g.)*
DIABETES	PS=>140 mg/dl ST y SC >120 mg/dl	A las 2 horas PS y SC >200 ST > 180
ANORMALIDAD EN LA TOLERANCIA A LA GLUCOSA NORMAL	PS<140 mg/dl	PS y SC entre 40-200 mg/dl
<i>(Intolerancia a la glucosa)</i>	ST y SC <120mg/dl	ST entre 120-180 mg/dl

Criterios de la OMS. ST = Sangre Total Venosa PS = Plasma o suero venosos SC = Sangre capilar

Tabla 1.- Valores diagnósticos de diabetes mellitus. ⁽³⁾

1.3 SIGNOS Y SINTOMAS.

Las características clínicas que resultan de la hiperglucemia, son: poliuria, polidipsia y nicturia; visión borrosa, pérdida de peso, disminución de la fuerza corporal, polifagia, y si la deficiencia de insulina o de su aporte sustitutivo se prolonga, aparecen deshidratación y acidosis. Los signos clínicos incluyen la resequead de las mucosas, la disminución de la turgencia de la piel y la reducción de la masa de tejidos muscular y subcutáneo. ⁽⁴⁾ Estos síntomas y signos, más la presencia de hiperglucemia, confirman el diagnóstico.

1.4 EPIDEMIOLOGIA DE LA DIABETES MELLITUS.

La Diabetes es considerada actualmente como una de las enfermedades más importantes que se deben prevenir, detectar tempranamente y tratar oportunamente, ya que según las últimas cifras del INEGI ocupa el primer lugar de mortalidad en nuestro país. Conjuntamente a esta elevada mortalidad se suma la morbilidad como la principal causa de ceguera en México así como de amputaciones de extremidades inferiores. ⁽⁵⁾

Según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006 (ENSANUT 2006) la prevalencia de diabetes por diagnóstico médico previo en los adultos a nivel nacional fue de 7% y fue mayor en mujeres (7.3%) que en los hombres (6.5%). En el grupo de 50 a 59 años, dicha proporción llegó a 13.5%, 14.2% en mujeres y 12.7% en hombres. En el grupo de 60 a 69 años, la prevalencia fue de 19.2%, 21.3% en mujeres y 16.8% en hombres. ⁽⁶⁾

En relación al ejercicio físico podemos decir que la inactividad física, la ingestión excesiva de energía y macro nutrientes están relacionadas con la aparición de problemas de salud que incluyen obesidad, diabetes, enfermedad coronaria, y varios tipos de cáncer.

Los resultados de la ENSANUT 2006 indican que los adolescentes mexicanos realizan menos ejercicio físico moderado y vigoroso que la deseable. Sólo la tercera parte realiza el tiempo recomendado. ⁽⁷⁾

1.5 ETIOLOGIA.

La clasificación realizada por el comité de expertos de la ADA y la OMS, se hace de acuerdo con las causas de la enfermedad tal así es en la diabetes tipo 1 donde hay deficiencia absoluta de insulina por destrucción de las células β , en la tipo 2 se presenta resistencia a la insulina, la diabetes gestacional se presenta en el inicio del embarazo y generalmente cede después de este. También se llega a presentar por defectos genéticos en la función de las células β , defectos genéticos en la acción de la insulina, enfermedades exocrinas del páncreas como pancreatitis, trauma, cáncer, hemocromatosis, fibrosis quística, pancreatectomía, endocrinopatías como acromegalia, cushing, glucagonoma, feocromocitoma, hipertiroidismo, aldosteronoma, somatostatina.⁽⁸⁾

Existen medicamentos o drogas que predisponen a esta enfermedad como es la pentamidina, ácido nicotínico, glucocorticoides, hormona tiroidea, diazóxido, adrenérgicos beta, tiazidas, fenitoina. Así mismo infecciones como rubéola congénita, citomegalovirus. Formas poco comunes de diabetes auto inmune son el síndrome del hombre rígido, anticuerpos contra el receptor de insulina,⁽⁹⁾

1.6 COMPLICACIONES Y RELACION CON LOS RADICALES LIBRES.

La frecuencia, gravedad y progresión de las complicaciones agudas y crónicas de la diabetes mellitus, están relacionadas con el grado de hiperglucemia, los trastornos metabólicos asociados, la duración de la enfermedad, la exposición a otros factores de riesgo y la carga genética.⁽¹⁰⁾ Se ha observado una relación directa entre los radicales libres y el estrés oxidativo de la diabetes mellitus, una enfermedad inicialmente caracterizada por una pérdida en la homeostasis de la glucosa. Se postula que una regulación anormal en el metabolismo de los peróxidos y los metales de transición, colabora en el establecimiento de la enfermedad, así como en las complicaciones que aparecen a largo plazo.^(11, 12,) Como la neuropatía periférica, neuropatía autonómica, enfermedad macro vascular, neuropatía diabética, enfermedad ocular diabética, disfunción sexual.^(13, 14)

CAPITULO 2. CLASIFICACION DE LOS RADICALES LIBRES Y SU RELACION CON EL ESTRÉS OXIDATIVO.

2.1 RADICALES LIBRES.

Un radical libre es una molécula o fragmento de molécula, que contiene uno o más electrones desapareados en su orbita externa. ⁽¹⁵⁾ Tienen una vida media de milisegundos debido a su gran reactividad, aunque varía según el tipo de radical libre (RL).

Los RL se producen continuamente en el organismo por medio de reacciones bioquímicas de oxido-reducción generalmente a partir de oxígeno, dichas reacciones se conocen como REDOX, que se dan por el metabolismo normal de las células, por los fagocitos, en una reacción inflamatoria⁽¹⁶⁾ y están asociados con la generación de especies reactivas de oxígeno (EROS), que son tóxicas y se consideran responsables del daño oxidativo de macromoléculas como el DNA, lípidos, hidratos de carbono y proteínas.⁽¹⁷⁾ Estas moléculas o átomos altamente reactivos, se encuentran involucrados en el inicio y desarrollo de diversos procesos patológicos como algunos cánceres, diabetes, enfermedades cardiovasculares ⁽¹⁸⁾, evoluciones reumáticas, patologías gastroentéricas y afecciones bronco pulmonares ⁽¹⁹⁾, así como en procesos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer. ⁽²⁰⁾ También están implicados en procesos fisiológicos como en el envejecimiento y el daño causado por el ejercicio físico excesivo. ⁽²¹⁾

Estas especies reactivas se producen en el organismo humano a partir de la reducción de la mayor parte de oxígeno utilizado, convirtiéndose en agua por acción del complejo citocromo-oxidasa de la cadena respiratoria mitocondrial, esta reacción va originando:

❖ O₂⁻ Anión superóxido:

Se genera a partir de la captación de un electrón (e⁻) por una molécula de oxígeno, formado en muchas reacciones de auto oxidación, es poco reactivo, pero potencialmente tóxico, ya que inicia reacciones que dan lugar a otros intermediarios que a su vez son muy reactivos. Puede formarse como producto de muchas reacciones catalizadas enzimáticamente, como en las reacciones de deshidrogenadas flavoproteínicas: xantina oxidasa, aldehído oxidasa, purina oxidasa, también en reacciones no enzimáticas del oxígeno con la cisteína o la riboflavina o bien se produce en la cadena respiratoria mitocondrial. ⁽²²⁾



❖ OH Radical hidroxilo:

Estado de reducción de tres electrones de la molécula de oxígeno. Es la especie más reactiva con una vida media estimada de alrededor de 10⁻⁹ s. Puede generarse *in vivo* como consecuencia de radiaciones de alta energía (rayos X, rayos gamma) provocando fracturas homolíticas del agua corporal, así mismo la luz ultra violeta genera de la división del agua oxigenada 2 moléculas de radical hidroxilo. Otro proceso todavía más importante en la formación del radical hidroxilo es la llamada reacción tipo Fenton debido a su amplia utilización en el ramo de la industria, para el tratamiento de agua residuales ⁽²³⁾



También a partir de agua oxigenada y del radical superóxido puede formarse el radical hidroxilo, por la Reacción de Haber-Weiss.



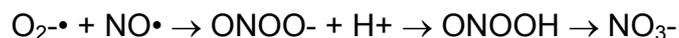
Esta reacción es catalizada por metales como hierro o cobre.

❖ Óxido nítrico (NO•):

El óxido nítrico ha cobrado gran relevancia por la importante función fisiológica que desempeña. Entre ellas, actúa como regulador del flujo sanguíneo local, inhibidor de la agregación plaquetaria, se produce por los macrófagos activados contribuyendo a la defensa inmunitaria primaria y también actúa como neurotransmisor, siendo el cerebro el órgano con mayor actividad óxido nítrico sintasa, además de ser considerado un intermediario tóxico importante por su condición de radical libre.

Su formación tiene lugar por una reacción enzimática en la que la enzima óxido nítrico sintasa cataliza la conversión de L-arginina a L-citrulina dando como subproducto NO• en numerosos tipos celulares. Otro efecto del NO• reside en su capacidad de reacción con el hierro de proteínas intracelulares, principalmente mitocondriales, siendo inactivadas por él la mayoría de las enzimas que poseen un grupo prostético hemo. Entre otros fenómenos puede reaccionar con ácidos nucleicos dando lugar a mutaciones y roturas del DNA y también puede producir necrosis.⁽²⁴⁾

El NO• posee una acción antiinflamatoria importante, a la vez que tiene la capacidad de promover la disfunción celular y tisular a través de un efecto pro inflamatorio.⁽²⁵⁾

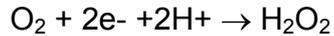
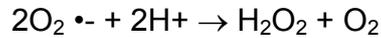


❖ O₂ Oxígeno singulete:

Es una forma excitada del oxígeno molecular. Creado *in vivo* por acción de la luz ultra violeta sobre las moléculas de oxígeno. Su vida media es alrededor de 10⁻⁶ segundos; Puede interaccionar con moléculas de DNA transfiriéndoles su energía de excitación o combinándose químicamente con ellas. Puede formarse en la oxidación del NADPH en los microsomas, en la actividad de varias enzimas como la xantina oxidasa, la lactoperoxidasa, lipooxigenasa y prostanglandinsintetasa, entre otras.⁽²⁶⁾

❖ **H₂O₂ Peroxido de hidrogeno:**

Estado de reducción de dos electrones del oxígeno, formado a partir del radical O₂⁻ por dismutación, o directamente del O₂



Su toxicidad es importante ya que atraviesa fácilmente las membranas. Muchas enzimas producen agua oxigenada a partir de oxígeno: superóxido dismutasa, glucosa oxidasa, la D-aminoácido oxidasa, uricasa, y también puede producirse por reacciones químicas, como la autooxidación del ácido ascórbico catalizada por el cobre. ⁽²⁷⁾ Se convierte en agua por acción de la catalasa, un proceso que determina su vida media.

❖ **Dióxido de nitrógeno (NO₂):**

El dióxido de nitrógeno es un radical libre contaminante producido primariamente a partir de la oxidación del NO• atmosférico. Es un iniciador muy efectivo de la cadena de peroxidación lipídica. ⁽²⁸⁾

2.2 FUENTES DE RADICALES LIBRES (RL).

2.2.1 FUENTES EXOGENAS:

Las fuentes exógenas más importantes en la generación de especies reactivas de oxígeno son:

- ❖ Muchos agentes antineoplásicos tales como la adriamicina, bleomicina, daunorrubicina y algunos antibióticos que dependen de grupos quinoides o de unión a metales para su actividad. Algunos de los efectos de estas drogas se han atribuido a su capacidad para reducir el oxígeno a superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo.⁽²⁹⁾
- ❖ La irradiación de los organismos debido a las radiaciones electromagnéticas (rayos X y gamma) o debido a radiaciones de partículas subatómicas (electrones, protones, neutrones, deuterones y partículas α y β).⁽³⁰⁾
- ❖ Factores ambientales, como contaminantes aéreos fotoquímicos, el incremento en la concentración de oxígeno inspirado, pesticidas, humo del tabaco, poseen radicales libres, o bien se convierten en radicales mediante el metabolismo celular y los procesos de desintoxicación.⁽³¹⁾

2.2.2 FUENTES ENDOGENAS:

- ❖ La cadena de transporte electrónico mitocondrial. (Figura 1)
Es una de las principales fuentes de radicales libres en la célula. Son muchas las patologías en que se ha descrito que la mitocondria genera radicales libres, siendo la causa principal del estrés oxidativo que sufre la célula.

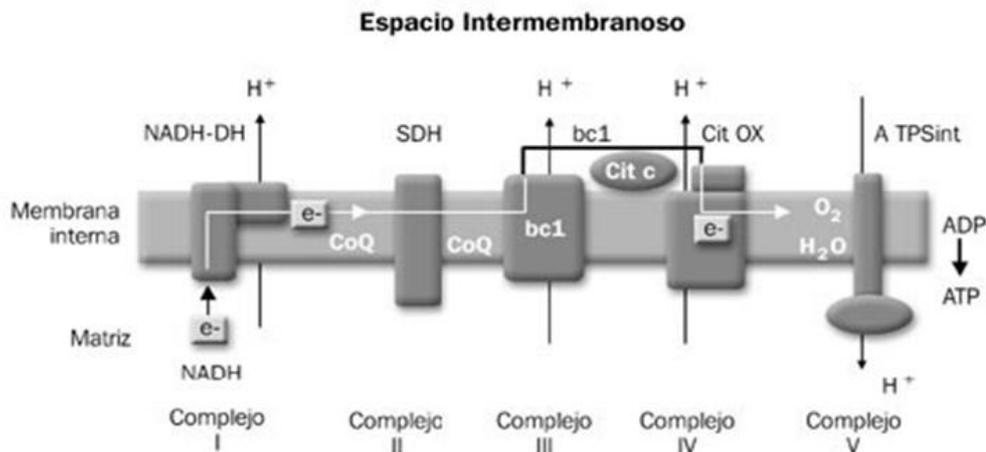


Figura 1. Cadena de transporte electrónico mitocondrial. ⁽³²⁾

Actúa como la principal fuente de RL, siendo su principal origen en tejidos sanos. La reducción del oxígeno hasta agua para producir ATP transcurre durante el metabolismo aerobio mediante la donación de 4 e⁻ al O₂ (reducción tetravalente). Sin embargo el oxígeno puede reducirse de modo monovalente. La mayor parte de los RL generados en la cadena respiratoria mitocondrial se producen por la oxidación de la ubiquinona o del citocromo b. Otras reacciones de óxido-reducción catalizadas por las enzimas NADPH reductasa, la xantino-oxidasa, citocromo C reductasa, deshidrogenasas, que actúan en condiciones fisiológicas y en algunas circunstancias patológicas, también generan RL. En muchos casos hay un escape de RL desde la mitocondria hacia el medio.

❖ Producción de radicales libres en los distintos estados mitocondriales.

Se calcula que entre el 2 y el 5% de los electrones transportados por la cadena electrónica mitocondrial en el estado 4 (cuando todo el ADP está en forma de ATP) no llegan al complejo IV y producen reducciones parciales del oxígeno. ⁽³³⁾ Debido a las propiedades del oxígeno, su reducción tetravalente requiere la transferencia sucesiva de 4 electrones al orbital antienlazante. El citocromo a₃ del complejo IV de la cadena respiratoria es capaz de mantener estrechamente unidas a su centro activo todas las especies parcialmente reducidas del oxígeno hasta que se completa la transferencia de 4 electrones y 4 protones al O₂ y con ello la formación de H₂O. Por tanto, la citocromo c oxidasa perteneciente al complejo IV de la cadena respiratoria no produce este radical. Además, exhibe cierta actividad

superóxido dismutasa. Sin embargo, otros elementos de la cadena de transporte electrónico mitocondrial tienen la capacidad de transferir un electrón directamente al O_2 , pero por el contrario no son capaces de retener el ión superóxido formado. Así pues, se produce $\bullet O_2^-$, que puede dismutar a su vez generando peróxido de hidrógeno, el cual es capaz de atravesar las membranas y salir al citoplasma, donde puede reaccionar con otras especies formando diversos tipos de radicales libres.

La producción mitocondrial del peróxido de hidrógeno fue inicialmente descrita por Jensen en 1966. Estudios posteriores demostraron que la mayor parte del peróxido de hidrógeno mitocondrial, procedía de la dismutación del radical superóxido. Se ha estimado que se producen del orden de 10^{10} moléculas de $\bullet O_2^-$ por célula y por día. ⁽³⁴⁾

Los procesos de formación de anión superóxido son una serie de reacciones no enzimáticas cuya velocidad aumenta linealmente con la concentración de oxígeno presente en el medio.

La producción mitocondrial de especies reactivas de oxígeno aumenta cuando el aporte de sustratos a la cadena de transporte electrónico mitocondrial excede la demanda energética, es decir, en condiciones cercanas al estado 4, en las cuales el cociente ATP/ADP es elevado. En estas condiciones, aumentan la presión parcial de O_2 y el grado de reducción de los transportadores redox de los complejos I, II, y III, con el consiguiente incremento de la producción de especies reactivas de oxígeno. Así pues, el estado reducido de los elementos redox de los complejos I y III también contribuyen al aumento de la velocidad de generación de $\bullet O_2^-$. Puesto que se postula que las mitocondrias se encuentran en un estadio intermedio entre el estado 3 y el estado 4, la generación de especies reactivas de oxígeno por los complejos I y III puede ser de gran importancia en el envejecimiento mitocondrial. ⁽³⁵⁾

2.3 ESTRÉS OXIDATIVO.

2.3.1 ESTRÉS OXIDATIVO Y DAÑO A LAS BIOMOLECULAS.

La formación de radicales libres es un proceso normal e inevitable, ya que son producto de infinidad de reacciones químicas imprescindibles para la vida celular.⁽³⁶⁾ Estas especies tan reactivas, no causan daño oxidativo en condiciones normales debido a que la célula está equipada de mecanismos antioxidantes. Sin embargo, cuando la capacidad de los mecanismos antioxidantes se ve superada por las agresiones oxidativas propiciadas por la producción excesiva de especies reactivas y radicales libres (RL), que provoca desequilibrio bioquímico generando así daño oxidativo a las macromoléculas nos encontramos ante lo que se conoce como estrés oxidativo.

En los pacientes que padecen de diabetes mellitus (DM), se producen cambios en indicadores bioquímicos, como la actividad enzimática de la superóxido dismutasa y de la alanito aminotransferasa, que demuestran una situación de estrés oxidativo (EOX) en donde se incrementa la concentración sanguínea de sustancias reactivas, de esta forma aumenta la susceptibilidad de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) a la oxidación, menor capacidad antioxidante total del plasma y se daña el material genético.

En estas circunstancias, para atenuar el daño que los pro-oxidantes pueden causar en el organismo, está indicado protegerlo incrementando su capacidad antioxidante, esto se puede lograr con la administración de antioxidantes con compuestos orgánicos de manera exógena o bien de fuentes alimentarias.⁽³⁷⁾

2.3.1. ACCIÓN LIPÍDICA.

De los principales tipos de biomoléculas, los lípidos, y sobre todo los ácidos grasos poliinsaturados, son los más susceptibles de ser atacados por radicales libres. Los radicales libres que pueden iniciar esta reacción son: el radical hidroxilo ($\text{HO}\cdot$), el peróxido ($\text{ROO}\cdot$) el alcóxido ($\text{RO}\cdot$) y el alquilo ($\text{R}\cdot$). El proceso de ataque oxidativo, denominado peroxidación lipídica, comienza cuando un radical libre ataca a un carbono de la cadena alifática de un ácido graso, se desprende un átomo de hidrógeno, formando un radical alquilo. Esta reacción se produce preferentemente en los carbonos inmediatos a enlaces dobles de los ácidos grasos poliinsaturados, ya que los radicales formados se pueden estabilizar por resonancia con el enlace doble. Este radical centrado en un átomo de carbono reacciona con el O_2 y forma un radical peróxido, $\text{R-COO}\cdot$. Los radicales peróxido pueden reaccionar con cadenas laterales de otros ácidos grasos poliinsaturados adyacentes, se forma un radical alquilo ($\text{R}'\text{-CH}\cdot$) y un peróxido lipídico (R-COOH), con lo que se propaga la reacción en cadena radicalaria. De esta manera, un solo ataque por un radical libre da lugar a la formación de un gran número de productos de oxidación, sobre todo aldehídos como malondialdehído y 4-hidroxinonal, e hidrocarburos de cadena corta como etano y pentano. Muchos de los aldehídos formados reaccionan rápidamente con los componentes celulares, con lo que causan mutaciones en el DNA, y producen alteraciones estructurales y funcionales al reaccionar con proteínas. La peroxidación lipídica se considera como un factor muy importante en el envejecimiento de células aeróbicas. El daño oxidativo de los lípidos membranales constituye, un factor importante en la disminución de la fluidez de las membranas. Éstas tienen sus dobles enlaces separados por grupos metileno, lo que hace que las uniones C-H sean extremadamente sensibles a la agresión por los RL y las especies reactivas no radicales. Asimismo la peroxidación puede desarrollarse a nivel de macromoléculas circulantes, como es el caso de la LDL. Esto es importante pues la LDL oxidada juega un papel significativo en el inicio y la progresión de la aterosclerosis. ^(38, 39,)

2.3.2 ACCIÓN PROTEICA.

Todos los aminoácidos presentes en las proteínas tienen residuos susceptibles de ser atacados por los radicales libres, sobre todo por el radical hidroxilo. Dentro de los aminoácidos fisiológicos, la tirosina, la fenilalanina, el triptófano, la histidina, la metionina y la cisteína son los presuntamente oxidados dando lugar a aldehídos. ⁽⁴⁰⁾ Esta oxidación puede dar lugar a un cambio conformacional de la proteína y, por tanto, a una pérdida o modificación de su función biológica. En condiciones anaeróbicas, los radicales libres promueven un entrecruzamiento considerable entre proteínas, mientras que en presencia de oxígeno los radicales libres provocan una gran fragmentación de la cadena peptídica. Otro mecanismo de oxidación de proteínas son los llamados “Sistemas de oxidación de función mixta” o “Sistemas de oxidación catalizada por metal”, que poseen como dianas más comunes los residuos de arginina, histidina, lisina, prolina y cisteína. ⁽⁴¹⁾ En los procesos de daño oxidativo a proteínas, algunos aminoácidos como lisina, prolina y arginina, se oxidan dando lugar a grupos carbonilo, de modo que el contenido en carbonilos de las proteínas se puede emplear como un indicador de daño oxidativo a las mismas. Otros aminoácidos como histidina, cisteína y metionina, también sufren daño oxidativo, pero no forman derivados de tipo carbonilo. El daño oxidativo suele ser irreversible y puede conducir a la desnaturalización de la proteína. Se ha propuesto que la oxidación de enzimas por radicales libres, es un paso de marcaje dentro del recambio proteico. ⁽⁴²⁾

2.3.3 ACCION DE ACIDOS NUCLEICOS.

En el ser humano se ha calculado que los radicales libres modifican aproximadamente diez mil bases de DNA por célula cada día. El principal agente nocivo es el radical hidroxilo. Los RL serían capaces de dañar directamente las cadenas de DNA originando su fragmentación, posteriormente modifican las bases nitrogenadas que van a ser incorporadas al DNA, dando lugar a compuestos anómalos del tipo de la deoxiguanosina, capaz de provocar mutaciones, las enzimas reparadoras del DNA son capaces de eliminar la mayoría de las lesiones oxidativas, pero no todas. El daño oxidativo en el DNA mitocondrial es unas 15 veces superior al del DNA nuclear. Esto se debe a la cercanía de dicho DNA al lugar principal de generación de RL en la célula sana que es la cadena de transporte electrónico mitocondrial. Estas alteraciones causan desde deleciones y mutaciones hasta ruptura de cadenas y trastornos estructurales incluyendo aberraciones cromosómicas o pérdida de cromosomas. ^(43,44)

2.3.4 ACCION DE HIDRATOS DE CARBONO.

Los hidratos de carbono (HCO) reaccionan con facilidad con los radicales hidroxilos. La glucosa constituye un captador del radical superóxido, al retenerlo e impedir su acción sobre otras moléculas. La manosa y el manitol son eliminadores del radical hidroxilo. Por ello, se ha observado que diversos polisacáridos actúan como agentes protectores celulares. El daño oxidativo a los HCO toma importancia cuando se trata de polisacáridos de función estructural, ya que los polisacáridos son despolimerizados por los radicales libres dando lugar a procesos degenerativos, un caso es el de el ácido hialurónico cuya función estructural reside en mantener la viscosidad del fluido sinovial, la exposición a agentes oxidantes provoca su fragmentación, lo que conduce a la desestabilización del tejido conectivo y a la pérdida de viscosidad del fluido sinovial, como es el caso de la artritis reumatoide. Se ha observado una relación directa entre los radicales libres y el estrés oxidativo con la diabetes mellitus, una enfermedad inicialmente caracterizada por una pérdida en la homeostasis de la glucosa, así como también, con las complicaciones diabéticas. ^(45, 46, 47)

2.4. MEDICION DEL ESTRÉS OXIDATIVO.

- Determinación de productos terminales de la acción oxidante sobre macromoléculas: los métodos para medir peróxidos lipídicos por ejemplo, son el malondialdehído (MDA).
- Medición de la concentración de antioxidante: que se realiza con la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), sobre material biológico que puede ser plasma, orina o tejido. Para fines prácticos se determinan niveles plasmáticos de los siguientes antioxidantes: vitamina E, B, C, coenzima Q (ubiquinol) y GSH.
- Medición del estado oxidativo: refleja el balance entre el sistema oxidante y pro-oxidante en diversas patologías
- Exhalación de etano y pentano que son productos de hidrocarburos a partir de peróxidos de lípidos.
- Aumento de Glutation oxidado en sangre en un indicador de énfasis oxidativo.⁽⁴⁸⁾

CAPITULO 3 RADICALES LIBRES Y EL EJERCICIO FÍSICO EN EL PACIENTE DIABETICO.

3.1 EJERCICIO FÍSICO.

Los conceptos de actividad física, ejercicio físico y deporte, aunque relacionados entre sí, describen conceptos diferentes.

La Organización Mundial de la Salud define a la actividad física como "todos movimientos que forman parte de la vida diaria, incluyendo el trabajo, la recreación, el ejercicio y las actividades deportivas"⁽⁴⁹⁾

Entonces el ejercicio físico (EF) es una subcategoría de la actividad física, que al ser planificada, estructurada y repetida, prolongan la longevidad, protegen contra el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, hipertensión, obesidad, osteoporosis, cáncer de colon y depresión, el deporte es el ejercicio físico realizado bajo unas reglas y de forma competitiva.⁽⁵⁰⁾

El EF es aceptado mayoritariamente como factor preventivo para ciertas enfermedades y como potencializador de una mejor calidad y mayor expectativa de vida. ⁽⁵¹⁾La práctica regular de EF se asocia con una disminución de la mortalidad global ajustada por la edad y a un aumento de la esperanza de vida en más de 2 años sobre la media poblacional. Puede aumentar la vida media en roedores en un 9% pero no tiene ningún efecto sobre la vida máxima de los animales. Reduce el riesgo de desarrollar enfermedades coronarias o la muerte por esta enfermedad, diabetes mellitus tipo 2, obesidad, hipertensión arterial y distintos tipos de cáncer, disminuye los síntomas de ansiedad y depresión y contribuye a evitar la osteoporosis y a mantener la funcionalidad de las articulaciones. Ciertas formas de ejercicio físico mejoran la función del músculo esquelético y sus propiedades tales como las adaptaciones cardiovasculares y el mantenimiento de la masa corporal activa. Todos estos beneficios del EF aparecen desde un nivel moderado de actividad (tabla 2) y se relacionan directamente con la cantidad de ejercicio físico realizado, lo que permite hacer un balance entre duración e intensidad del ejercicio físico.

En principio, se obtiene igual beneficio con intensidades altas durante poco tiempo, que a la inversa. Sin embargo, las actividades de intensidad elevada están asociadas a un mayor riesgo cardiovascular, de lesión músculo-esquelética y de estrés oxidativo. ^(52, 53, 54)

Intensidad	VO2 max o Frecuencia Cardíaca de Reserva %	% de la Frecuencia Cardíaca máxima	Actividad
Muy Leve	< 25	< 30	Caminar, leer un libro, guiar un carro, ir de compra, boliche, pescar, golf, navegación de placer
Leve	25 - 44	30 – 49	Ciclismo de placer, baile, voleibol, bádminton, calistenia
Moderada	45 – 59	50— 69	Patinaje sobre hielo, esquí en agua, tenis competitivo, alpinismo para novatos, trotar
Intensa	60 – 84	70— 89	Esgrima, "Football de Tocar", Buceo scuba, Básquetbol, Natación (la mayoría de los estilos)
Muy Intensa	>85	> 90	"Handball", "squash", esquí de campo travesía, "Paddleball", correr (paso rápido)
Exesivo	100	100	correr maratón, entrenamientos prolongados

Tabla 2. Clasificación de la Intensidad del ejercicio físico.⁽⁵⁵⁾

La intensidad se refiere al por ciento de la capacidad máxima del ejercicio a practicarse. Representa la presión fisiológica bajo el cual se somete el individuo. La clasificación de la intensidad esta diseñada a base del por ciento de la frecuencia cardíaca máxima de reserva (FC_{máx-reserv}) del ejercicio durante un período de 30 a 60 minutos

3.1.1 EJERCICIO FÍSICO AEROBICO.

El ejercicio aeróbico incluye cualquier tipo de ejercicio que se practique a niveles moderados de intensidad durante periodos de tiempo extensos, lo que hace mantener una frecuencia cardíaca más elevada. ⁽⁵⁶⁾

Durante la realización de este tipo de ejercicio, el organismo utiliza una gran cantidad de oxígeno como combustible, produciendo adenosín trifosfato (ATP), el cual es el principal elemento transportador de energía para todas las células, durante el ejercicio aeróbico, el glucógeno se rompe para producir glucosa pero sin embargo, cuando éste escasea, la grasa empieza a descomponerse. Este último es un proceso lento, y está acompañado de una disminución en el rendimiento. ⁽⁵⁷⁾

Las ventajas que se obtienen de la práctica de este tipo de ejercicio son:

- Mejora la función cardiovascular coronaria y reduce la mortalidad por esta enfermedad.
- Reduce grasa corporal
- Disminuye a mediano plazo, la presión sanguínea
- Baja los niveles de colesterol total en sangre, así como los de colesterol LDL o "colesterol malo" y de los triglicéridos y aumenta el colesterol HDL o "colesterol bueno", reduciendo el riesgo de un ataque cardíaco.
- Reduce los niveles sanguíneos de glucemia en los diabéticos.
- Mejora la capacidad pulmonar, la circulación en general y el aprovechamiento del oxígeno no solo por los músculos, sino también por los órganos internos y la piel, lo cual se refleja en mayor capacidad para realizar esfuerzos y mejoría en las funciones digestivas, renales, inmunológicas, endocrinas, el estado de ánimo, el sueño y de las funciones mentales superiores.
- Reafirma los tejidos
- Aumenta la reabsorción de calcio por los huesos,
- Disminuye los niveles circulantes de adrenalina, y aumenta los niveles de endorfinas. ⁽⁵⁸⁾

Los ejercicios aeróbicos más comunes son caminar, trotar, nadar, bailar, esquiar, pedalear y los llamados aeróbicos. ⁽⁵⁹⁾

La intensidad del ejercicio aeróbico se puede medir con relación al volumen de oxígeno máximo consumido por el cuerpo. Pero para fines prácticos, la intensidad se calcula con la frecuencia de las pulsaciones cardíacas por minuto. ⁽⁶⁰⁾

La frecuencia máxima o número máximo de pulsaciones por minuto (NPM) que puede alcanzar un corazón sano con seguridad, se calcula mediante una constante de 220 (para hombres) y 210 (para mujeres) a la cual se le resta la edad, es decir:

$$\text{NPM para hombres} = 220 - \text{Edad}$$

$$\text{NPM para mujeres} = 210 - \text{Edad}$$

Se considera ejercicio aeróbico suave al realizado con una media del 55% al 60% del número máximo de pulsaciones (NMP), moderado al realizado entre el 60% - 75%, y fuerte al ejecutado entre 75% y 85%. Por encima del 85% del NMP se grega un gran componente anaeróbico. Los mayores beneficios se logran con el ejercicio aeróbico moderado. ⁽⁶¹⁾

3.1.2 EJERCICIO FISICO ANAEROBICO.

Anaeróbico significa "sin aire", y hace referencia al intercambio de energía sin oxígeno en un tejido vivo, comprende actividades breves basadas en la fuerza, es una actividad breve y de gran intensidad donde el metabolismo anaeróbico tiene lugar en los músculos, Los músculos que son entrenados bajo el ejercicio anaeróbico se desarrollan de manera diferente a nivel biológico, adquiriendo más rendimiento en actividades de corta duración y gran intensidad. ⁽⁶²⁾

Hay dos tipos de sistemas anaeróbicos de energía: el sistema ATP-PC, que usa fosfato de creatina durante los primeros diez segundos del ejercicio, y el sistema

del ácido láctico (o glucólisis anaeróbica), que usa glucosa en ausencia de oxígeno. El último consiste en un uso ineficiente de la glucosa y produce subproductos que perjudican la función muscular. El sistema del ácido láctico es el dominante durante tres minutos, pero también proporciona una cantidad significativa de energía en el ejercicio aeróbico, ya que los músculos tienen una determinada capacidad de deshacerse de los subproductos del sistema anaeróbico; esta capacidad puede mejorarse con el entrenamiento. ⁽⁶³⁾

Son ejemplos de ejercicio anaeróbico: el levantamiento de pesos, los sprints y los saltos; cualquier ejercicio que consista de un esfuerzo breve es un ejercicio anaeróbico. ⁽⁶⁴⁾

3.1.3 ACONDICIONAMIENTO FÍSICO.

El acondicionamiento físico es el desarrollo de la suma de cualidades físicas básicas importantes para el rendimiento. Las cualidades físicas son: Fuerza, resistencia, velocidad y flexibilidad. ⁽⁶⁵⁾

3.1.4 RENDIMIENTO FÍSICO.

El rendimiento físico de un deportista está íntimamente ligado al Metabolismo energético, que en función del tipo de actividad deportiva, duración e intensidad va tener unas claves diferentes. ⁽⁶⁶⁾

Así el tipo de producción de energía mayoritario va a estar en relación con la intensidad del ejercicio y puede estar en relación con el metabolismo anaeróbico o aeróbico, pero tanto cuando hablamos del aeróbico (directamente) como del anaeróbico (indirectamente a través de la velocidad de recuperación de ese esfuerzo puntual), todos ellos son dependientes del oxígeno y más específicamente del Consumo Máximo de Oxígeno. Vemos por tanto que existe una relación directa entre oxígeno y la resistencia física. ⁽⁶⁷⁾

3.2 RADICALES LIBRES Y EJERCICIO FÍSICO.

El ejercicio físico moderado tiene una gran cantidad de efectos benéficos, pero por otra parte, el ejercicio físico excesivo en sujetos no entrenados, puede generar estrés oxidativo. En 1954, Commoner utilizando la resonancia paramagnética de electrones detectaron radicales libres en músculo esquelético. Desde entonces se ha despertado un gran interés en el papel que las especies reactivas de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno (ERO y ERN) juegan en la regulación de la función muscular y del daño asociado al ejercicio físico. ⁽⁶⁸⁾

3.3 RADICALES LIBRES Y EJERCICIO FÍSICO EXCESIVO.

El ejercicio físico puede participar en el desequilibrio entre agentes prooxidantes y antioxidantes. Commoner en 1954 fue el primero en detectar radicales libres en el músculo esquelético a través de la resonancia magnética. En 1978 se estudió el efecto del ejercicio físico sobre el daño oxidativo tisular, se comprobó que en humanos el ejercicio físico intenso aumentaba el contenido de pentano (producto de lipoperoxidación) en aire expirado. ⁽⁶⁹⁾ Cuatro años más tarde Kelvin Davies en California detectó una señal RPE (Resonancia Paramagnética de electrones) en homogenados de músculo gastrocnemio de rata. Ellos observaron que el ejercicio físico hasta el agotamiento en tapiz rodante doblaba la señal RPE. Las medidas fueron también hechas en animales que habían sido ejercitados únicamente durante la mitad del tiempo necesario para llevarlos al agotamiento; la señal RPE obtenida de los músculos fue la intermedia entre el grupo ejercitado hasta el agotamiento y el grupo reposo. ⁽⁷⁰⁾ En 1985, en la Universidad de Liverpool, el grupo de Jackson midió señales RPE en músculo congelado, de la pierna, de ratones y ratas y en músculo abdominal de humanos. Detectaron un 70% de aumento en la señal RPE en el gastrocnemio de los animales que habían sido estimulados eléctricamente durante 30 minutos con contracciones repetitivas. Este régimen de contracciones indujo daño en la membrana de las células musculares medido por la actividad en plasma de la enzima cretinquinasa. ⁽⁷¹⁾

Estas publicaciones promovieron una serie de trabajos que intentaron clarificar si los radicales libres podían ser responsables del daño muscular que se observa después del ejercicio físico intenso.

Este se manifiesta en un daño oxidativo a distintos niveles: músculo esquelético, cardíaco, hígado y sangre. Uno de los marcadores de estrés oxidativo más utilizados ha sido el cociente Glutacion oxidado/reducido (GSSG/GSH) cuyo aumento se ha constatado tanto en músculo esquelético, como en sangre y no sólo en animales, sino también en humanos. ⁽⁷²⁾

Con respecto a la peroxidación lipídica, los estudios realizados indican que ésta aumenta en ejercicio físicos tanto aeróbicos como anaeróbicos.

3.4 ENTRENAMIENTO Y ESTRÉS OXIDATIVO.

Hasta el momento nos hemos centrado en los efectos nocivos de los radicales libres generados durante el ejercicio físico excesivo. Sin embargo, el ejercicio físico, sobre todo cuando no es excesivo (referencia a la figura 4). Resulta una práctica claramente sana y benéfica para la prevención de muchas enfermedades. Los efectos indeseables del ejercicio físico excesivo se evitan, al menos en parte, con el entrenamiento. Éste reduce la susceptibilidad del músculo a los radicales libres e induce la aparición de enzimas antioxidantes.

3.5 GENERACION DE RADICALES LIBRES DURANTE LA CONTRACCION MUSCULAR.

La producción de radical superóxido en el músculo esquelético en reposo es pequeña, sin embargo ésta se acelera durante la actividad contráctil. Se apunta hacia el radical superóxido y el peróxido de hidrógeno como las especies reactivas que se detectan con mayor frecuencia. El radical hidroxilo, sin embargo, dada su elevada reactividad y su baja vida media, es prácticamente indetectable en el músculo en condiciones basales. Éste aumenta cuando el ejercicio físico se realiza hasta el agotamiento y está más relacionado con la fatiga muscular. ⁽⁷³⁾

3.6 EFECTO DE LAS EROS EN LA CONTRACCIÓN MUSCULAR.

Los bajos niveles de EROS presentes en condiciones basales son esenciales para la producción de fuerza. Una depleción selectiva de las ERO en músculo no fatigado, utilizando SOD o catalasa provoca una caída en la fuerza de la contracción. Por otra parte, un modesto incremento de las EROS provoca un aumento en la fuerza. Este efecto positivo revierte a concentraciones más elevadas de EROS; la caída en la fuerza es dependiente en este caso de la dosis y del tiempo de aplicación. Estos efectos negativos pueden ser prevenidos pretratando los músculos con antioxidantes o administrando agentes reductores.

El aumento en la producción de EROS que ocurre durante el ejercicio físico agotador contribuye a la aparición de la fatiga. Los radicales libres en el músculo se generan más rápidamente de lo que pueden ser neutralizados por los antioxidantes endógenos. Cuando las EROS se acumulan en el músculo en contracción, inhiben su producción de fuerza. El efecto es análogo al descenso en la fuerza que ocurre en los músculos no fatigados cuando se les expone a elevados niveles de EROS.⁽⁷⁴⁾ En la misma línea, el efecto de los radicales libres en músculo fatigado puede ser minimizado cuando éste se pretrata con antioxidantes. Otros factores pueden también incrementar la cantidad de EROS en el músculo. La edad parece aumentar la cantidad de oxidantes a los que se ve expuesto el músculo. El daño muscular producido por la reperfusión o el estiramiento también induce una situación de estrés oxidativo asociada a una pérdida de la función muscular. Por último los músculos pueden experimentar un estrés oxidativo en procesos inflamatorios entre los que se incluyen: miopatías, sepsis, hipertermia maligna y fallo cardíaco.^(75.)

CAPITULO 4.- MECANISMOS DE PROTECCION CONTRA EL ESTRÉS OXIDATIVO

4.1 ANTIOXIDANTES.

Para equilibrar la respuesta oxidante el organismo dispone de una serie de sistemas antioxidantes que contrarrestan la generación de RL. Un antioxidante es una entidad química que a bajas concentraciones, y en comparación con el oxidante, retarda o previene la oxidación de un sustrato, como lípidos, proteínas, hidratos de carbono y DNA. ⁽⁷⁶⁾

Los antioxidantes pueden actuar de las siguientes formas:

- Previniendo la formación de EROS.
- Interceptando el ataque de EROS.
- Secuestrando los metabolitos reactivos y convirtiéndolos en moléculas menos reactivas
- Amplificando la resistencia de las dianas biológicas sensibles al ataque de EROS.
- Facilitando la reparación del daño causado por EROS.
- Manteniendo un ambiente favorable para la actuación de otros antioxidantes. ⁽⁷⁷⁾

4.2 CLASIFICACION DE LOS ANTIOXIDANTES.

Desde el punto de vista bioquímico los antioxidantes se clasifican en antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. El primer grupo trabaja sobre la cadena del radical el cual inhibe los mecanismos de activación, el segundo grupo neutraliza la acción de los radicales libres ya formados y esto detiene la cadena de propagación, cuya función se describe enseguida y se puede observar en la figura 2.

4.2.1 ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICOS:

Previenen la formación de nuevas especies de radicales libres. Estos antioxidantes actúan por conversión de los radicales libres existentes en moléculas menos dañinas, o impidiendo su formación desde otras moléculas. Limitan la disponibilidad de hierro necesario para la formación del radical OH•. ⁽⁷⁸⁾

Superóxido dismutasa (SOD) :Bajo este nombre se incluye a una familia de metaloproteínas ampliamente distribuida en la naturaleza, presente en todas las células eucariotas, e incluso en algunas bacterias anaeróbicas estrictas y facultativas. Su actividad fue descrita por primera vez por McCord en 1969. La superóxido dismutasa (SOD) transforma el radical superóxido en peróxido de hidrógeno, constituyendo el primer medio natural de defensa. ⁽⁷⁹⁾

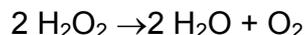


Cabe destacar que el radical superóxido es inestable en medio acuoso y dismuta espontáneamente formando H₂O₂. Sin embargo, la velocidad de dismutación espontánea no enzimática es relativamente baja (a pH fisiológico, está alrededor 2x10⁵ M⁻¹s⁻¹). La catálisis de la reacción de dismutación llevada a cabo por la enzima superóxido dismutasa incrementa esta velocidad del orden de 10.000 veces. ⁽⁸⁰⁾

Glutación peroxidasa (GPX): Convierte el peróxido de hidrógeno y los peróxidos lipídicos en moléculas inofensivas antes de que puedan formar radicales libres.

La mayor parte de la actividad glutación peroxidasa se encuentra en el citosol, aunque también está presente en la matriz mitocondrial. Existen dos tipos de glutación peroxidasa, una selenio dependiente, y otra que no contiene selenio. La glutación peroxidasa selenio dependiente es una proteína tetramérica, con cuatro átomos de selenio. Su actividad se ve muy afectada por el contenido en selenio de la dieta. Es capaz de catalizar tanto la reducción de peróxido de hidrógeno como de peróxidos orgánicos. La glutación peroxidasa no-selenio dependiente sólo tiene actividad frente a peróxidos orgánicos.

Catalasa: Participa en la eliminación del peróxido de hidrógeno, dando lugar a agua y a una molécula de oxígeno.



También es capaz de catalizar ciertas reacciones de peroxidación en presencia de H_2O_2 , actuando sobre algunos alcoholes, aldehídos y ácidos orgánicos como sustratos.



Se halla principalmente en los peroxisomas, aunque en años recientes se ha descrito cierta actividad catalasa también en mitocondrias y citosol. Proteínas de unión a metales (GR) que frenan la disponibilidad del Fe, necesario para la formación del radical OH. ⁽⁸¹⁾

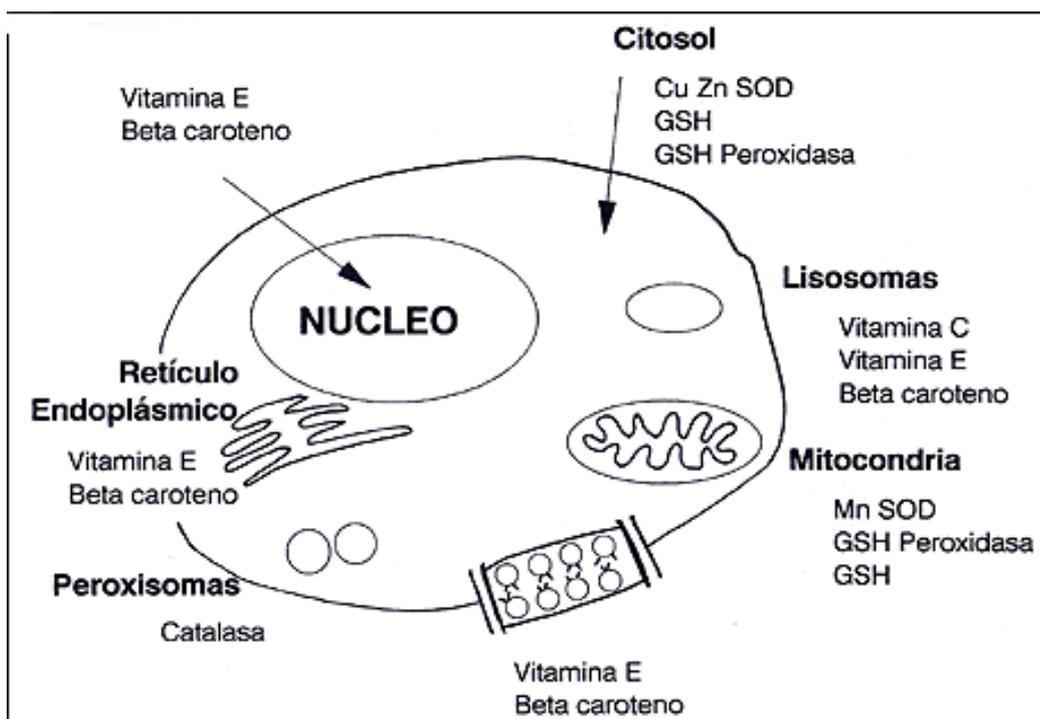


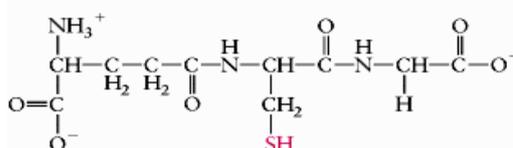
Figura 2. Sistemas antioxidantes celulares. ⁽⁸²⁾

Existen sistemas celulares encargados de la protección contra oxidantes que funcionan en forma coordinada, entre los que se cuentan sistemas enzimáticos (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa) y sistemas no enzimáticos (vitamina A, vitamina E, glutatión (GSH), etcétera). Cuando la producción de especies reactivas sobrepasa la capacidad de las defensas antioxidantes, el organismo queda expuesto a sufrir daño por oxidantes.

4.2.2 ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS:

Son captadores de radicales libres que intervienen cuando hay superproducción de radicales libres y los sistemas enzimáticos están desbordados, previniendo así las reacciones en cadena.

- **Glutation:** Es el tiol no proteico más abundante en las células de mamíferos. Fue descubierto por Hopkins en 1921 y está constituido por 3 aminoácidos: ácido glutámico, cisteína y glicina. Su estructura le confiere funcionalidad amplia e importante en la célula como protegerla frente al ataque oxidativo, ya sea por radicales libres, peróxidos u otros agentes nocivos como las radiaciones.



El glutatión se puede encontrar en 2 formas según su estado de oxidorreducción:

Como GSH o glutatión reducido, o como GSSG o glutatión oxidado que está compuesto por 2 moléculas de GSH unidas por un puente disulfuro entre las cisternas. ⁽⁸³⁾

- **Antioxidantes hidrofílicos:** entre los que se encuentran la vitamina C, ácido úrico, bilirrubina y albúmina.
- **Antioxidantes lipofílicos:** entre los que se encuentran la vitamina E, A y las ubiquinonas.

CAPITULO 5.- EFECTO ANTIOXIDANTE DE LAS VITAMINAS

5.1 VITAMINAS

Componentes esenciales dentro del sistema de intercambio metabólico. Tienen amplias funciones como enzimas o promotoras de ellas. Son compuestos inorgánicos que de manera exógena se pueden administrar en forma de fármaco.

5.2 EFECTO ANTIOXIDANTE DE LA VITAMINA C

Es quizá el menos tóxico de los antioxidantes naturales. Es soluble en agua y se encuentra en concentraciones elevadas en muchos tejidos, el plasma contiene alrededor de 60 $\mu\text{mol/L}$. Las plantas y la mayoría de los animales pueden sintetizarla a partir de la glucosa, pero los humanos, otros primates superiores y los cobayas no poseen uno de los enzimas imprescindibles para su síntesis, teniendo que ser incorporada con la dieta.

Cuando reacciona con EROS se oxida a dihidroascorbato que será reciclado a ácido ascórbico por el enzima dihidroascorbato reductasa. Por ello, el dihidroascorbato se encuentra en concentraciones mucho más bajas que el ascorbato.⁽⁸⁴⁾ Esta vitamina es efectiva contra el radical anión superóxido, el peróxido de hidrógeno, el radical hidroxilo y el oxígeno singlete. En solución acuosa también puede reaccionar con especies de nitrógeno reactivas, previniendo la nitración de moléculas diana. La vitamina C es una molécula que posee tanto propiedades antioxidantes como prooxidantes, dependiendo de la concentración de hierro tisular, aunque no ha podido demostrarse su efecto prooxidante in vivo.⁽⁸⁵⁾ Cuando la cantidad es baja, ejerce un efecto antioxidante, uniéndose al radical superóxido o hidroxilo y formando radical semihidroascorbato, que posteriormente es reducido por el glutatión. Sin embargo, en condiciones de alta concentración tisular de hierro, el ácido ascórbico es capaz de catalizar la reacción de Fenton y por lo tanto, generar Ion ferroso, que a su vez facilita la producción de radical hidroxilo.⁽⁸⁶⁾

Todas las frutas y verduras contienen alguna cantidad de vitamina C. Los alimentos que tienden a ser las mayores fuentes de vitamina C son, entre otros: el pimiento verde, las frutas y jugos de cítricos, las fresas, tomates, brócoli, nabos y otras verduras de hoja verde, la papa, camote y el melón. ⁽⁸⁷⁾ Se ha demostrado que la biodisponibilidad de la vitamina C es similar tanto en los alimentos naturales, como en los artificiales.

Alimento	Porción	Vitamina C mg. (miligramos)
Jugo de naranja	1 copa (220 ml)	124
Pimiento rojo	1 pimiento	225
Pimiento verde	1 pimiento	120
frutillas	1 copa	105
arándano rojo - Jugo	1 copa (220 ml)	107
coles de Bruselas	1 copa	95
Brócoli (hervido, colado y sin sal)	1 taza	90
kiwi	1 fruto (75 gr.)	70
Coliflor (hervido, colado y sin sal)	100 gr.	50
moras (crudas)	1 taza (180 g.)	30
tomate (rojo, crudo)	180 g.	23

Tabla 3.- Cantidad de vitamina C en miligramos (mg) presente en una porción de alimento. ⁽⁸⁸⁾

Estudios de Bendich en 1997, indican que las dosis de vitamina C altas (más de 600 mg/día) son seguras y libres de efectos secundarios. El impulso fundamental para la investigación de las funciones de la vitamina C, aparte de prevenir, fue la publicación por Linus Pauling del libro “Vitamin C, the common cold and the flu”. El autor hizo que se iniciara una nueva era en el estudio del papel de la vitamina C, y de las vitaminas en general. Bendich ha señalado para esta era el nombre de “más allá de la deficiencia”, en el hecho de que las vitaminas sirven para algo más que prevenir deficiencias.

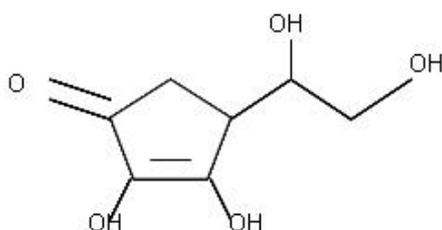


Figura 3. Estructura de la Vitamina C. ⁽⁸⁹⁾

5.3 EFECTO ANTIOXIDANTE DE LA VITAMINA E.

Bajo esta denominación se incluye una familia de compuestos fenólicos llamados tocoferoles y tocotrienoles. En el organismo existen 4 tipos principales de tocoferoles: alfa, beta, gamma y delta tocoferol. Estos grupos de compuestos altamente lipofílicos, tienden a concentrarse en las membranas biológicas y en lipoproteínas plasmáticas.

Es antioxidante del organismo con gran importancia debido a su capacidad como bloqueador de la cadena de lipoperoxidación. La vitamina E secuestra radicales peroxil lipídicos dando hidroperóxidos lipídicos y radical tocoperoxilo. Este último puede ser reducido por el ascorbato y el glutatión oxidado a la respectiva quinona. El alfa-tocoferol es el antioxidante más eficiente de la fase lipídica. Contiene grupos metilo adyacentes a los grupos hidroxilo fenólicos y están óptimamente posicionados en las membranas. Los tocoferoles además tienen capacidad de captar energía del oxígeno singlete y de interaccionar con peroxinitritos.

Los niveles de vitamina E en plasma en humanos son de alrededor de 22 μ moles/L; se encuentra en tejidos como el hígado, el riñón, tejido adiposo o adrenal.⁽⁹⁰⁾

La dieta humana está compuesta por multitud de alimentos que contienen vitamina E. Las fuentes alimentarias ricas de vitamina E son los aceites vegetales (girasol, maíz, de soya), y productos hechos a partir de estos aceites canola, margarina o la mayonesa. Contribuyen considerablemente a los suplementos en vitamina E el germen de trigo, las nueces y algunos vegetales de hojas verdes, como las espinacas, perejil, apio.⁽⁹¹⁾

Alimento	porción	mg (miligramos)	UI
Aceite de germen de trigo	1 cucharada	20.3	30.5
Cereales de germen de trigo	1 1/3 taza	14	20.25
Semillas de girasol tostadas, con sal	1/4 taza	8.4	12.525
Nueces, almendras,	30 gramos	7.3	10.995
Espinaca congelada, picada, cocida, sin sal	1 taza	6.7	10.095
Aceite vegetal (girasol, linoleico 65%)	1 cucharada	5.6	8.385
Tomate enlatado, salsa	1 taza	5.1	7.65

Leche soja	1 taza	3.3	4.965
Brócoli congelado, picado, cocido sin sal	1 taza	2.4	3.645
Aceite vegetal, canola	1 cucharada	2.4	3.585
Mango	1	2.3	3.48
Jugo de zanahoria , enlatado	1 taza	2.7	4.11
Maníes, tostados, con sal	30 gramos	2.2	3.315
Espárragos congelados, cocidos, sin sal	1 taza	2.2	3.24
Aceite de maní	1 cucharada	2.1	3.18
Aceite de oliva	1 cucharada	1.9	2.91
Leche de soja	1 taza	3.3	4.965
Aceite de soja	1 cucharada	1.7	2.475

Tabla 4. Cantidad de vitamina E en miligramos (mg) presente en una porción de alimento. ⁽⁹²⁾

De las revisiones efectuadas podemos concluir los siguientes puntos:

1. La toxicidad de la vitamina E es muy baja, pero aumenta proporcionalmente con la dosis utilizada.
2. Estudios en animales muestran que la vitamina E no es mutagénica, carcinogénica o teratogénica. ⁽⁹³⁾
3. En estudios hechos a doble ciego, las dosis orales tienen pocos efectos colaterales, incluso a dosis tan elevadas como 3.2 g/día. ⁽⁹⁴⁾
4. Dosis de hasta 1000 mg por día son consideradas enteramente seguras y sin efectos secundarios. ⁽⁹⁵⁾
5. En personas con defecto de coagulación sanguínea por deficiencia en vitamina K puede estar contraindicado las altas dosis de vitamina E vía oral. ⁽⁹⁶⁾

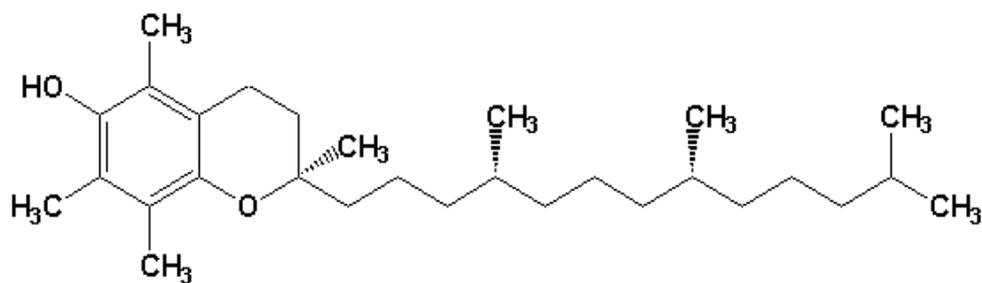


Figura 4. Estructura de la vitamina E. ⁽⁹⁷⁾

III. ANTECEDENTES

Durante el ejercicio físico moderado el consumo de oxígeno se incrementa unas 8-10 veces, y el flujo de oxígeno a través de los músculos se puede incrementar unas 90-100 veces. Incluso el ejercicio físico moderado puede incrementar la producción de radicales libres y abrumar las defensas antioxidantes, resultando en un estrés oxidativo.

Se demostró primero en 1978 por Dillard y cols que en humanos, incluso el ejercicio físico de moderada intensidad incrementaba el contenido de pentano, un subproducto de la peroxidación de los lípidos, en el aire espirado.⁽⁹⁸⁾

En ratas el ejercicio físico exhaustivo en cinta ergométrica incrementaba de 2 a 3 veces la concentración de radicales libres en el músculo y en el hígado. El primer trabajo sobre radicales libres (RL) demostró que en colorantes inocuos en condiciones normales, se vuelven tóxicos en presencia de oxígeno y de una luz intensa. Esta observación llevó a proponer que el oxígeno puede adoptar un “estado de excitación” mediante un cambio de su estructura electrónica. Esta activación del oxígeno produce RL, debido a que la molécula de este gas se reduce gradualmente, es decir gana electrones de uno en uno, con lo cual se forman fragmentos moleculares con un electrón no apareado y muy alta reactividad.

En estudios de las causas implicadas en la aparición de la DM, se ha demostrado que altos valores de glucemia conducen al EOX. Esto se debe a que la glucosa se auto oxida y da a lugar a la formación de alfacetoaldehidos, peroxido de hidrogeno y radical súperoxido, entre otras EROS.⁽⁹⁹⁾

La diabetes es un problema de salud a nivel mundial que predispone a un marcado incremento en la mortalidad por causas cardiovasculares y a serios problemas de morbilidad y mortalidad relacionados con el desarrollo de nefropatías, neuropatías y retinopatías. La prevalencia de la diabetes tipo 2 entre los adultos varía desde menos del 5% a más del 40% dependiendo de la población en cuestión. Debido al incremento de la obesidad, el sedentarismo y los malos hábitos alimentarios tanto en occidente como en los países en vías de desarrollo, la prevalencia de la diabetes tipo 2 está creciendo a una tasa exponencial. ⁽¹⁰⁰⁾

El aumento en el EOX medido a través de índices de peroxidación de lípidos y oxidación de proteínas ha mostrado incrementarse tanto en la diabetes tipo 1 como en la diabetes tipo 2. ⁽¹⁰¹⁾

E incluso en pacientes sin complicaciones. También se ha mostrado que en la diabetes hay un incremento en la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) o en la susceptibilidad a la oxidación. ⁽¹⁰²⁾

Otros estudios realizados en pacientes con DM apoyan esta teoría. Ellos encontraron incremento de EROS, tales como O_2^- , H_2O_2 , OH, lo que contribuyó a que se dañara el DNA de linfocitos en sangre periférica. Dicho daño oxidativo afecta tanto al DNA nuclear como al mitocondrial. Al respecto, estimaron que una célula humana recibe 10,000 impactos oxidativos en el DNA/día producidos por OH-, es decir, de cada 1012 moléculas de oxígeno que entran a la célula/día, es posible que 1 en 200 dañen al DNA. ⁽¹⁰³⁾

Los mecanismos detrás del aparente incremento en el EOX en la DM no están completamente esclarecidos. La evidencia acumulada apunta a varios mecanismos interrelacionados con el incremento en la producción de RL tales como el Ion superóxido. O reducción del estatus antioxidante. Estos mecanismos incluyen la glucooxidación y la formación de productos avanzados de glucosilación (AGE), activación de la vía de los polioles, alteración del estatus redox de glutatión

, inactivación de las enzimas antioxidantes, del metabolismo del ascorbato y perturbaciones en el metabolismo del óxido nítrico y de las prostaglandinas. ⁽¹⁰⁴⁾

A pesar de la fuerte evidencia experimental que indica que el EOX puede determinar el comienzo y la progresión de complicaciones tardías en la DM, aun hay controversia acerca de si el incremento en el EOX es meramente asociativo más que causal en la DM. Esto se debe a que la medición del EOX se basa comúnmente en mediciones indirectas y no específicas de productos de EROS, y parcialmente se debe a que la mayoría de los estudios clínicos con pacientes de DM han sido de diseño transversal. ⁽¹⁰⁴⁾

Un estudio experimental en ratones con diabetes tipo 2 se planteo la destrucción de células β por el efecto toxico de las EROS, como resultado del flujo de células inflamatorias en el páncreas, se llego a la conclusión que la deficiencia de enzimas antioxidante es la base de la susceptibilidad a la DM. Para estudiarlo se determinó la actividad de superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa en los islotes de Langerhans, páncreas, y otros tejidos, y exhibieron menor cantidad de enzimas antioxidantes, dio como resultado que el efecto toxico de estas especies en las células β , es la secuela de la deficiencia de enzimas antioxidantes. ⁽¹⁰⁶⁾

En el 2004 y en el 2005 se realizaron dos estudios parecidos sobre el ejercicio físico moderado y la suplementación de una combinación protectora de vitamina C y E en ratas embarazadas con DM; Se observo el incremento del EOX debido al entorno metabólico que presentaban las ratas durante el embarazo y el padecimiento de DM, esto complica el control en la madre y se muestra el mecanismo teratogénico que esta asociado con la hiperglucemia. Se dio como resultado un cambio en los niveles de vitamina E en el plasma el cual tuvo efecto positivo sobre el feto. También hubo cambios en el Malonildialdehído (MDA) en el plasma los cuales fueron afectados por el embarazo, estos resultados se obtuvieron en ambos estudios a diferencia en el del año 2005 donde se presento un incremento de las vitaminas en el plasma y en la actividad antioxidante enzimática. ^(107, 108)

Estudios posteriores llevados a cabo por varios grupos demostraron que el ejercicio físico vigoroso induce el EOX mediado por el daño oxidativo de lípidos, proteínas e incluso material genético⁽¹⁰⁹⁾

El ejercicio físico como una herramienta de la medicina preventiva ha sido ampliamente recomendado, también para pacientes con DM. El ejercicio físico moderado puede fortalecer las defensas antioxidantes y puede reducir el EOX en reposo y luego del ejercicio físico agudo. Sin embargo, los beneficios o riesgos relativos del ejercicio físico agudo y crónico en relación con el EOX en grupos con una incrementada susceptibilidad de EOX, tal como los pacientes diabéticos, no son conocidos.

Estudios prospectivos sugieren que el ejercicio físico moderado y la resistencia físico medido a través del consumo máximo de oxígeno tienen un efecto protector contra las enfermedades cardiovasculares y la mortalidad^(110, 111). Sin embargo no se han estudiado a pacientes con DM, y los mecanismos por los cuales el ejercicio físico reduce la mortalidad por enfermedades cardiovasculares todavía son poco claros.

Laaksonen, halló incrementado EOX, medido a través de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico en plasma (TBARS) en reposo y luego del ejercicio físico en hombres jóvenes con diabetes tipo 1.⁽¹¹²⁾ Sin embargo, la aptitud física medida por medio del consumo máximo de oxígeno (VO_2 máx) estuvo inversa y fuertemente correlacionada con las TBARS en plasma solo en los hombres con DM, sugiriendo un efecto protector de la resistencia físico, contra el estrés oxidativo.⁽¹¹³⁾

Se ha descrito que la DM está asociada con las reacciones oxidativas catalizadas por la transición de metales descompartamentalizados. Esta serie de hallazgos concuerdan con estudios que presentan considerables evidencias en las que se sugiere que el EOX juega un importante papel en la patogénesis y complicaciones de la DM.

Los mecanismos que pueden contribuir al aumento de dicho estrés en pacientes con DM son diferentes, en particular en aquellos sujetos con pobre control de la glucemia e hipertriglicemia. ⁽¹¹⁴⁾

Estos mecanismos que participan en la formación de RL en diabéticos no solamente incluyen el incremento de la glucosilación no enzimática y la auto-oxidativa, sino que también al estrés metabólico, que es el resultado de cambios en la energía del metabolismo, en el nivel de los mediadores de la inflamación y en el estado del sistema antioxidante de defensa. ⁽¹¹⁵⁾

Un modelo experimental realizado a pacientes con retinopatía diabética y la suplementación de antioxidantes en el cual da como resultado después de la administración de antioxidantes fue que no se presentó retinopatía, aunque si hubo hiperglucemia. La suplementación con distintos antioxidantes es posible revertir el daño celular de distintos órganos. ⁽¹¹⁶⁾

Algunas investigaciones realizadas por médicos chinos demuestran que la suplementación de vitamina C en un grupo experimental de ratas inducidas a DM aumenta el flujo sanguíneo periférico en reposo. Llegando a la conclusión de que los tratamientos con la vitamina C mejora en muchos sentidos las anomalías metabólicas asociadas con la diabetes. ⁽¹¹⁷⁾

En el 2001 Naziroğlu H y cols. Investigaron el uso de selenio y vitamina E por separado y combinado, en ratas inducidas a diabetes, el resultado indicó que la vitamina E administrada por vía intraperitoneal tiene importantes efectos protectores en sangre, hígado, músculos y contra el daño oxidativo de la diabetes. ⁽¹¹⁸⁾

En el 2005 Naziroğlu y cols. Evaluaron el mecanismo de defensa antioxidante en la sangre de ratas inducidas a diabetes suplementadas con vitamina C y vitamina E, los resultados obtenidos demostraron que la suplementación conjunta de estas

vitaminas inhibieron la inactivación de las enzimas antioxidantes (glutathion reductasa, glutathion peroxidasa, catalasa), disminuyendo el marcador de estrés oxidativo (lipoperoxidación). Llegando a la conclusión que el entrenamiento moderado del ejercicio y la suplementación de vitaminas antioxidantes pueden ayudar a prevenir la formación de estrés oxidativo en la diabetes inducida en animales diabéticos. ⁽¹¹⁹⁾

IV.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los cambios de estilo de vida en los últimos años han modificado los patrones de enfermedad y de muerte haciendo al individuo vulnerable y provocando así que disminuya su calidad de vida, en nuestro país los casos de enfermedades no transmisibles comienzan a tomar importancia en un gran segmento de la población, debido a su alto índice de mortalidad la Diabetes Mellitus (DM), ocupa uno de los primeros lugares, causando en su larga evolución diversas complicaciones que repercuten en el entorno familiar, laboral y social. A pesar de ser tan estudiadas dichas complicaciones, no se ha precisado el patrón sobre su comportamiento, lo que limita su conocimiento, para establecer estrategias efectivas para su prevención y control. La principal característica de esta enfermedad es la aparición de hiperglucemias, donde se desarrollan efectos negativos como es el estrés oxidativo el cual va a tener consecuencias indeseables en la propia célula convirtiéndose en protagonista de daños como puede ser el crecimiento celular irregular, alteraciones fisiológicas, inmunológicas desarrollando así, enfermedades como cáncer, aterosclerosis, artritis, hepatopatías, enfermedades respiratorias y envejecimiento.

Las reacciones del estrés oxidativo son eliminadas por acciones de otras moléculas que se oponen a este proceso toxico como son los antioxidantes. Unificado lo anterior aun no se ha definido que la suplementación con antioxidantes en pacientes con DM proteja a los distintos órganos del ataque de los RL, así como el impacto que ejerza sobre la resistencia física, esto ultimo debido a que el ejercicio es una alternativa comprobada por los especialistas de la salud para disminuir las concentraciones altas de glucosa.

Esto provoca que se ponga más atención en el estudio de los antioxidantes como factores protectores del organismo en los pacientes con DM, los cuales en muchos casos no llevan un plan de alimentación adecuado a sus necesidades.

Para resolver este planteamiento se desarrollo un modelo experimental en ratas inducidas químicamente a diabetes mellitus y se sometió a un programa de ejercicio físico para después observar el impacto de la suplementación de antioxidantes sobre el daño oxidativo.

V.- JUSTIFICACION

La diabetes mellitus esta dentro de las primeras 5 causas de muerte en el mundo, y la población en México de personas con esta enfermedad no transmisible, fluctúa entre los 6.5 y los 10 millones (prevalencia nacional de 10.7% en personas entre 20 y 69 años). De este gran total, 2 millones de personas no han sido diagnosticadas.

El estudio de la DM ha adquirido gran relevancia en los últimos años ya que los pacientes que cursan con esta patología tienen menor calidad de vida, a causa de complicaciones agudas o crónicas que van en aumento por el incremento en la incidencia de la enfermedad y de la esperanza de vida, lo que lo lleva a buscar posibles alternativas dirigidas a disminuir esta incidencia y mejorar la calidad de vida; para esto se requieren mas investigaciones orientadas a buscar nuevas estrategias en beneficio del paciente diabético, o individuos con riesgo a desarrollar esta alteración., con base en lo anterior y considerando las evidencias existentes sobre la aplicación de la vitamina E y la vitamina C, en este trabajo se pretende visualizar los posibles efectos que tienen al disminuir el daño oxidativo en ratas inducidas a diabetes mellitus durante un programa de ejercicio físico.

Por esto importante crear las condiciones necesarias para que este daño sea el menor posible y se disminuya el riesgo de que haya repercusiones en distintos órganos.

VI.- HIPOTESIS

HIPOTESIS DE INVESTIGACION:

La suplementación de vitamina E o vitamina C en ratas diabéticas protege a los órganos íntimamente relacionados con la enfermedad, del daño oxidativo, disminuyendo la formación de radicales libres y a su vez incrementa la resistencia física durante un programa de ejercicio físico.

VII.- OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Comparar el efecto de la suplementación de vitamina E y vitamina C de manera independiente, sobre daño oxidativo en ratas diabéticas durante un programa de ejercicio físico.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

1. Cuantificar los niveles de glucosa, colesterol, bilirrubina y albúmina en suero de ratas diabéticas que realizan ejercicio físico aeróbico con suplementación de vitamina E o vitamina C, para evaluar el impacto de las vitaminas en la regulación de estos marcadores de estrés oxidativo.
2. Cuantificar la actividad de las enzimas TGO y TGP en suero de ratas diabéticas que realizan ejercicio físico aeróbico con suplementación de vitamina E o vitamina C, para determinar la protección a los órganos de función importante por el daño producido por el estrés oxidativo.
3. Determinar la concentración de malondialdehído en tejidos de ratas diabéticas que realizan ejercicio físico aeróbico con suplementación de vitamina E o vitamina C, para evaluar la peroxidación lipídica, e identificar el daño celular.
4. Cuantificar la actividad de la enzima Superóxido dismutasa en tejidos de ratas diabéticas que realizan ejercicio físico aeróbico con suplementación de vitamina E o vitamina C, para evaluar la protección contra el estrés oxidativo.
5. Evaluar el ejercicio físico en ratas diabéticas con o sin suplementación de vitamina E o vitamina C, para determinar el incremento de la resistencia física.
6. Establecer las posibles interrelaciones entre la producción de radicales libres derivados del oxígeno provocados por la DM en ratas sometidas a un programa de ejercicio físico y con suplementación de vitamina E o vitamina C.

VIII.- METODOLOGIA.

1.- DISEÑO DE ESTUDIO.

Se realizo un estudio experimental, analítico, comparativo, prospectivo, longitudinal con ratas cepa wistar inducidas a diabetes, suplementadas durante cuatro semanas con vitamina E y vitamina C de manera independiente, y sometidas a un programa de ejercicio físico.

2.- DELIMITACION ESPACIAL.

La investigación se realizo en el Laboratorio de Bioquímica Medica del Área Académica de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

3.- DELIMITACION TEMPORAL.

El estudio tuvo una duración de un año, el cual se dividió en acondicionamiento al ejercicio físico, inducción a DM, programa de ejercicio físico y suplementación de antioxidantes.

4.- MATERIAL Y METODOS.

Para la inducción química a diabetes y para la determinación de glucosa, bilirrubina, colesterol, AST/GOT, ALT/GPT, aminotransferasa, que se utilizaron en este estudio se manipularon métodos enzimáticos suministrados por Spinreact.

5.- ANIMALES DE EXPERIMENTACION.

Se utilizaron ratas macho cepa Wistar de 200 ± 20 las cuales fueron obtenidas del bioterio de Harlam, México SA de CV; se alojaron en jaulas individuales, en el laboratorio de bioquímica medica del área académica de farmacia de la

Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo bajo condiciones ambientales constantes con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas, con libre acceso al agua y alimentadas con una dieta correcta para roedores (rodent laboratory chow).

Después de 10 días de adaptación se dio comienzo a la parte experimental.

6.- GRUPOS EXPERIMENTALES.

Los animales fueron agrupados de la siguiente forma:

Grupo 1: control (ratas sanas).

Grupo 2: únicamente ejercicio físico.

Grupo 3: Diabetes Mellitus

Grupo 4: Diabetes Mellitus + vitamina C

Grupo 5: Diabetes Mellitus + vitamina E

Grupo 6: Diabetes Mellitus + ejercicio físico

Grupo 7: Diabetes Mellitus + ejercicio físico + vitamina C

Grupo 8: Diabetes Mellitus + ejercicio físico + vitamina E

7.- INDUCCION A DIABETES MELLITUS.

Las ratas de los grupos 3-8 se les indujo químicamente el desarrollo de Diabetes Mellitus a través de estreptozotocina (60 mg/Kg.), la cual se administro intraperitoneal con una solución amortiguadora de buffer de citrato (0.1 M, pH de 4.5 pH). Después de 8 días fue determinado los niveles de glucosa en sangre de las ratas de los grupos 3-8, confirmando la inducción de la DM a partir de niveles de >126 mg/dl. A los grupos 1 y 2 solamente se les administro inicialmente la solución buffer.

8.- MEDICION DE GLUCOSA.

La medición de glucemia en ratas se realizó en ayuno. Para tomar la muestra, las ratas fueron anestesiadas con éter etílico dentro de una campana previamente impregnada con este. Una vez anestesiada se dio un corte rápido en la punta de la cola, aproximadamente de 2 a 3 mm, esperando el flujo libre de la sangre, colectando la sangre total. La glucosa se midió según el inserto del fabricante, mediante la colocación de una alícuota de 10µl de suero y 1 ml de reactivo, este contenía glucosa oxidasa, peroxidasa y 4 - aminofenazona en solución amortiguadora, después de agitar, se incubó 15 minutos a temperatura ambiente (15 – 25° C) y se lee la absorbancia en el espectrofotómetro, a una longitud de onda de 505 nm frente a su blanco, para determinar la concentración de glucosa se utilizó el estándar incluido en el kit comercial usado.

10.- SUPLEMENTACIÓN DE ANTIOXIDANTES.

La dosis de suplementación de vitamina E fue de 400 UI (vía intraperitoneal) y la dosis de suplementación de vitamina C fue de 60 mg/Kg. (vía intragástrica). Las vitaminas fueron administradas diariamente por todo el tiempo que duró el experimento a los grupos 4 - 8.

11.- PROGRAMA DE EJERCICIO FÍSICO.

A las ratas de los grupos 2, 6-8, fueron sometidas a un programa de ejercicio físico aeróbico que consiste en correr en una jaula de actividad física por 30 minutos/ al día / por 5 días a la semana/ 4 semanas. Todos los días se registró el ejercicio físico de cada una de las ratas durante todo el experimento. De el ejercicio físico se obtuvo un promedio semanal y esta fue reportada en m/min. Considerando el perímetro de la jaula y el número de vueltas.

12.- OBTENCION DE LAS MUESTRAS.

Al final de los experimentos las ratas fueron sacrificadas por decapitación, previa anestesia con éter etílico. Obteniéndose inmediatamente muestras de sangre y diversos ejidos (corazón, riñón, hígado y músculo) para realizar las diversas determinaciones y procedimientos analíticos que se describirán más adelante.

a) Obtención de suero: Después de decapitar a las ratas, se recolecto la sangre en un tubo vacutainer con gel separador de plasma. El cual fue centrifugado a 3500 RPM por 10min, obteniéndose el suero, el cual fue congelado a -70°C hasta su posterior uso.

b) Obtención de muestras de tejido y homogenado total: Posterior a la decapitación, se les realizó una cirugía abdominal a las ratas obteniendo tejidos en el siguiente orden: Hígado, riñón, corazón y músculo, fueron puestas por separado en el buffer de citósol (0.255M de sacarosa, 10Mm DE TRIS, 0.3M de EDTA; pH 7.4) y homogeneizadas haciendo girar la punta de teflón a 1,000RPM. Y congeladas a – 70 ° C para su posterior análisis.

a) DETERMINACION DE METABOLITOS EN SUERO.

Se determinó la concentración sérica de glucosa, albúmina, bilirrubina y colesterol empleando kits específicos para cada determinación cuantitativa marca Spinreact, siguiendo las instrucciones del fabricante, (anexo 1, 2, 3 y 4 respectivamente). Además se determinaron las concentraciones de albúmina, usando como estándar la proteína de suero bobina, determinada por el método de Lowry.

b) ENSAYOS ENZIMATICOS EN SUERO.

Se determinó la concentración en suero de las enzimas marcadoras de daño celular AST Y ALT utilizando kits específicos para cada determinación cuantitativa marca Spinreact, siguiendo las instrucciones del fabricante, (anexo 5 y 6 respectivamente). Las actividades se reportan como unidades internacionales (UI/L).

c) OBTENCION DE HOMOGENADO TOTAL.

El homogenado total se obtuvo de la división de cada una de las muestras de los órganos antes extraídos, se colocó en un buffer de sacarosa 0.255M, Tris 0.01M, EDTA 0.3Mm, ajustado a un pH de 7.4. Posteriormente los fragmentos de cada muestra se homogeniza hasta obtener una solución uniforme, mediante un molino mecánico con un potter con cabeza de teflón.

d) DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE MALONDIALDEHIDO (MDA).

Una vez obtenido el homogeneizado total, se determinó la concentración de malondialdehído como un índice de toxicidad provocado por la generación de radicales libres derivados del oxígeno ya que el malondialdehído es un índice de la lipoperoxidación de los ácidos grasos insaturados de las membranas.

El malondialdehído fue cuantificado utilizando la técnica espectrofotométrica de reacción con el ácido tiobarbitúrico que consiste en lo siguiente: El homogeneizado total fue incubado 30 minutos a 37°C en amortiguador de TRIS (HCL 0.015 M con pH de 7.0). Posteriormente, se les agrego 1.5m ácido tiobarbiturico (0.8% p/v) y 1.5ml ácido acético (5 % v/v) para dejarlas incubar 60 minutos en agua en ebullición (90°C). Al término de la incubación, se agregó una solución de 3ml de butanol/piridina (1:10 v/v). La mezcla obtenida se agitó y centrifugó durante 10min a 3000 RPM, posteriormente se recuperó la interfase de butanol/piridina, la cual se leyó con una longitud de onda de 532 nm, en un espectrofotómetro de luz ultravioleta de doble haz, marca Shimadzu. La concentración de MDA se reportó en nanomoles / miligramos (nmol/ mg) de proteína.

e) DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA SUPEROXIDO DISMUTASA (SOD).

La actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD), se determinó en el homogenado total en tejidos como indicador de los sistemas antioxidante, en ratas diabéticas que realizan ejercicio físico aeróbico con suplementación de vitamina C y E. Se incubo la muestra a 37 C con 10 volúmenes de una solución de Tris (150mM), e iniciando la reacción al agregar NAD⁺ (10mM). La reacción fue seguida durante 3 minutos, la cual se expresa en mU/mg de proteína; la proteína total de la muestra fue determinada por el método ya establecido por Lowry usando albúmina bovina como estándar, (anexo 7)

f) DETERMINACION D E LA RESISTENCIA FISICA.

Diariamente se registro la actividad que realizó cada rata en metros - min. Para poder ser analizada y comparada a lo largo de investigación. Se sacó promedio semanal de vueltas que se multiplica por el perímetro de la jaula y se dividió entre el tiempo de ejercicio físico.

IX.- ANALISIS ESTADISTICO.

Los datos fueron integrados en una base de datos y analizado por el programa estadístico sigma plot, de los cuales se calculó media \pm error estándar. Obteniendo estos resultados se analizaron usando T de student, para muestras pareadas y análisis de varianza (ANOVA), para probar la diferencia entre los grupos y la contribución de cada antioxidante. Todos los valores fueron expresados como promedio \pm error estándar, tomando en cuenta un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

IX.- ASPECTOS ETICOS.

La realización de la presente investigación dispone de las obligaciones éticas señaladas en la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, donde puntualiza las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Se pretendió tener en óptimas condiciones y evitar que el animal sufriera daños físicos, psicológicos, para que pudiera proporcionarnos la información que se utilizó en esta investigación.

XI.- RESULTADOS.

Hemos llevado a cabo este estudio a lo largo de 1 años estuvo conformado por un total de 24 ratas de cepa wistar sanas distribuidos en 8 grupos, de los cuales 6 grupos fueron inducidos químicamente el desarrollo de DM. Según la metodología expuesta en el capítulo anterior se han obtenido los siguientes resultados.

1.- Efecto de los antioxidantes en la concentración sérica de glucosa.

Lo que se pretendió con este experimento fue identificar mediante la comparación de los niveles de glucosa si la suplementación de alguna de las vitaminas mejoraba el control de la glucemia en las ratas diabéticas, con o sin ayuda del ejercicio, en la figura 5 se observa que el nivel de glucosa en el grupo que realiza ejercicio físico fue significativamente más bajo (90mg/dl $p < 0.05$) en comparación con el grupo control (135mg/dl). Así mismo el grupo diabético muestra un evidente incremento (199mg/dl) en comparación con el grupo control que resulta estadísticamente significativo (135mg/dl $p < 0.05$). En cuanto al grupo diabético y que realiza ejercicio físico está aumentados los niveles de glucosa (500mg/dl) en comparación con el grupo diabético (199mg/dl $p < 0.05$) que resulta estadísticamente significativo. El grupo diabético+ejercicio físico +suplementación de vitamina C presenta niveles elevados de glucosa (300mg/dl) en comparación con el grupo diabético +suplementación de vitamina C lo cual resulta estadísticamente significativo (90mg/dl $p < 0.05$). Los grupos diabético+ejercicio físico+vitamina E se mantienen elevados (450mg/dl) en comparación con el grupo diabético+suplementación de vitamina E, el cual resulta estadísticamente significativo (350mg/dl $p < 0.05$).

2.- Efecto de los antioxidantes en la concentración sérica de bilirrubina.

La idea de un posible efecto benéfico de la bilirrubina como antioxidante fisiológico en la cadena respiratoria celular y actuar como marcador de estrés oxidativo, nos llevo a cuantificar la cantidad de este metabolito. En la figura 6 se muestra las concentraciones de bilirrubina en la cual se ve aumentado en el grupo diabético (0.6mg/dl) en comparación con el grupo control es cual es estadísticamente significativo (0.05mg/dl $p < 0.05$)

Por otro lado el grupo diabético+vitamina E tiene una disminución notable de bilirrubina siendo este grupo estadísticamente significativo (0.01mg/dl) (0.03 y 0.03mgdl $p < 0.05$) en comparación con los grupos diabéticos+ejercicio físico+suplementación de vitamina C, E. Los grupos diabético+vitamina E, C muestran una disminución de bilirrubina siendo estadísticamente significativo (0.01 vs 0.05 mgdl y 0.05 vs .0.2 mgdl $p < 0.05$) en comparación del grupo que realiza ejercicio físico y el grupo control.

3.- Efecto de los antioxidantes en la concentración sérica de albúmina.

Las proteínas constituyen un índice del estado antioxidante del organismo, juega un papel esencial la albúmina que es la proteína más abundante y donde los grupos sulfhidrilos (SH) ejercen esta función, por esto actúa como marcador de estrés oxidativo, por lo cual en la figura 7, se determinaron los niveles de albumina sérica en los distintos grupos de estudio de los cuales se ve un ligero incremento de este metabolito, siendo estadísticamente significativo en el grupo diabético+ejercicio físico+vitamina E(4.1 gdl vs 3.9gdl $p < 0.05$) en comparación con el grupo diabético+vitamina E., así mismo los grupos control, ejercicio físico y diabético+ejercicio físico, hay un ligero descenso en comparación con el grupo diabético que muestra un aumento estadísticamente significativo (4.1 vs 4.2gdl y 4.3 gdl vs 4.4 gdl $p < 0.05$) en comparación a dichos grupos mencionado.

4.- Efecto de los antioxidantes en la concentración sérica de colesterol.

Las moléculas de colesterol LDL-oxidada promueven la formación de macrófagos espumosos, los cuales predominan en las lesiones ateroscleróticas y juegan un papel etiológico en la disfunción endotelial presente en las cardiopatías. El comportamiento de la sensibilidad de la LDL a la oxidación constituye un índice indirecto de daño oxidativo a lípidos en este caso a lipoproteínas, en la figura 8 se muestra un incremento notable de colesterol sérico en el grupo control, que resulta estadísticamente significativo (390 vs 300mgdl y 100mgdl ($p<0.05$) en comparación con el grupo diabético, y el grupo que realiza ejercicio físico., en cuanto al grupo diabético+ejercicio físico + suplementado con vitamina C, tuvo una disminución estadísticamente significativa(90 vs 200mgdl $p<0.05$) en comparación con el grupo diabético y suplementado con vitamina C el cual tuvo dicho aumento de colesterol. Por otra parte el grupo suplementado con vitamina E + diabetes+ ejercicio físico tuvo un leve aumento de este metabolito comparado con el grupo suplementado con vitamina E + diabetes que mostró una disminución notoria siendo estadísticamente significativo (129 vs 100mgdl $p<0.05$), por lo tanto los grupos diabético+ vitamina C mostraron un aumento de colesterol comparado con el grupo diabético+ejercicio físico+ vitamina C el cual tuvo una disminución estadísticamente significativa (200 vs 90 mgdl $p<0.05$).

5.- Efecto de los antioxidantes en la actividad enzimática.

La enzima ALT/TGP se encuentra principalmente en el hígado, y en concentraciones mas bajas en el riñon, corazon y musculo, el aumento de esta, evidencia daño al organo, en la figura 9 se muestran los niveles de la enzima TGP los cuales estan evidentemente elevados en el grupo diabético+vitamina C, comparado con el grupo diabético+ejercicio físico+vitamina C que tiene una disminucion estadísticamente significativa (0.6 vs 0.4ul $p<0.05$) y el grupo diabético+ejercicio físico+suplementación de vitamina E muestra niveles bajos de esta enzima siendo estadísticamente significativo (0.01 vs 0.03ul $p<0.05$) en relación con el grupo diabético+ suplementación de vitamina E, el grupo diabético muestra un aumento evidente de dicha enzima, que en comparación con el grupo

diabético+ejercicio físico presenta niveles bajos y que resulta estadísticamente significativo en comparación con el grupo diabético, en cuanto al grupo que realiza ejercicio físico y el grupo control muestra una disminución estadísticamente significativa (0.04 vs 0.02ul y 0.2ul $p < 0.05$) en relación con el grupo que realiza ejercicio físico.

La enzima AST/GOT se encuentra prácticamente en todos los tejidos, pero su mayor actividad se localiza en músculo e hígado, y al igual que la enzima anterior se incrementa cuando hay una lesión, en estos casos dada por el estrés oxidativo. En la figura 10 se observa que se presenta un evidente incremento en la concentración sérica de GTP del grupo diabético + ejercicio físico comparado con el grupo diabético el cual es estadísticamente significativo (3 ULV vs 2.5 UL $p < 0.05$) en la concentración de GTP. De igual manera el grupo diabético + vitamina E presenta una evidente disminución que resulta estadísticamente significativa (2 UL vs 11UL $p < 0.05$) en comparación con el grupo diabético +ejercicio físico+ vitamina E, Por el contrario, los grupos suplementados con vitamina C no mostraron cambio alguno.

6.- Efecto de los antioxidantes en la concentración de MDA.

Los niveles elevados de radicales libres pueden reaccionar con las proteínas o lípidos para producir daños oxidativos. Las mediciones de malonaldehído son un indicador aceptado del estado de la peroxidación lipídica. En la figura 11, se manifiesta la evaluación del daño ocasionado por las especies reactivas del oxígeno, se determinó por la concentración de MDA en muestras de órganos (riñón, hígado, corazón y músculo) de ratas diabéticas y de ratas suplementadas con vitaminas antioxidantes como son E y C, de las cuales en el homogenado del grupo diabético+ejercicio físico presenta un aumento considera que es estadísticamente significativo (70 nmol/mg vs 60 y 42 nmol/mg $p < 0.05$) en comparación con los grupos diabético, ejercicio físico. De igual forma el grupo diabético+ejercicio físico+ suplementación de vitamina E muestra una elevación considerable en comparación con el grupo diabético+Suplementación de vitamina C la cual es estadísticamente significativo (30 nmol/mg vs 40nmol/mg $p < 0.05$), y

en cuanto al grupo diabético+ ejercicio físico+ vitamina E resulta estadísticamente significativo (30nmol/mg vs 50nmol/mg $p<0.05$) en comparación con el grupo diabético+suplementación de vitamina C. así mismo los grupos que realizan ejercicio físico, diabético y diabético +ejercicio físico tienen niveles altos de MDA en comparación con el grupo diabético el cual resulta estadísticamente significativo (22nmol/mg $p<0.05$).

En la figura 12, Se muestra que en el homogenado de hígado hay un aumento considerable de MDA en el grupo diabético, con respecto al grupo diabético+ ejercicio físico que es estadísticamente significativo (90 nmol/mg vs 70nmol/mg $p<0.05$) con respecto al grupo diabético. Por lo tanto en los grupos diabético+ejercicio físico+Suplementación de vitamina E esta un poco elevado con respecto al grupo diabético+vitamina E que es estadísticamente significativo (30nmol/mg vs 50nmol/mg $p<0.05$), en cuanto al grupo diabético+ ejercicio físico+ Suplementación de vitamina C resulta estadísticamente significativo (40nmol/mg vs 55nmol/mg $p<0.05$) en comparación con el grupo diabético+vitamina C que esta elevadas las concentraciones de MDA. En cuanto a nuestro grupo que realiza ejercicio físico los niveles de MDA se ven elevados lo que resulta estadísticamente significativo (21nmol/mg $p<0.05$) con respecto al grupo control. Los grupos suplementados con vitaminas antioxidantes tienen niveles elevados de MDA en comparación con el grupo control que resulta estadísticamente significativo($p<0.05$).

En la figura 13, Se muestran los valores de MDA elevados en el grupo diabético+ejercicio físico en comparación con el grupo diabético que resulta estadísticamente significativo (140nmol/mg vs 100 $p<0.05$) así mismo en el grupo que realiza ejercicio físico las concentraciones de MDA se ven elevadas en comparación con el grupo control el cual resulta estadísticamente significativo (39nmol/mg vs 19nmol/mg $p<0.05$), observando el grupo diabético+ejercicio físico+Suplementación de vitamina E los niveles se ven bajos en comparación con el grupo diabético+vitamina E el cual es estadísticamente significativo (78nmol/mg vs 70nmol/mg $p<0.05$), el grupo diabético+ ejercicio físico+ la Suplementación de

vitamina C y el grupo diabético+ Suplementación de vitamina C están de igual manera considerablemente altos en comparación con el grupo control que resulta estadísticamente significativo (18nmol/mg) , lo cual nos indica que en la Suplementación de dichos antioxidantes el que reduce los niveles de MDA o el daño a corazón en ratas diabéticas es la vitamina C.

En la figura 14, Podemos observar que los niveles de MDA se encuentran elevados en el grupo diabético+ejercicio físico en comparación del grupo diabético, los cuales nos dice que se ve afectado el músculo de la rata. En cuanto al grupo diabético + ejercicio físico + Suplementación de vitamina E los niveles están disminuidos y es estadísticamente significativo (50nmol/mg vs 70nmol/mg $p<0.05$) en comparación con el grupo diabético+ vitamina E. En el grupo diabético +ejercicio físico+ vitamina C los niveles de MDA se encuentran un poco disminuidas siendo estadísticamente significativo en comparación con el grupo diabético+ vitamina C (70nmol/mg vs 110nmol/mg $p<0.05$) esto nos dice que aunque la rata practique ejercicio físico y sea suplementada con vitamina C el daño se hace presente puesto que hay gran producción de radicales libres los cuales no son atacados en su mayoría ni aun con dicha Suplementación, en cuanto al grupo diabético+Suplementación de vitamina E bajan los niveles pues la rata no es sometida a dicho estrés y es estadísticamente significativa (45nmol/g $p<0.05$). Con respecto a los grupos diabético+ejercicio físico, diabético y el grupo que realiza ejercicio físico están elevados en comparación con el grupo control que resulta estadísticamente significativo (18nmol/dl).

7.- Efecto de los antioxidantes en los niveles de SOD

La enzima superóxido dismutasa (SOD) cataliza la dismutación de superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno. Debido a esto es una importante defensa antioxidante en la mayoría de las células expuestas al oxígeno.

En la figura 15.- La SOD es un enzima que interviene como primer paso en los mecanismos de defensa contra el ataque oxidativo, se determino su concentración como indicador de protección de los sistemas antioxidantes en los animales inducidos a diabetes y la combinación de este padecimiento con la

suplementación de vitaminas antioxidantes C y vitamina E, estas concentraciones se determinaron de igual manera en órganos como: riñón, hígado, corazón y músculo en los cuales nos da que el grupo diabético+ejercicio físico las concentraciones están elevadas, en comparación con el grupo diabético el cual resulta estadísticamente significativo (750umol/min/mg vs 700nmol/min/mg $p<0.05$), en el grupo que realiza ejercicio físico los niveles aumentaron en comparación con el grupo control el cual resulta estadísticamente significativo (850umol/min/mg vs 700umol/min/mg $p<0.05$) , y en los grupos con diabetes+Suplementación de vitamina E en comparación del grupo diabético+ejercicio físico+Suplementación de vitamina E ambos están elevados los cuales nos dicen que con la suplementación de vitamina E protege del daño por radicales libres al riñón al igual que en la Suplementación con vitamina C.

En la figura 16, la actividad de la SOD se ve incrementada al doble en el grupo diabético+ ejercicio físico + Suplementación de vitamina E, así mismo en los grupos diabético+ejercicio físico+vitamina C, vitamina E y , el grupo que realiza ejercicio físico, diabético y diabético + ejercicio físico tienen niveles altos de SOD en comparación con el grupo control que resulta estadísticamente significativo (410umol/min/mg).

En la grafica 17, las concentraciones de SOD en el homogenado total de corazón muestran estar altas en los primeros dos grupos que son ejercicio físico, y diabético, comparado con el grupo control que resulta estadísticamente significativo (500umol/mg) en el grupo diabético +ejercicio físico se ven severamente aumentados en comparación con el grupo diabético., en cuanto al grupo diabético + ejercicio físico+vitamina C las concentraciones se encuentran elevadas en comparación con el grupo diabético+vitamina C el cual resulta estadísticamente significativo ($p<0.05$).

En relación con el grupo Diabético+ejercicio físico+Suplementación de vitamina E los valores están elevados en comparación con el grupo diabético+vitamina E siendo este ultimo significativamente estadístico (1300umol/mg vs 1100umol/mg $p<0.05$) En la figura 18.-La actividad de SOD se observan bajas en los primeros 2 grupos que son grupo ejercicio físico y diabético., teniendo un incremento notable

en el grupo diabético+ejercicio físico en comparación con el grupo diabético siendo este grupo estadísticamente significativo (1200umol/mg vs 700umol/mg $p<0.05$).

En cuanto al grupo diabético+ejercicio físico+vitamina E los niveles están aumentados en comparación con el grupo diabético+vitamina C el cual es estadísticamente significativo (1000umol-mg vs 1150umol-mg $p<0.05$), esto nos dice que dicha vitamina logra reducir el daño al músculo, sin embargo el grupo diabético+ejercicio físico tiene niveles altos comparado con el grupo diabético+vitamina E el cual resulta estadísticamente significativo (1050umol-mg vs 1200umol-mg $p<0.05$) y podemos decir que la Suplementación de vitamina E logra reducir el impacto de los radicales libres comparado con la vitamina C.

8.- Efecto de los antioxidantes en la resistencia física en ratas diabéticas.

Sobre la resistencia física pudimos observar en la figura 19 que hubo un notable incremento en el resistencia al suplementar la vitamina E y resulta estadísticamente significativo (200m/min.) En comparación de la Suplementación con vitamina C.

a) ($p<0.05$ vs control)

b) ($p<0.05$ vs ejercicio físico)

c) ($p<0.05$ vs diabético)

d) ($p<0.05$ vsdiabético+vitaminaE)

e) ($p<0.05$ vs diabético+ejercicio físico+suplementación vitamina E/C)

f) ($p<0.05$ vs diabético+vitamina E/C)

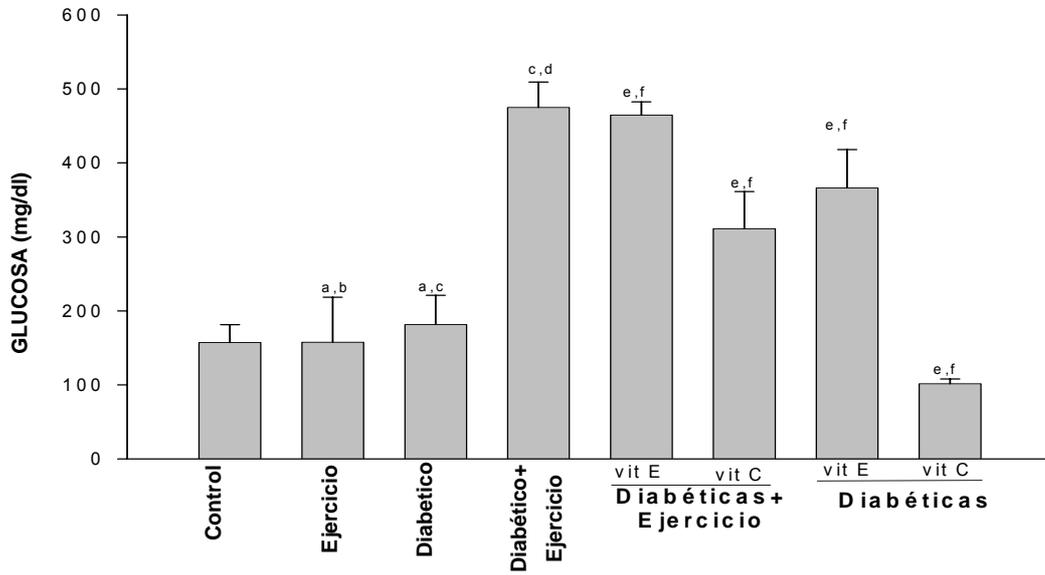


Figura 5.- Efecto de los antioxidantes en los niveles de glucosa en ratas diabéticas.

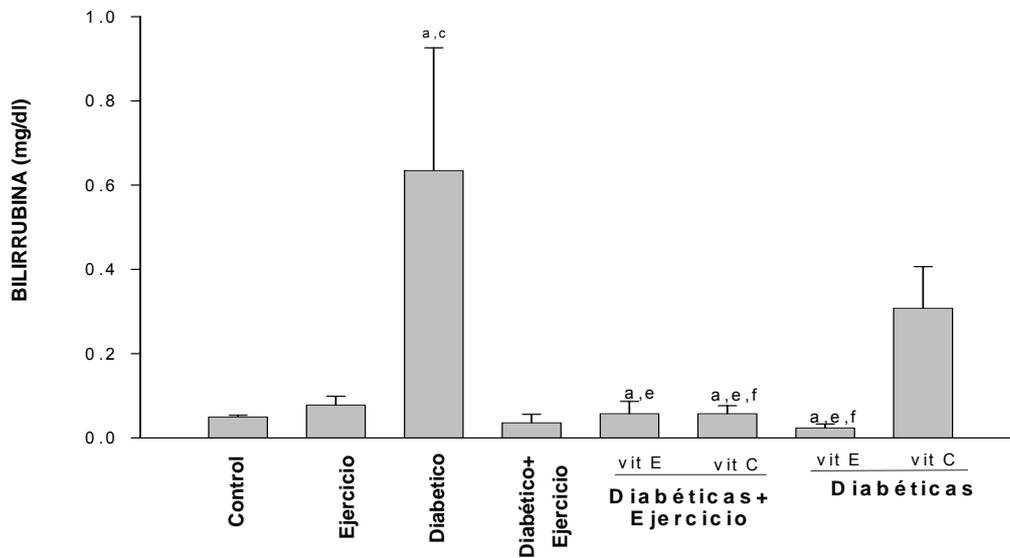


FIGURA 6. Efecto de los antioxidantes en los niveles de bilirrubina en ratas diabéticas.

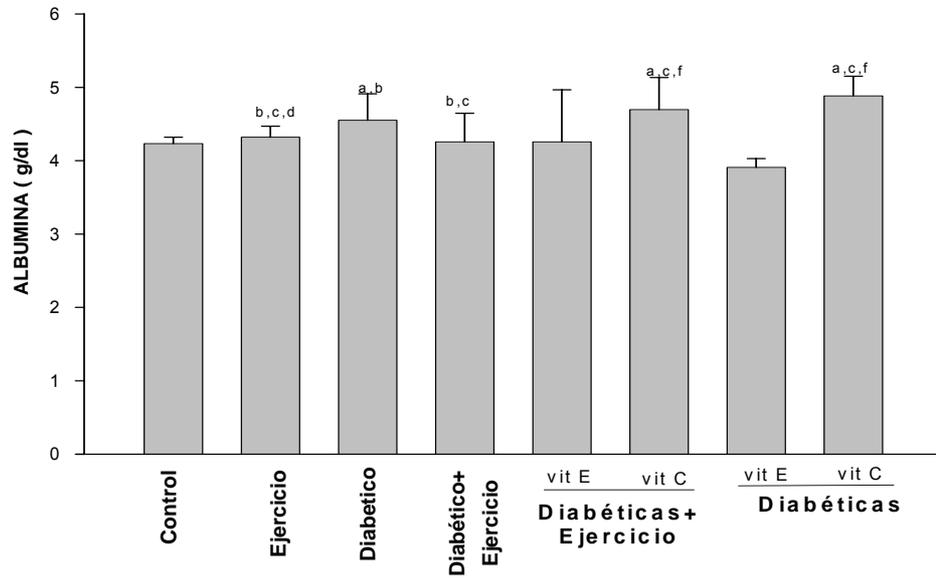


FIGURA 7.- Efecto de los antioxidantes en los niveles de albumina de ratas diabéticas.

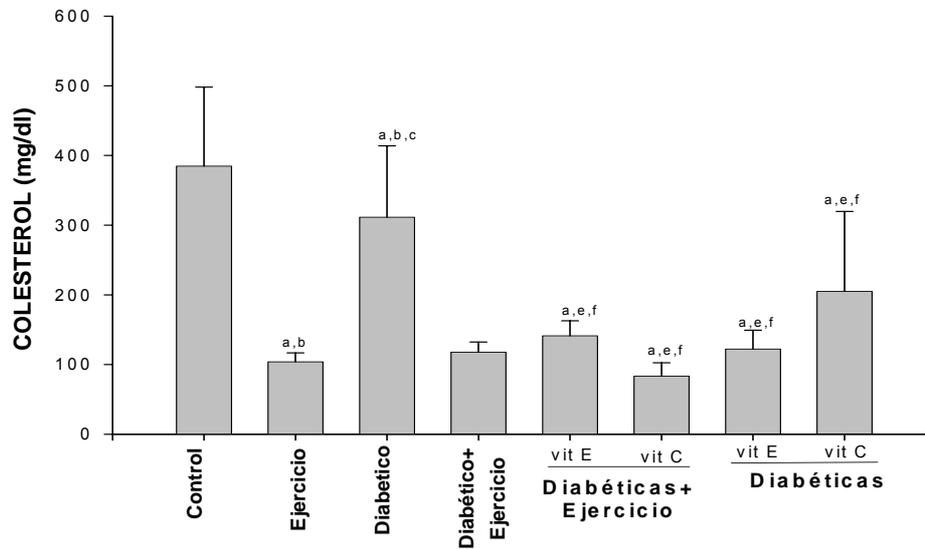


FIGURA 8. Efecto de los antioxidantes en los niveles de colesterol de ratas diabéticas.

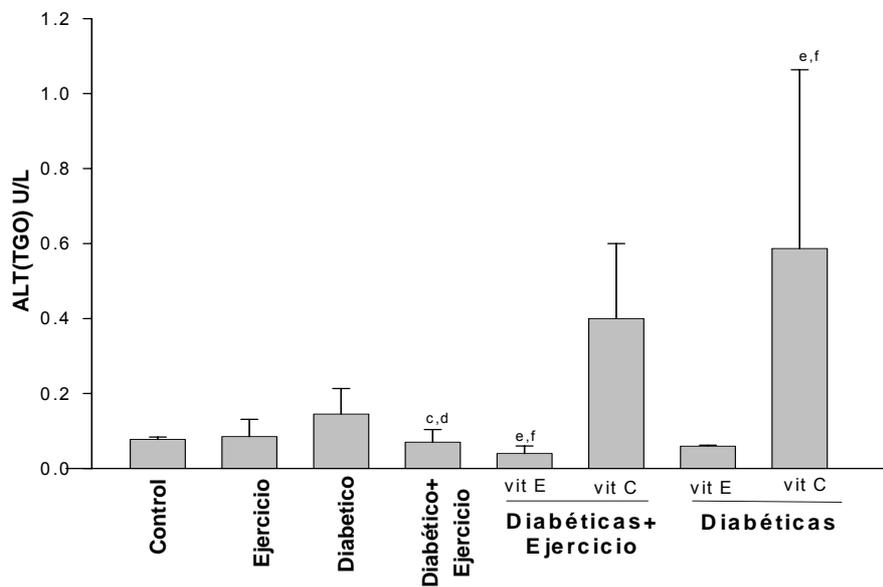


FIGURA 9.- Efecto de los antioxidantes en los niveles de ALT/TGP en ratas diabéticas.

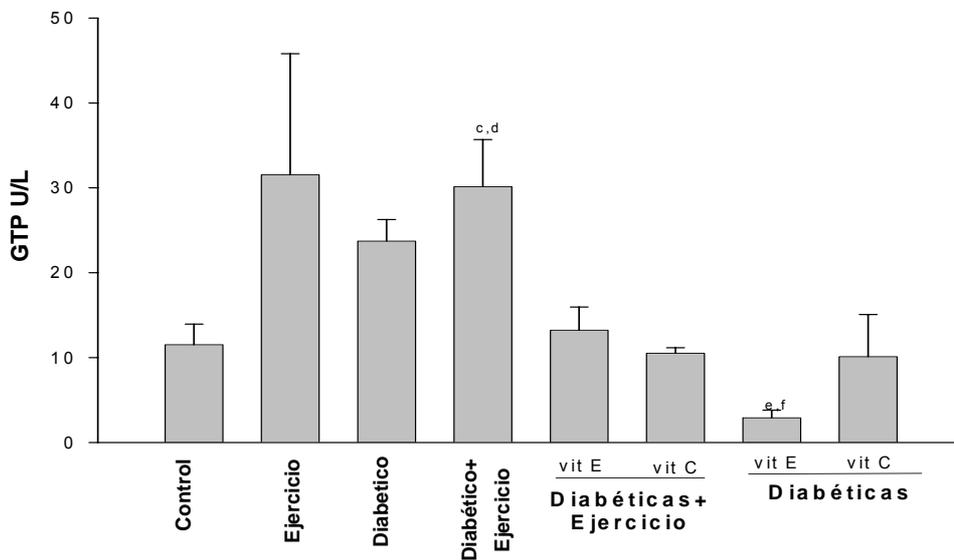


FIGURA 10.- Efecto de los antioxidantes en los niveles de AST/GOT en ratas diabéticas.

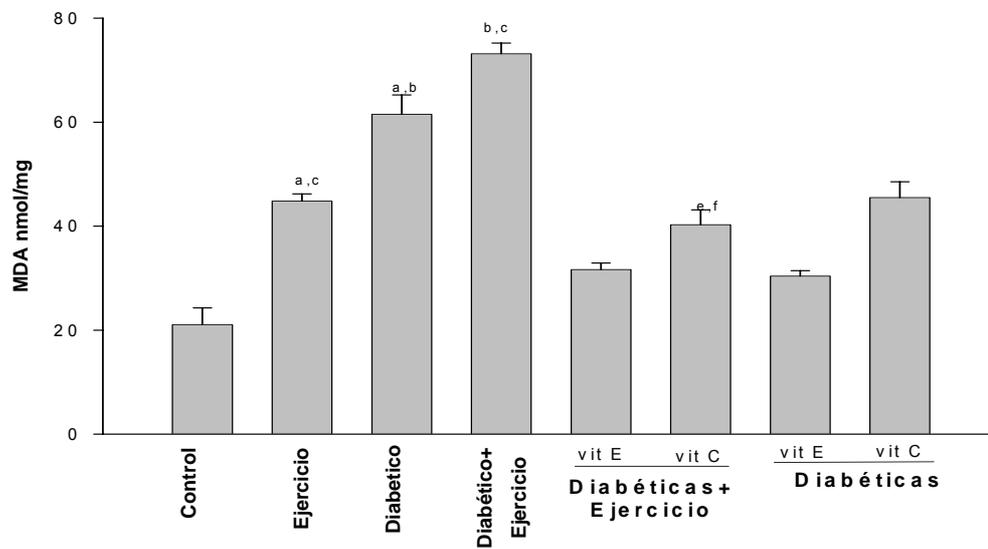


FIGURA 11.- Efecto de los antioxidantes en las concentraciones de MDA en muestras de riñón de ratas diabéticas.

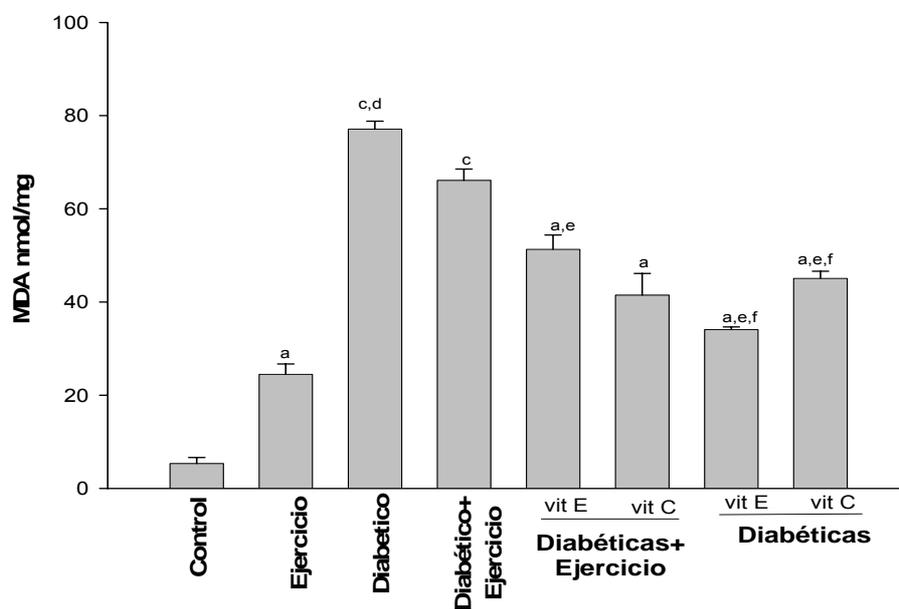


FIGURA 12.- Efecto de los antioxidantes en los niveles de MDA en muestras de hígado en ratas diabéticas.

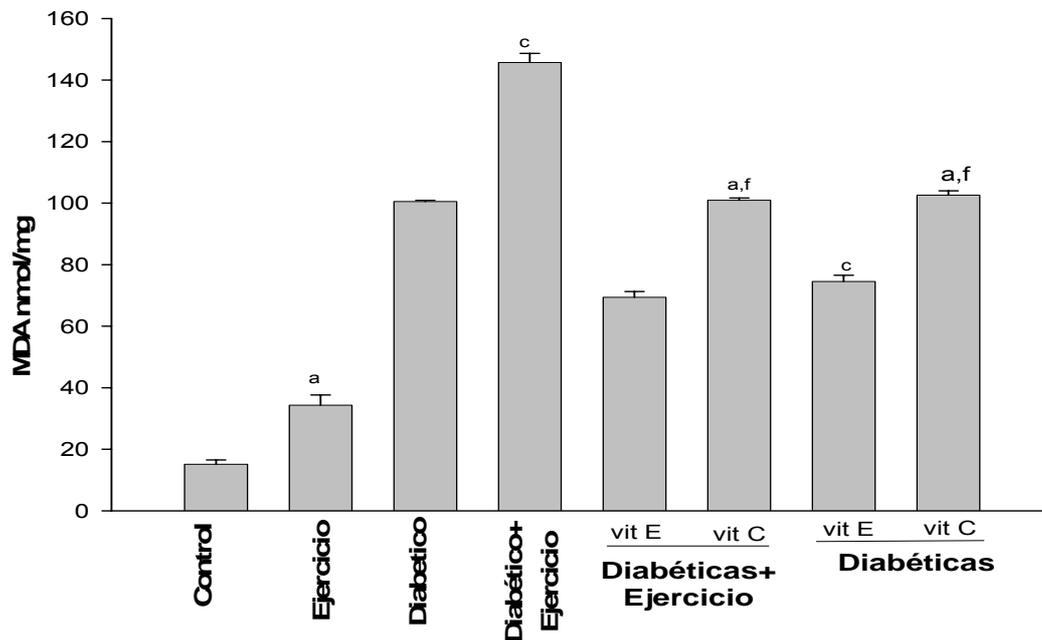


FIGURA 13.- Efecto de los antioxidantes en las concentración de MDA en muestras de corazón de ratas diabéticas.

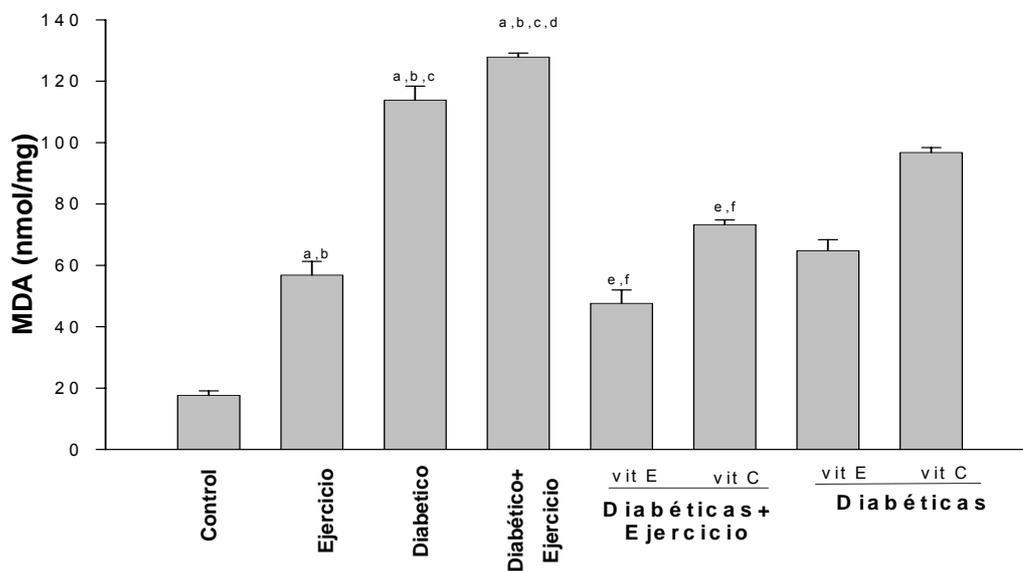


FIGURA 14.- Efecto de los antioxidantes en la concentración de los niveles de MDA en muestras de músculo de ratas diabéticas.

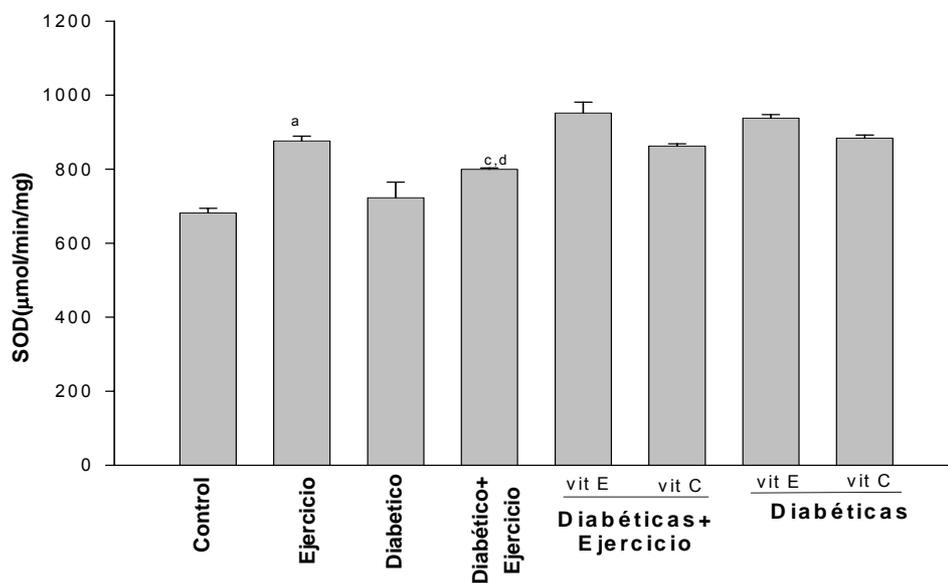


FIGURA 15.- Efectos de los antioxidantes en la concentración de SOD en muestras de riñón de ratas diabéticas.

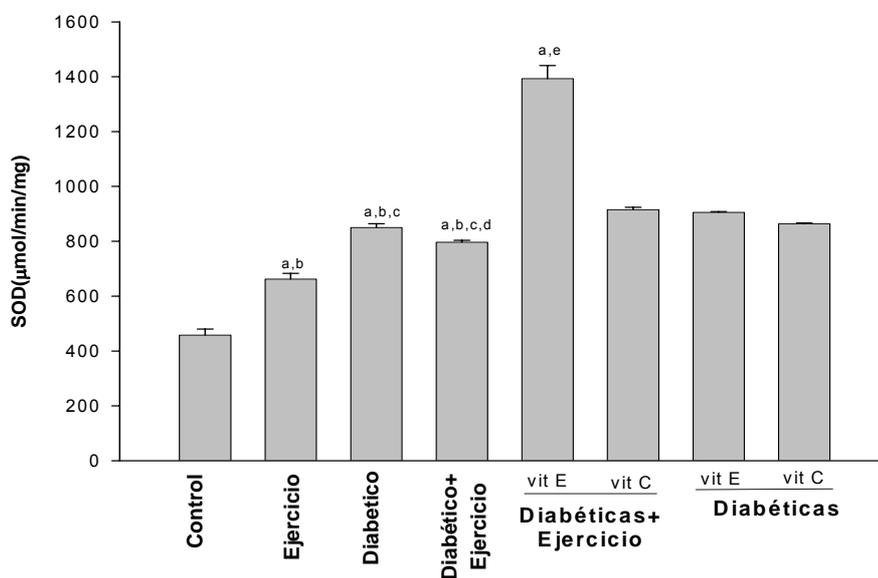


FIGURA 16.- Efectos de los antioxidantes en los niveles de SOD en muestras de hígado en ratas diabéticas.

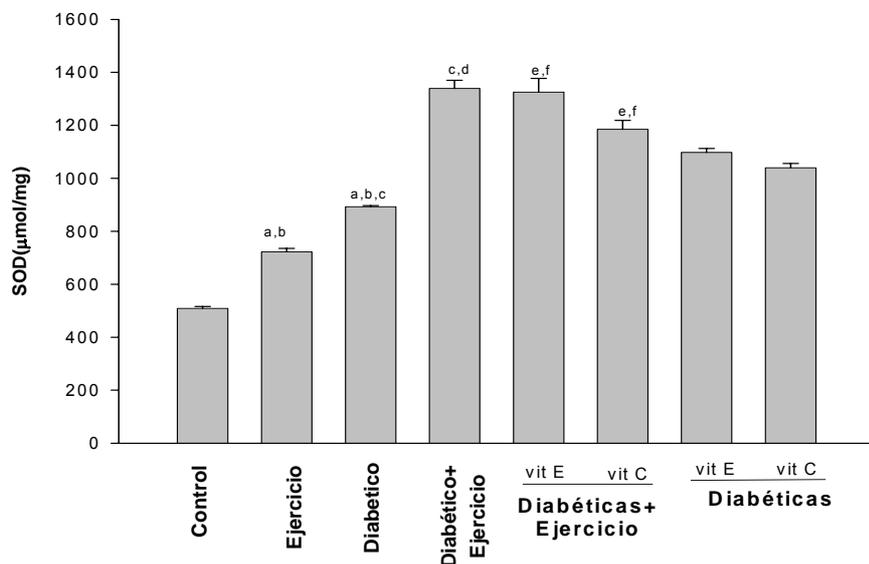


FIGURA 17.- Efecto de los antioxidantes en las concentraciones de SOD en muestras de corazón de ratas diabéticas.

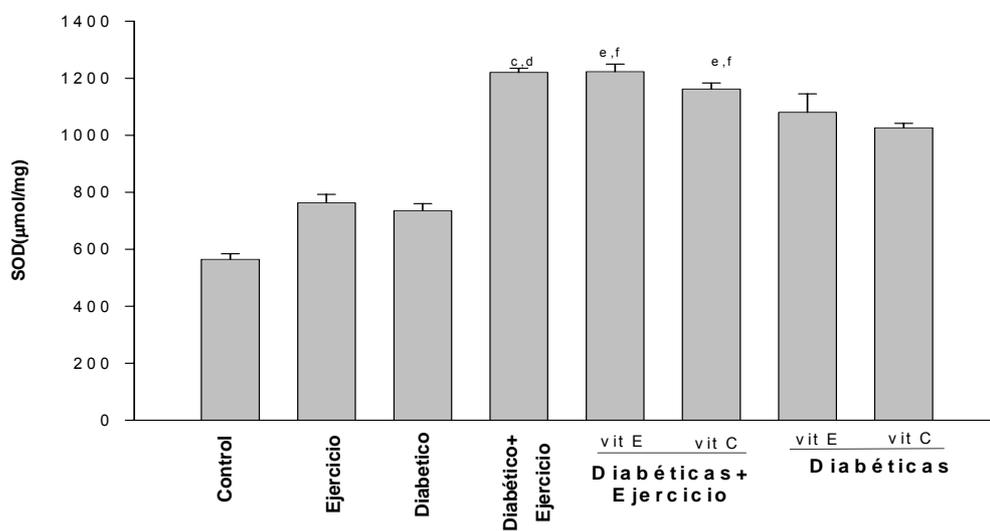


FIGURA 18.- Efecto de los antioxidantes en la concentración de SOD en muestras de músculo de ratas diabéticas.

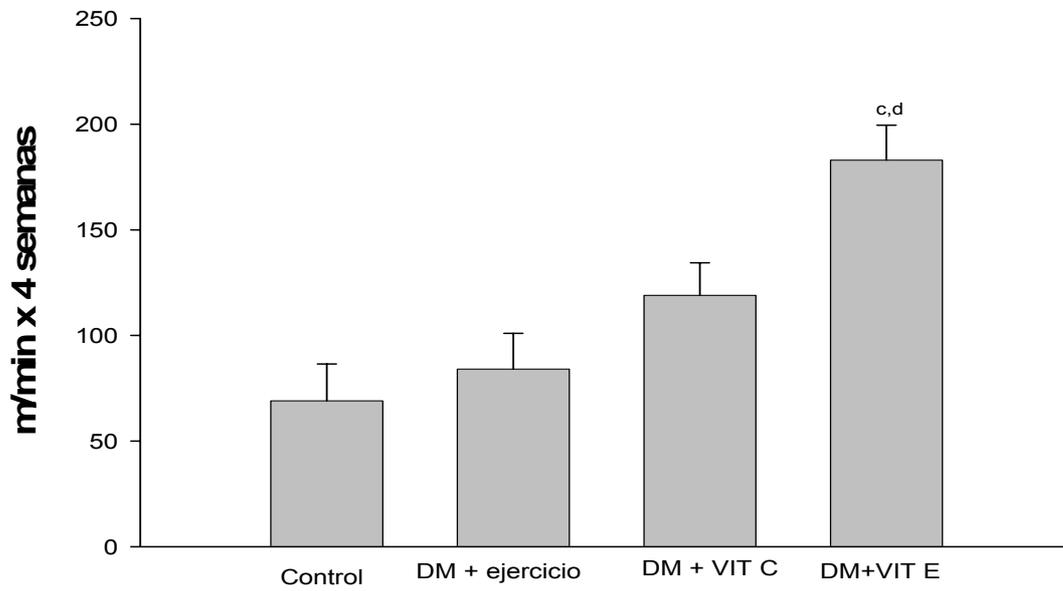


FIGURA 19.- Efecto de los antioxidantes en el resistencia física en ratas diabéticas.

XI.- DISCUSION.

Son varios los grupos de investigación que han atribuido a la DM un papel en el daño celular ya que se ha demostrado que altos valores de glucemia conducen al EOX, además se ha descrito que la DM está asociada con las reacciones oxidativas catalizadas por la transición de metales descompartmentalizados⁽¹¹⁾. Esta serie de hallazgos concuerdan con estudios que presentan considerables evidencias en las que se sugiere que el EOx juega un importante papel en la patogénesis y complicaciones de la DM^(104, 114). Los mecanismos que pueden contribuir al aumento de dicho estrés en pacientes diabéticos son diferentes, en particular en aquellos sujetos con pobre control de la glicemia e hipertriglicemia⁽¹²⁰⁾.

Se han estipulado varias teorías sobre como los RL causan daño a los diabéticos, sin embargo, los mecanismos que involucran el estado oxidativo en la DM aún no están completamente esclarecidos. Las evidencias acumuladas indican que el incremento en la producción de RL, como el ión superóxido o reducción del estatus antioxidante, juegan un importante papel para que se presente el EOx⁽¹⁰⁸⁾. Estos mecanismos incluyen a su vez la glucoxidación y la formación de productos avanzados de glucosilación, activación de la vía de los polioles, inactivación de las enzimas antioxidantes, del metabolismo del ascorbato y descontrol en el metabolismo del oxido nítrico y de las prostaglandinas⁽¹²¹⁾.

Para incrementar el Eox optamos con utilizar un modelo de ratas inducidas a diabetes con la utilización de streptozotocina (STZ) La STZ es un derivado de la nitrosourea aislado del *Streptomyces achromogenes* con actividad antibiótica y antineoplásica de amplio espectro⁽¹²²⁾, interfiere con el transporte de glucosa y la función de la glucocinasa, e induce múltiples puntos de ruptura en doble hélice del DNA.

Con respecto a los niveles de glucemia en ratas reportados como normales obtenidos en 1996 por Bissels; se obtuvo como valor normal en ayunas 70 – 110mg/dl y de hiperglucemia se manejaron valores mayores a 200mg/dl registrados en ratas de estudio posterior a la administración de STZ fue a consecuencia de la hipoinsulinemia secundaria a la destrucción selectiva de las

células β de los islotes de langerhans del páncreas⁽¹²³⁾, en este estudio se valoró la glucosa en ayunas, para evaluar que tanto el organismo se defiende del aumento de glucosa en sangre por la producción de insulina para contrarrestar este hecho, y se obtuvo que en el grupo control la glucemia llegó a un promedio de 157 mg/dl, la hiperglucemia superior a los 240 mg/dl se obtuvieron después de la administración de streptozotocina como ya lo mencionamos por consecuencia de la hipoinsulinemia secundaria a la destrucción de las células β de los islotes de langerhans del páncreas, proceso citotóxico que tiene la STZ sobre estas células, descrito por Junod en 1967⁽¹²⁴⁾.

Se puede observar en esta misma grafica 5 que los niveles de glucosa en el grupo donde se empleo la suplementación de vitamina C sin ejercicio físico, disminuyeron significativamente por debajo de los niveles del grupo control, siendo que en este padecimiento los niveles de esta vitamina son bajos, debido a que el transporte de esta es estimulado por la insulina un estudio realizado por Cunningham JJ. En 1998 demuestra que la vitamina C disminuye la resistencia a la insulina por la eliminación de los productos de la glucoxidación de las proteínas y del sorbitol⁽¹²⁵⁾.

Del ejercicio físico podemos comentar que los estudios realizados hasta el momento sugieren que los efectos inmediatos asociados a la lesión muscular son de tipo mecánico, y se originan fundamentalmente por la tensión soportada por el sarcómero de la fibra muscular⁽¹²⁶⁾. Diversos experimentos han demostrado como una excesiva tensión en el sarcómero es la principal causa de la lesión muscular por una disrupción intra y/o extracelular de las membranas que permite la hidrólisis de proteínas estructurales, provocando la desestructuración miofibrilar que se observa habitualmente⁽¹²⁷⁾.

Se ha visto que algunas variables influyen sobre el aumento de la actividad enzimática plasmática postejercicio físico, el entrenamiento previo, el género, la edad, la masa muscular, la ingesta de proteínas o la intensidad y duración del ejercicio físico^(128,129,130).

Los resultados experimentales de los últimos años de investigación indican que los radicales libres, no sólo provocan daño, sino que influye en la regulación de la función muscular ⁽⁶⁸⁾.

La bilirrubina es un indicador de la integridad del hígado junto con las aminotransferasas, que son enzimas que catalizan la transferencia de grupos amino o fosfato de un compuesto a otro. La AST se encuentra principalmente en los hepatocitos y en otros tejidos, como miocardio, músculo esquelético, riñones, cerebro, pulmones, leucocitos y eritrocitos, pero en menor concentración que en el hígado. Las AST se liberan hacia la sangre en grandes cantidades cuando hay daño a las membranas de estos órganos. En la actividad de AST se observa un incremento en los grupos que están comprometidos con el buen funcionamiento del organismo debido a el padecimiento de diabetes o al incremento de la oxidación por el ejercicio físico, y muestran una disminución considerable en los grupos suplementados con antioxidantes siendo mas significativo en el grupo diabético con vitamina E sin ejercicio físico, en comparación con el grupo control (0.5219 U/L $p < 0.05$).

El incremento de colesterol en pacientes diabéticos disminuye considerablemente la esperanza de vida al aumentar el riesgo cardiovascular por enfermedades coronarias en diabéticos, Kawakishi Uchida en 1990 demostró que la deficiencia por vitamina C retrasa el metabolismo de la lipoproteína de la baja densidad y produce hipercolesterolemia en ratas masculinas de od/od ⁽¹³¹⁾. En la grafica 4 se observa que hay una disminución a niveles basales de las concentraciones de colesterol en el grupo de ratas diabéticas + ejercicio físico + suplementación de vitamina C, así mismo con los grupos que están suplementados con vitamina E, estos resultados fueron comparados con el grupo control, pero las concentraciones con suplementación de vitamina E se pueden obtener en el grupo que solo se sometió a ejercicio físico.

Se determinaron las concentraciones de MDA, para evaluar el daño ocasionado por las especies reactivas del oxígeno ya que este es producto de la lipoperoxidación, se observó que el MDA se incrementó en los grupos que se sometieron al un mayor estrés oxidativo por la elevación de radicales libres como

es en el padecimiento de diabetes por la hiperglucemia y en el ejercicio físico por la mayor demanda de oxígeno. Se identificó que al ser suplementados con los antioxidantes disminuye su concentración (tablas 7 -10) siendo mas significativo en el grupo diabético donde solo se suplemento la vitamina C sin ejercicio físico en muestras de riñón e hígado, y de igual forma en el grupo diabético + ejercicio físico + vitamina C en muestras de corazón y músculo. Estos resultados coinciden con los expuestos por Clapés S. en el 1994 esta autora mostró en niños diabéticos la diferencias entre los antioxidantes y el daño a biomoléculas, respectivamente ⁽¹²⁶⁾. Resultados significativos en la diferencia numérica de los valores que muestran la actividad de las enzimas catalasa y SOD entre los grupos control y diabéticos. También fue significativa la diferencia de los valores obtenidos en la determinación de glutatión reducido entre ambos grupos, con $p < 0,05$ en este caso. El valor promedio de MDA es también superior en el grupo de diabéticos ($p < 0,05$) los valores de concentración de grupos carbonilos aunque muestran una tendencia al aumento no son estadísticamente diferentes. En cuanto a la SOD como indicador de la alteración de los sistemas antioxidantes en los animales inducidos a diabetes suplementado, por separado de vitamina C y vitamina E mostraron una disminución en los grupos comprometidos (diabéticos y ejercicio físico) de esta enzima e inversamente en los grupos que fueron suplementados con antioxidantes siendo nuevamente mas significativo el incremento en el grupo diabético suplementado con vitamina C sin ejercicio físico en muestras de hígado esto comparado con el grupo control.

XIII. CONCLUSIONES

1.- Los niveles de metabolitos séricos como la glucosa, se ven ampliamente disminuidos con la suplementación de vitamina C en los grupos de ratas diabéticas que realizan ejercicio físico.

2.- Así mismo los niveles de colesterol se mantienen en niveles basales al suplementar vitamina C.

3.- La suplementación de vitaminas C o E mantienen los niveles bajos de bilirrubina.

4.- Las ratas comprometidas por la diabetes se ven beneficiadas por la suplementación de antioxidantes al mantener los niveles bajos de ALT, esto quiere decir que dicha suplementación ayuda a proteger de la oxidación de órganos como hígado, riñón, corazón.

5.- Las enzimas antioxidantes endógenas se ven favorecidas al suplementar vitaminas C y E ya que observamos un incremento de estas en todas las muestras de grupos suplementados.

6.- El ejercicio físico aumenta el sistema antioxidante endógeno y este a su vez protege al músculo lo que favorece la resistencia física por la suplementación de las vitaminas antioxidantes antes mencionadas.

XIV.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1.-Rodríguez MM. Guerrero R. 1997. "Eficacia de la educación en diabetes en la glucemia de los pacientes con diabetes mellitus tipo 2." Salud Publica;37:39-44

2.-Norma oficial mexicana, "NOM-015-SSA2-1994, Para la prevención, tratamiento y control de la diabetes mellitus en la atención primaria." D.O. 26 de abril de 1994

1.1 OMS | Diabetes mellitas.

3.- http://www.who.int/topics/diabetes_mellitus/es/

1.2 Acceso: Febrero 2008

ROCHE

4.- http://www.roche.com.ve/Main/cuidadosysalud/InformacionparaelPaciente/SignosySíntomasdeLaDiabetes_esp.asp

Acceso: Julio 2007

INEGI

5.- <http://www.inegi.gob.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/contenidos/estadisticas/2004/edad04>

Acceso: Septiembre 2006

6.- Olaiz G, Rivera J, Shamah T, Rojas R, Villalpando S, Hernández M, Sepúlveda J. 2006."Encuesta nacional de salud y nutrición ENSANUT." Instituto nacional de salud publica.

CAMARA DE DIPUTADOS.

7.- <http://desarrollo.diputados.gob.mx/camara/content/view/full/45355> - 25k

8.- Ramos M, Bautista C, Gómez B. 2006 "Diabetes, estrés oxidativo y antioxidantes" Artículo de revisión .Centro de Investigación Biomédica de OccidenteVol. 8:1-3.

9.- Secretaría de Salud.1993. *Encuesta Nacional de Enfermedades Crónicas.* México: Secretaría de Salud.

10.- Wolff ,S.P 1987. "Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes." Biochem J. 245: 243-50.

11.- Wolff, S.P 1993. "Diabetes mellitus and free radicals, tranpiration metals and oxidative stress in the aetiology of diabetes mellitus and complications." Br Med Bull, 49:642-652.

12.- Jubiz W. 1984. "Factores de riesgo". En: Endocrinología clínica, México: El Manual Moderno, 158-160.

- 13.- Pull JA, Zorrilla E, 1992. Jadzinsky MN, Santiago JV. "*Diabetes mellitus. Complicaciones crónicas.*" México: Interamericana McGraw-Hill,
- 14.- Heras MR, Macías GR, A raíz del Rosario R.1996. "*Diabetes mellitus: complicaciones crónicas y factores de riesgo.*" Rev Med IMSS 34(6):449-455.
- 15.- Martínez Coyuela M.1995. "*Oxygen free radicals and human diseases.*" Biochemic 77,147-61.
- 16.- *Free Radical Brochure.* Randox Laboratories Ltd.
- 17.- Halliwell B and Gutteridge JM.1990. "*The antioxidants of human extracellular fluids.*" Arch Biochem Biophysics. 280: 1-8.
- 18.- Aldershvile J, Ambrosio G, Bayés de Luna A, Badimon L, Bertrand ME, Cleand J, 1998. "*Estrés oxidativo (especies de oxígeno reactivo), patología cardiovascular (Parte I).*" Eur Cardiol J 3(72):
- 19.- Slade R, Crissman K et al. 1993. "*Comparison of antioxidant substances in brochoalveolar lavage cells and fluid from humans, guinea pigs, and rats.*" Exp. Lung. Res. 19: 469-484.
- 20.- Cross AJ, Slater P et al. 1987. "*Sodium dependent D-[3H]aspartate binding in cerebral cortex in patients with Alzheimer's and Parkinson's diseases.*" Neurosci Lett. 79: 213-7.
- 21.- Bondy SC. 1992. "*Reactive oxygen species: relation to aging and neurotoxic damage.*" Neurotoxicology. 13: 87-100.
- 22.- Boveris A, Oshino N et al. 1972. "*The cellular production of hydrogen peroxyde. Biochem.*" J. 128: 617-630.
- 23.- Fenton HJH .1894. "*Oxidation of tartaric acid in the presence of iron*" J.Chem. Soc. Trans. 65: 899-910.
- 24.- Czapski G and Goldstein S.1995. "*The role of the reactions of .NO with superoxide and oxygen in biological systems: a kinetic approach.*" Free Radic Biol Med. 19: 785-94.
- 25.- Grisham MB, Jourd'Heuil D et al. 1999. Nitric oxide. I. "*Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites:implications in inflammation*". Am J Physiol. 276: G315-21.
- 26.- Kanofsky JR .1989. "*Singlet oxygen production by biological systems.*" Chem Biol Interact. 70: 1-28.
- 27.- Korycka-Dahi M and Richarson T .1981. "*Initiation of oxidative changes in food*". Symposium: oxidative changes in milk. J. Dairy Sciences. 63: 1181- 1208.

28.- Kaur H and Halliwell B.1994. "Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation. Nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients". FEBS Lett. 350: 9-12

29.- Doroshow JH and Davies KJ. 1983. "Comparative cardiac oxygen radical metabolism by anthracycline antibiotics, mitoxantrone, bisantrene, 4'-(9-acridinylamino)-methanesulfon-m-anisidide, and neocarzinostatin. " Biochem Pharmacol. 32: 2935-9.

30.- Von Sonntag C. 1994."Radiation chemistry in the 1990s: pressing questions relating to the areas of radiation biology and environmental research." Int J Radiat Biol. 65: 19-26.

31.- Trush MA, Mimnaugh EG et al. 1982. "Activation of pharmacologic agents to radical intermediates. Implications for the role of free radicals in drug action and toxicity". Biochem Pharmacol. 31: 3335-46.

CADENA DE TRANSPORTE MITOCONDRIAL.

32.- <http://www.naturozone.com/document/viReGrupEspRadLib.htm>
Acceso: Agosto 2007

33.- Cadenas E, Boveris A et al. 1977. "Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADPH-ubiquinone reductase and ubiquinolcytochrome c reductase from beef-heart mitochondria". Arch. Biochem. Biophys. 180: 248-257.

34. Ames BN, Shigenaga MK et al. 1993. "Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging". Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90: 7915-7922.

35.-Brand MD and Murphy MP. 1987. "Control of electron flux through the respiratory chain in mitochondria and cells." Biol. Rev. 62: 141-193.

36. - Slater TF. 1984. "Free radical mechanism in tissue injury". Biochem. J. 222: 1-15.

37.- Ames BN . 1983. "Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. Science." 221: 1256-1264.

38. - Cheeseman KH and Slater TF. 1993. "An introduction to free radical biochemistry". Br. Med. Bull. 49: 588-603

39.- Shigenaga MK, Hagen TM.1994. "Oxidative damage and mitochondrial decay in aging". Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91: 10771-10778.

40.-Davies KJA. 1987. "Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects." J. Biol. Chem. 262: 9895-9901.

41. - Stadtman ER. 1990. "Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences." Free Rad. Biol. Med. 9: 315-325.

42.- Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ1997. “ *Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation*”. Biochem J. 324:1-18

43.- Halliwell B and Auroma OI. 1991. “*DNA damage by oxygen derived species. Its mechanism of action and measurement in mammalian system*” FEBS Lett. 281: 9-19.

44.- Breen AP and Murphy JA. 1995. “*Reactions of oxyl radicals with DNA.*” Free Rad. Biol. Med. 18: 1033-1077.

45.- Wolff SPandDean RT. 1987. “*Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes.*” Biochem J. 245: 243-50.

46.- Borel P, Grolier P. 1998. “*Oxidative stress status and antioxidant status are apparently not related to carotenoid status in healthy subjects.*” J Lab Clin Med. 132: 61-63.

47.- Grootveld M, Henderson EB. 1991. “*Oxidative damage to hyaluronate and glucose in synovial fluid during exercise of the inflamed rheumatoid joint. Detection of abnormal low-molecular-massmetabolites by proton-n.m.r. spectroscopy*”. Biochem. J. 273: 459-467.

48.- Dansette PM, Sassi A, Deschamps C. 1990. “*Sulfur containing compounds as antioxidants.*” Antioxidants in Therapy and Preventive Medicine. Emerit I, Packer L, Auclair C (Eds). New York: Plenum Press; 209-215.

1.3 49. - OMS Actividad física

www.who.int/topics/physical_activity/es/

Acceso: Octubre 2006

50.- Pate, R. 1988. “*The evolving definition of physical. Ques t*”, 40, 174-179

51. Ortega R. 1999. “*Ejercicio físico Físico. Curso a dsitancia de prevención en atención primaria*”. En: Martín Zurro A, editor. 139-154.

52.- Pate RR, Pratt M. 1995. “*Physical activity and public health. A recommendation from the Centers for Disease Control and Prevention and the American College of Sports Medicine*”. Jama. 273: 402-7.

53.- Hoffman-Goetz L. 1998. “*Influence of physical activity and exercise on innate immunity*”. Nutr Rev. 56: S126-30.

54.- Hayes A and Williams D.1996. “*Beneficial effects of voluntary wheel running on the properties of dystrophic mouse muscle.*” J Appl Physiol. 80: 670-9.

- 55.- M. L. Pollock y J. H. Wilmore, 1990, " *Exercise in Health and Disease: Evaluation and Prescription for Prevention and Rehabilitation.*" Philadelphia: W.B. Saunders Company. 2da. ed.; 104,
- 56.- EJERCICIO AEROBICO
www.saludmed.com/CsEjercci/FisioEje/Met-Entr.html
Acceso: Febrero 2008
- 57.- Pérez M. " *Adaptación metabólica al ejercicio Fisiología del Ejercicio* " Universidad Europea de Madrid
- 58.- PRACTICA. VENTAJAS QUE SE OBTIENEN AL EJERCITARSE.
www.fitness.com.mx/practica008.htm
Acceso Febrero 2008.
- 59.- Ortega R. 1992 " *Medicina del ejercicio físico y del deporte para la atención a la salud.*" Editorial. Díaz de Santos,
- 60.- M. L. Pollock y J. H. Wilmore, 1990, " *Exercise in Health and Disease: Evaluation and Prescription for Prevention and Rehabilitation.*" 2da. ed.; 105
- 61.- LI Serra Majem, S. de Cambra, E. Saltó, E. Roura, F. Rodríguez, C. Vallbona y L. Salleras " *Consejo y prescripción de ejercicio físico*" Dirección General de Salud Pública. Departamento de Sanidad y Seguridad Social.
- 62.- Gonzales C. Sebastián E. 2000. " *Cualidades físicas*" Editorial INDE 9-13
- 63.- Günther B, Morgado E. 2005. " Rango homeostático del metabolismo oxidativo: 60 años de fisiometría integrativa" Rev. méd. Chile, 133: 362-370
- 64.- Martínez-C, Villarruel J A, González R, Pacheco F1 Ortiz G. 2005. " *Efecto del ejercicio aeróbico y anaeróbico combinado en la función endotelial y en las actividades enzimáticas de la atp sintasa mitocondrial de plaquetas de pacientes con cardiopatía isquémica*". Sociedad Mexicana de Bioquímica A.C.1-4
- 65.- Platonov, V.N.1994. " *La adaptación en el deporte*". Editorial Paidotribo.
- 66.- Viru A., Viru M. 2001. " *Análisis y control del Rendimiento Deportivo*". Editorial Paidotribo.
- 67.- Zintl, F.1991. " *Entrenamiento de la resistencia*". Martínez Roca
- 68.- Commoner B, Townsend J. 1954. " *Free radicals in biological materials*". Nature. 174: 689-91.

- 69.- Dillard CJ, Litov RE. 1978. "Effects of dietary vitamin E, selenium, and polyunsaturated fats on in vivo lipid peroxidation in the rat as measured by pentane production". *Lipids*. 13: 396-402.
- 70.- Davies KJA, Quintanilha AT. 1982. "Free radicals and tissue damage produced by exercise". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107: 1198-1205.
- 71.- Jackson MJ, Edwards RH . 1985. "Electron spin resonance studies of intact mammalian skeletal muscle". *Biochim Biophys Acta*. 847: 185-90.
- 72.- Sen CK, Atalay M. 1994. "Exercise-induced oxidative stress: glutathione supplementation and deficiency". *J Appl Physiol*. 77: 2177-87.
- 73.- Reid MB .2001. "Invited Review: redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't". *J Appl Physiol*. 90: 724-31.
- 74.- Reid MB, Stoik DS. 1994. "N-acetylcysteine inhibits muscle fatigue in humans". *J.Clin.Invest*. 94: 2468-2474.
- 75.- Cakatay U, Telci A. 2003. "Relation of aging with oxidative protein damage parameters in the rat skeletal muscle." *Clin Biochem*. 36: 51-5.
- 76.- Ramos ML, Bautista C, Gomez B, Zamora AL. 2006 "Diabetes, estrés oxidativo y antioxidantes" *Investigación en salud*. Vol. VIII • Número 1:4-10
- 77.- Rodríguez JM, Menéndez JR, Trujillo . 2001. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Rev Cubana Med Milit*;30:36-44.
- 78.- 65. Sahnoun Z, Jamoussie K, Zegal KM.1997. "Free radicals and antioxidants:human physiology and therapeutic aspects." *Therapics* ;52(4):251-70.
- 79.- . Cespedes T, Sanchez D.2000. "Algunos aspectos sobre el estrés oxidativo, el estado antioxidante y la terapia de suplementación." *Rev Cubana Cardiol*;14(1):55-60
- 80.- Fridovich I .1974." *Superoxide dismutases*." *Adv Enzimol*. 41: 35-97.
- 81.- Rodriguez AM, Carrico PM. 2000. *Mitochondrial or cytosolic catalase reverses the MnSOD-dependent inhibition of proliferation by enhancing respiratory chain activity, net ATP production, and decreasing the steady state levels of H(2)O(2)*". *Free Radic Biol Med*. 29: 801-13.
- 82.- *Rev Med IMSS* .1997. Volumen 35 (5):353-368 En Biblioteca Virtual en Salud de México
- 83.- Viña J, Pérez C. 1989. "Effect of oral glutathione on hepatic glutathione levels in rats and mice". *Br. J. Nutr*. 62: 683-691.

84.- Bendich A, Machlin LJ. 1986. "The antioxidant role of vitamina C. *Free radical biology and medicine*. " 2: 419-444.

85.- Frei B .1994. "Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: Mechanisms of action." *Am. J. Med.* 97: 5S-13S.

86.- Mangels AR, Holden JM. 1993. "Carotenoid content of fruits and vegetables: an evaluation of analitic data." *J. Am. Dietetic Assoc.* 93: 284- 296.

87.- FUENTE DE VITAMINA C.

<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/002404.htm#Fuentes%20alimenticias>. Acceso febrero 2008.

88.- Casanueva E, Kaufer-Horwitz, Perez – Lizaur A, Arroyo Pedro. 1998. *Nutriologia Medica*. Editorial Panamericana p260.

89.- Rock CL, Jacob RA. 1996. "Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients: vitamin C, vitamin E, and the carotenoids". *J Am Diet Assoc.* 96: 693-702; quiz 703-4.

90.- Niki E. 1987. "Interaction of ascorbate and alpha-tocopherol." *Ann N Y Acad Sci.* 498: 186-99.

91.- Parker RS. 1989. "Dietary and biochemical aspects of vitamin E." *Advances in food nutrition and research.* 33: 157-232.

Fuentes de vitamina E.

92.- www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/002406.htm - 23k - Acceso: Noviembre 2007

93.- Nazirog̃lu, M., Simsek, M., and Kutlu, M. 2004. "Moderate exercise with a dietary vitamin C and E combination protects streptozotocin-induced oxidative damage to the blood and improves fetal outcomes in pregnant rats." *Clin. Chem. Lab. Med.* 42: 511-517.

94.- Krasavage WJ and Terhaar CJ. 1977. d-alpha-Tocopheryl poly(ethylene glycol) 1000 succinate. Acute toxicity, subchronic feeding, reproduction, and teratologic studies in the rat. *J Agric Food Chem.* 25: 273-8.

95.- Kappus H and Diplock AT. 1992. "Tolerance and safety of vitamin E: a toxicological position report." *Free Radic Biol Med.* 13: 55-74.

96.- Weber P, Bendich A. 1997. "Vitamin E and human health: rationale determining recommended intake levels. *Nutrition*". 13: 450-60.

97.- Mahan LK, Escott S.1996 *Nutricion y dietoterapia de Krause*. 9ª. Ed. México: Mc Graw-Hill interam,ericana.

- 98.- Dillard CJ, Litov RE. 1978. "*Effects of dietary vitamin E, selenium, and polyunsaturated fats on in vivo lipid peroxidation in the rat as measured by pentane production*". *Lipids*. 13: 396-402.
- 99.- Zimmet, P.Z., McCarty, D.J., and de Courten, M.P.1997. "*The global epidemiology of non-insulin-dependent diabetes mellitus and the metabolic syndrome*". *Journal of Diabetes and its Complications* 11, 60-68.
- 100.- Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006
- 101.- Sato, Y., Hotta, N., Sakamoto, N., Matsuoka, S., Ohishi, N., and Yagi, K. 1979. "*Lipid peroxide level in the plasma of diabetic patients.*" *Biochemical Medicine and Metabolic Biology* 21(1),104-107.
- 102.- Velazquez, E., Winocour, P.H., Kesteven, P., Alberti, K.G., and Laker, M.F. 1991. "*Relation of lipid peroxides to macrovascular disease in type 2 diabetes.*" *Diabetic Medicine* 8, 752-758.
- 103.- Šardaš S, Yilmaz M, Öztok U, Çakir N, Karakaya AE. 2001. "*Assessment of DNA strand breakage by comet assay in diabetic patients and the role of antioxidant supplementation*". *Mutat Res*,490:123-129.
- 104.-Investigación en Salud.
www.fuedin.org/info/congresos/04_02/congreso.htm 2006.
Acceso Enero 2007.
- 105.- A pesar de la fuerte evidencia experimental que indica que el EOX puede determinar el comienzo y la progresión de complicaciones tardías en la DM, aun hay controversia acerca de si el incremento en el EOX es meramente asociativo más que causal en la DM. Esto se debe a que la medición del EOX se basa comúnmente en mediciones indirectas y no específicas de productos de EROS, y parcialmente se debe a que la mayoría de los estudios clínicos con pacientes de DM han sido de diseño transversal.
- 106.- Laaksonen, D.E., Atalay, M., Niskanen, L.K., Mustonen, J., Sen, C.K., Lakka, T.A., and Uusitupa, M.I.2000. "*Aerobic exercise and the lipid profile in type 1 diabetic men: a randomized controlled trial*". *Medicine and Science in Sports and Exercise* 32, 1541-1548.
- 107.- Cisneros E.2002. "La glutation peroxidasa y su importancia biomedica," *Rev Cubana Invest Biomed* 2002;14(1)
- 108.- Naziroglu, M, Butterworth P. J, 2005. "*Protective effects of moderate exercise with dietary vitamin C and E on blood antioxidative defense mechanism in rats with streptocin- induced diabetes.*" *Canadial Society for Exercise Physiology*. 30(2) :172-185.

- 109.- Selamoglu, S., Turgay, F., Kayatekin, B.M., Gonenc, S., and Islegen, C. 2000." *Aerobic and anaerobic training effects on the antioxidant enzymes of the blood.*" *Acta Physiologica Hungarica* 87, 267-273.
- 110.- Lakka, T.A., Venalainen, J.M., Rauramaa, R., Salonen, R., Tuomilehto, J., and Salonen, J.T.1994. "*Relation of leisure-time physical activity and cardiorespiratory fitness to the risk of acute myocardial infarction*". *The New England Journal of Medicine* 330, 1549-1554.
111. - Paffenbarger, R.S., Jr., Kampert, J.B., Lee, I.M., Hyde, R.T., Leung, R.W., and Wing, A.L. 1994. "*Changes in physical activity and other lifeway patterns influencing longevity.*" *Medicine and Science in Sports and Exercise* 26, 857-865.
- 112.- Laaksonen, D.E., Atalay, M., Niskanen, L., Uusitupa, M., and Hanninen, O., Sen, C.K. 1996. "*Increased resting and exercise-induced oxidative stress in young IDDM men.*" *Diabetes Care* 19, 569-574.
- 113.- Lyons, T.J. 1993. "*Glycation and oxidation: a role in the pathogenesis of atherosclerosis.*" *The American Journal of Cardiology* 71, 26B-31B. 1993.
- 114.- Ceriello A, Mercuri F, Quagliaro L, Assaloni R, Motz E, Tonutti L, Taboga C. 2001."*Detection of nitrotyrosine in the diabetic plasma: evidence of oxidative stress.*" *Diabetologia*; 44:834-838.
- 115.- Sánchez-Rodríguez M, Santiago-Osorio E, Vargas LA, Mendoza-Núñez VM. "*Propuesta de un constructo para evaluar integralmente el estrés oxidativo.*" *Bioquímica*, 2004;29:81-90.
- 116.- MacRury, S.M., Gordon, D., Wilson, R., Bradley, H., Gemmell, C.G., Paterson, J.R., Rumley, A.G., and MacCuish, A.C.1993. "*A comparison of different methods of assessing free radical activity in type 2 diabetes and peripheral vascular disease.*" *Diabetic Medicine* 10, 331-335.
- 117.- Garg MC, Bansal DD.2000 "*Protective antioxidant effect of vitamins C and E in streptozotocin induced diabetic rats*". *Indian J Exp Biol.* 38(2):101-4.
- 118.- Naziroglu M, Cay M. 2001. "*Protective role of intraperitoneally administered vitamin E and selenium on the antioxidative defense mechanisms in rats with diabetes induced by streptozotocin*". *Biol Trace Elem Res.* 79(2):149-59.
- 119.- Naziroglu, M., Simsek, .,Kutlu M.2005. "*Moderate exercise with a dietary vitamin C and E combination protects streptocin-induced oxidative damage to the blood and improves fetal outcomes in pregnant rats*". *Clini chem. Lab. Med.* 42:511-517
- 120.- Pitozzi V, Giovannelli L, Bardini G, Rotella CM, Dolara P. "*Oxidative DNA damage in peripheral blood cells in type 2 diabetes mellitus: higher vulnerability of polymorphonuclear leucocytes.*" *Mutat Res*, 2003;529:129-133.

Grupo sobre entrenamiento.

121.- www.sobrentrenamiento.com/PubliCE/articulo.asp?Ida=558&tp=s2005.

Acceso : Abril 2007

122.- Bono VH, Jr. "Review of mechanism of action studies of the nitrosoureas." Cancer Treat Rep 1976; 60 (6): 699-702.

123.- Bissels, GJ., et al. "Place learning and hippocampal synaptic in streptozotocin – induced diabetic rats". Diabetes; 1996 45:1259-1265

124.- Junod, A., Lambert, AE., Orci, L., Pictet, R. "Studies of the diabetogenic action of streptozotocin". Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 1967 126:201-21.

125.- Cunningham JJ. *Micronutrients as nutraceutical interventions in diabetes mellitus*. J Am Coll Nutr 1998;17:7–10

126.- 116. Armstrong RB, Ogilvie RW et al. (1983) "Eccentric exercise-induced injury to rat skeletal muscle". J Appl Physiol. 54: 80-93.

127.- Lieber RL and Friden J (1999) "Mechanisms of muscle injury after eccentric contraction". J Sci Med Sport. 2: 253-65.

128.- Amelink GJ, Koot RW et al. (1990) "Sex-linked variation in creatine kinase release, and its dependence on oestradiol, can be demonstrated in an invitro rat skeletal muscle preparation". Acta Physiol Scand. 138: 115-24.

129.- Bar PR, Amelink GJ et al. (1988) "Prevention of exercise-induced muscle membrane damage by oestradiol". Life Sci. 42: 2677-81.

130.- Galen RS (1979) "The enzyme diagnosis of myocardial infarction in the orthopedic patient". Orthop Clin North Am. 10: 451-63.

131.- Uchida K, Kawakishi S "Selective oxidation of histidine residues in proteins or peptides through the copper(II)-catalysed autoxidation of glucosone" Department of Food Science and Technology, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-01, Japan 1990



GLUCOSE -TR

Glucosa

Trinder, GOD-POD

Determinación cuantitativa de glucosa IVD

Conservara: 3-8°C

PRINCIPIO DEL MÉTODO

La glucosa oxidasa (GOD) cataliza la oxidación de glucosa a ácido glucónico. El peróxido de hidrógeno (H₂O₂) producido se detecta mediante un aceptor cromogénico de oxígeno, fenil-ampiroso en presencia de peroxidasa (POD):



La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra ensayada^{1,2}.

SIGNIFICADO CLÍNICO

La glucosa es la mayor fuente de energía para las células del organismo; la insulina facilita la entrada de glucosa en las células. La diabetes mellitus es una enfermedad que cursa con una hiperglucemia, causada por un déficit de insulina^{3,4}. El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio.

REACTIVOS

R 1 Tampon	TRIS pH 7,4 Fenol	92 mmol/L 0,3 mmol/L
R 2 Sueros	Glucosa oxidasa (GOD) Peroxidasa (POD) 4 - Aminofenazona (4-AP)	15000 U/L 1000 U/L 2,6 mmol/L
GLUCOSE CAL	Patrón primario acuoso de Glucosa	100 mg/dL

PREPARACIÓN

Reactivo de trabajo (RT): Disolver (-) el contenido de un vial de R 2 Enzimas en un frasco de R 1 Tampon.
Tapar y mezclar suavemente hasta disolver su contenido.
Estabilidad: 1 mes en nevera (2-8°C) o 7 días a Temperatura ambiente (15-25°C).

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Todos los componentes del kit son estables, hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, cuando se mantienen los frascos bien cerrados a 3-8°C, protegidos de la luz y se evita la contaminación durante su uso.

No usar reactivos fuera de la fecha indicada.

GLUCOSE CAL

Una vez abierto, es estable 1 mes si se mantienen los viales bien cerrados a 3-8°C, protegidos de la luz y se evita su contaminación.

Indicaciones de deterioro de los reactivos:

- Presencia de partículas y turbidez.
- Absorbancia (A) del Blanco a 505 nm > 0,10.

MATERIAL ADICIONAL

- Espectrofotómetro o analizador para lecturas a 505 nm.
- Cubetas de 1,0 cm de paso de luz.
- Equipamiento habitual de laboratorio.

MUESTRAS

Suero o plasma, libre de hemólisis⁵ y LCR.

El suero debe separarse lo antes posible del coágulo.

Estabilidad: La glucosa en suero o plasma es estable 3 días a 3-8°C.

PROCEDIMIENTO

- Condiciones del ensayo:
Longitud de onda: 505 nm (490-550)
Cubetas: 1 cm paso de luz
Temperatura: 37°C / 15-25°C
- Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.
- Pipetear en una cubeta:

	Blanco	Patrón	Muestra
RT (mL)	1,0	1,0	1,0
Patrón ⁶ (µL)	-	10	-
Muestra (µL)	-	-	10

- Mezclar e Incubar 10 minutos a 37°C ó 30 min a temperatura ambiente (15-25°C).
- Leer la absorbancia (A) del Patrón y la muestra, frente al Blanco de reactivo. El color es estable como mínimo 30 minutos.

CÁLCULOS

(A)Muestra x 100 (Conc. Patrón) = mg/dL de glucosa en la muestra
(A)Patrón

Factor de conversión: mg/dL x 0,0558 = mmol/L.

CONTROL DE CALIDAD

Es conveniente analizar junto con las muestras suero control valorado: SPINROL H Normal y Patológico (Ref. 1002100 y 1002110).

Si los valores hallados se encuentran fuera del rango de tolerancia, revisar el instrumento, los reactivos y el calibrador.

Cada laboratorio debe disponer su propio Control de Calidad y establecer conexiones en el caso de que los controles.

VALORES DE REFERENCIA¹

Suero o plasma:
60 - 110 mg/dL = 3,33 - 6,10 mmol/L

LCR:

60 - 80 % del valor en sangre

Estos valores son orientativos. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO

Rango de medida: Desde el límite de detección de 0,04 mg/dL hasta el límite de linealidad de 500 mg/dL.

Si la concentración es superior al límite de linealidad, diluir la muestra 1:2 con ClNa 9 g/L y multiplicar el resultado final por 2.

Linealidad:

Media (mg/dL)	Intensidad (m200)		Intensidad (m300)	
	95,8	241	95,4	240
SD	0,81	1,43	1,55	3,73
CV (%)	0,83	0,59	1,58	1,55

Sensibilidad analítica: 1 mg/dL = 0,0056 A.

Exactitud: Los reactivos de SPINREACT (y) no muestran diferencias sistemáticas significativas cuando se comparan con otros reactivos comerciales (x).

Los resultados obtenidos con 50 muestras fueron los siguientes:

Coefficiente de correlación (r): 0,99.

Ecuación de la recta de regresión: y = 1,0x + 0,13.

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

INTERFERENCIAS

No se han observado interferencias con hemoglobina hasta 4 g/L, bilirrubina hasta 20 mg/L, creatinina hasta 100 mg/L, galactosa hasta 1 g/L. Se han descrito varias drogas y otras sustancias que interfieren en la determinación de la glucosa^{1,4}.

NOTAS

- La calibración con el Patrón acuoso puede dar lugar a errores sistemáticos en métodos automáticos. En este caso, se recomienda utilizar calibradores séricos.
- Usar puntas de pipeta desechables limpias para su dispensación.
- SPINREACT dispone de instrucciones detalladas para la aplicación de este reactivo en distintos analizadores.

BIBLIOGRAFÍA

- Kaplan A. Glucose. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis, Toronto, Princeton 1984; 1032-1036.
- Trinder P. Ann Clin Biochem 1969; 6: 24-33.
- Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACCC Press, 1995.
- Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACCC Press, 1995.
- Burns A et al. Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACCC 1989.
- Tech N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed AACCC 1985.

PRESENTACIÓN

Ref:1001100 4 x 125 mL
Ref:1001191 4 x 250 mL



IMPORTADORES EXCLUSIVOS / LAS CLINICAS DE MÉDICO S.A. (CIE) S.V.
Carretera de San Teodoro 608, Pinar. B. de los Venados, Pinar del Río, de México C.P. 81140
TEL.: 051 242 22 22 22 FAX: 051 242 22 22 22
WWW.CIE.MEXICO.COM



BILIRUBIN T&D

Bilirrubina Total y Directa

DMSC, Colorimétrico

Determinación cuantitativa de bilirrubina

IVD

Conservar a 2-8°C

PRINCIPIO DEL MÉTODO

La bilirrubina se convierte en azobilirrubina mediante el ácido sulfúrico clorato reduciendo fotocromáticamente. De las dos fracciones presentes en suero, bilirrubinoglicuronido y bilirrubina libre ligada a la albúmina, sólo la primera reacciona en medio ácido (bilirrubina directa) produciendo la segunda la azobilirrubina con dimetilsulfóxido (DMSC) para que reaccione (bilirrubina indirecta). En la determinación de la bilirrubina indirecta se determina también la directa, correspondiendo el resultado a la bilirrubina total. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de bilirrubina presente en la muestra ensayada¹.

SIGNIFICADO CLÍNICO

La bilirrubina se origina por la degradación de la hemoglobina. La transportación del hemo al hígado y su excreta en la biliar. La hiperbilirrubinemia es el resultado de un incremento de la bilirrubina en plasma. Causas más probables de la hiperbilirrubinemia: Bilirrubina Total (T): Aumento de la hemólisis, alteraciones genéticas, anemia neonatal, alteraciones eritropoyéticas, presencia de drogas. Bilirrubina Directa (D): Colestasis hepática, alteraciones genéticas y alteraciones hepáticas^{2,3}. El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio.

REACTIVOS

R 1 (S)	Ácido sulfúrico Ácido clorhídrico (CH)	50 mmol/L 150 mmol/L
R 2 (T)	Ácido sulfúrico Ácido clorhídrico (CH) Dimetilsulfóxido (DMSC)	50 mmol/L 50 mmol/L 7 mmol/L
R 3	Sodio nitrilo	29 mmol/L
Opcional	BILIRUBIN CAL Calibrador de bilirrubina 20 mg/dL Ref: 100200	

PRECAUCIONES

Ácido clorhídrico (CH): Evitar (S) R0637000 into los ojos, la piel y las vías respiratorias. S05 En caso de contacto con los ojos, lívense inmediata y abundantemente con agua y acudir a un médico.

PREPARACIÓN

Todos los reactivos están listos para su uso.

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Todos los componentes del kit son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial, cuando se mantienen los viales bien cerrados a 2-8°C, protegidos de la luz y se evita la contaminación durante su uso. No usar reactivos fuera de la fecha indicada. Indicaciones de deterioro de los reactivos:
- Presencia de partículas y turbidez.
- Desarrollo de color en el R 2.

MATERIAL ADICIONAL

- Espectrofotómetro o analizador para lecturas a 555 nm.
- Cúvetas de 1,0 cm de paso de luz.
- Equipamiento habitual de laboratorio.

MUESTRAS

Suero o plasma libre de hemólisis (separado lo antes posible de los hemáties). Proteger de la luz. Estabilidad de la muestra separada ya de los hemáties: 4 días a 2-8°C o 2 meses a -20°C.

PROCEDIMIENTO

- Condiciones del ensayo:
Longitud de onda: 555 nm (520-580)
Cúvetas: 1,0 cm paso de luz
Temperatura: 15-20°C
- Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.
- Pipetear en una cubeta:

	Bianco	B. Total	Bianco	B. Directa
R 1 (S) (mL)	--	--	1,5	1,5
R 2 (T) (mL)	1,5	1,5	--	--
R 3 (µL)	--	50	--	50
Muestra ¹ /Calibrador (µL)	100	100	100	100

- Muestras incubar exactamente 5 minutos a 15-20°C.
- Leer la absorbancia (A).

CÁLCULOS

- Con Calibrador:
$$\frac{(A)_{\text{Muestra}} - (A)_{\text{Bianco Calibrador}}}{(A)_{\text{Calibrador}} - (A)_{\text{Bianco Calibrador}}} \times \text{Conc. Calibrador} = \text{mg/dL de bilirrubina}$$

- Con Factor:
$$(A)_{\text{Muestra}} - (A)_{\text{Bianco Muestra}} \times \text{Factor} = \text{mg/dL de bilirrubina en la muestra}$$

*Factor:
$$\frac{\text{Concentración del Calibrador}}{(A)_{\text{Calibrador}} - (A)_{\text{Bianco Calibrador}}}$$

Factor teórico: Bilirrubina (T) = 19,1 ; Bilirrubina (D) = 14

Factor de conversión: mg/dL x 17,1 = µmol/L

CONTROL DE CALIDAD

Es conveniente analizar junto con las muestras suero control valorado: SPINREACT H Normal y Patológico (Ref: 100200 y 100210). Si los valores hallados se encuentran fuera del rango de tolerancia, revisar el instrumento, los reactivos y el calibrador. Cada laboratorio debe disponer su propio Control de Calidad y establecer correlaciones en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias.

VALORES DE REFERENCIA⁴

Bilirrubina Total Hasta 1,10 mg/dL o 18,91 µmol/L
Bilirrubina Directa Hasta 0,25 mg/dL o 4,27 µmol/L

Esos valores son orientativos. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO

Rango de medida: Desde el límite de detección de (T) 0,5 mg/dL, (D) 0,04 mg/L hasta el límite de linealidad de 20 mg/dL.

Si la concentración de la muestra es superior al límite de linealidad, diluir 1:2 con Clifit R y multiplicar el resultado final por 2.

Exactitud:

Bilirrubina T	Intervalo (n° 20)	Intervalo (n° 25)
Media (mg/dL)	1,12	0,38
SD	0,02	0,12
CV (%)	2,18	2,27

Bilirrubina D	Intervalo (n° 20)	Intervalo (n° 25)
Media (mg/dL)	0,08	2,28
SD	0,01	0,02
CV (%)	1,51	1,18

Sensibilidad analítica:

1 mg/dL = 0,015 A (T)
1 mg/dL = 0,025 A (D)

Exactitud: Los reactivos SPINREACT no muestran diferencias sistemáticas significativas cuando se comparan con otros reactivos comerciales. Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

INTERFERENCIAS

La presencia de hemólisis destruye el valor de bilirrubina⁵. Se han descrito varios drogas y otras sustancias que interfieren con la determinación de bilirrubina⁶.

NOTAS

- Para la determinación de bilirrubina en neonatos, pipetear 50 µL de muestra. Multiplicar el resultado obtenido por 2.
- SPINREACT dispone de instrucciones detalladas para la aplicación de este reactivo en distintos analizadores.

BIBLIOGRAFÍA

- Kaplan A et al. *Bilirubin*. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St. Louis, Toronto, Princeton 1984; 1239-1241, 423 and 952.
- Hickey H T. et al. The determination of bilirubin with the photoelectric colorimeter. *J. Biol Chem* 1937; 112, 2: 481-484.
- Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACO Press, 1986.
- Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACO, 2004.
- Burke A et al. *Textbook of Clinical Chemistry*, 3rd ed AACO, 1994.
- Tarachi W et al. *Clinical Guide to Laboratory Tests*, 3rd ed AACO, 1995.

PRESENTACIÓN

Ref: 1001044		R 1 (S) 1 x 150 mL
	Cont.	R 2 (T) 1 x 150 mL
		R 3 1 x 10 mL



IMPORTADORES EXCLUSIVOS | LAN CENTER DE MÉXICO S.A. DE CV.
Carretera de las Torres #20 Pte. San Mateo Atlix, de México C.P. 72140
Tel.: 01 (222) 260-5170 | Fax: 01 (222) 212-0131 | 01 (222) 260-1110
www.spinreact.com.mx | info@spinreact.com.mx

Ensayo cualitativo para su uso como diluyente en la detección, identificación y titulación de anticuerpos.

Conservar a 2...8°C
IVD

PRINCIPIO DEL METODO

Las soluciones de Albúmina Bovina son reactivos complementarios de gran utilidad en técnicas inmunohematológicas diversas para poner de manifiesto la reacción entre anticuerpo de pequeño tamaño (clase IgG) y sus antígenos correspondientes.

La albúmina actúa disminuyendo el potencial zeta y aumentando la constante dieléctrica del medio, con lo cual la fuerza de repulsión entre hematíes se reduce facilitando su aglutinación.

La Solución al 22% se emplea a menudo en la primera etapa de la prueba indirecta de la globulina y en la titulación de anticuerpos de tipo IgG (incompletos), mientras que la solución al 30% se aplica principalmente en las pruebas cruzadas y en ensayos de detección e identificación de anticuerpos.

REACTIVOS

Solución de Albúmina Bovina
Ázida sódica 0,95 g/L

PRECAUCIONES

Aunque los reactivos no son de origen humano y, por lo tanto, exentos de virus HIV y Hepatitis B, se aconseja manipular los reactivos y las muestras con las precauciones debidas.

CONSERVACION Y ESTABILIDAD

1. Todo estos reactivos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial, cuando se mantienen los viales bien cerrados a 2-8°C y se evita la contaminación durante su uso.
2. Estos reactivos son claros y transparentes, la presencia de turbidez puede indicar contaminación microbiana. No usar si aparece turbio.

MATERIAL ADICIONAL

Tubos hemólisis, pipeta automática y centrifuga Sero-fuge o similar.

MUESTRAS

Si la prueba se efectúa de inmediato, puede utilizarse sangre total anticoagulada o sangre coagulada en su propio suero.

Muestras recogidas en EDTA o Heparina deberán ensayarse antes de 48 horas.

Muestras recogidas en ACD, CPD, CPDA-1 mantienen su reactividad durante 35 días.

Guardar las muestras a 2-8°C.

PROCEDIMIENTO

Titulación de anticuerpos

Prueba en tubo

Esta técnica determina la tasa de anticuerpos resultante del embarazo y de reacciones transfusionales.

1. Preparar una suspensión al 2% de hematíes adecuados en Albúmina Bovina.
2. Rotular 10 tubos del 1-10 y añadir 0,1 mL de Albúmina Bovina en cada uno, exceptuando el primero.
3. Pipetear 0,1 mL del suero problema en los tubos 1 y 2.
4. Con una pipeta limpia, mezclar varias veces el contenido del tubo 2 y transferir 0,1 mL al tubo 3; desechar la pipeta.

5. Con una pipeta limpia, mezclar el contenido del tubo 3 y transferir 0,1 mL al tubo 4; desechar la pipeta. Continuar la doble dilución hasta el último tubo, separando el 0,1 mL final por si se precisara extender la titulación.
6. Añadir en cada tubo 0,1 mL de la suspensión al 2% de hematíes preparada en la forma anteriormente descrita. Mezclar.
7. Incubar todos los tubos a 37°C durante 30 minutos.
8. Mezclar y centrifugar a 3400 r.p.m. o 1000 g, 30 segundos.

Lectura e interpretación

Agitar ligeramente el tubo y observar la aparición microscópica de aglutinación.

Reacción Negativa: La resuspensión de los hematíes es homogénea.

Reacción positiva: Los hematíes permanecen aglutinados una vez resuspendidos.

Detección de anticuerpos y Pruebas cruzadas

Prueba en tubo.

1. Preparar una suspensión al 2% de hematíes, en Solución Salina.
2. En un tubo de hemólisis añadir :
 - 1 gota de hematíes (hematíes conocidos o hematíes donante)
 - 2 gotas del suero (suero problema o suero receptor)
 - 3 gotas de Albúmina Bovina
3. Mezclar e incubar a 37°C durante 30 minutos.
4. Mezclar y centrifugar a 3400 r.p.m. o 1000 g, 30 segundos.

Lectura e interpretación

Ver **Titulación de anticuerpos. Prueba en tubo**

Para la titulación e identificación de anticuerpos empleando Albúmina Bovina recurrir a un panel de hematíes y seguir las instrucciones dadas por la empresa suministradora.

En todos los tubos puede efectuarse la Prueba Indirecta de Coombs siguiendo las instrucciones dadas en el Folleto correspondiente al Suero Antiglobulina Humana.

CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda con cada procedimiento la inclusión de un autocontrol empleando los hematíes del receptor y su propio suero.

La concentración de las suspensiones celulares será uniforme, debiendo cada laboratorio establecer los tiempos óptimos de centrifugación y de incubación para cada ensayo con el material de que disponga.

BIBLIOGRAFÍA

1. Diamond, I.K. and Denton, R.L.: J. Lab. Clin Med., 30, 821 (1945)
2. Pollack, W.: Transfusion (Philadelphia), 4, 411 (1964)

PRESENTACION

Ref: 1700071	Albumina Bovina 30%	10 mL
Ref: 1700072	Albumina Bovina 22%	10 mL



HDLc -P

Colesterol HDL
Reactivo precipitanteReactivo precipitante de HDL colesterol
IVD

Conservar a 2-8°C

PRINCIPIO DEL MÉTODO

Las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y baja densidad (LDL) del suero o plasma, se precipitan con fosfotungstato en presencia de iones magnésio. Tras su centrifugación, el sobrenadante claro conteniendo las lipoproteínas de alta densidad (HDL) se emplea para determinar el colesterol HDL.^{1,2}

SIGNIFICADO CLÍNICO

El colesterol transportado por las lipoproteínas de alta densidad (HDL) a menudo se denomina 'colesterol bueno', ya que niveles elevados están relacionados con un menor riesgo cardiovascular.

Un nivel bajo de colesterol HDL es considerado uno de los principales factores de riesgo cardiovascular³.

El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio.

REACTIVOS

R	Ácido fosfotúngstico	14 mmol/L
Reactivo precipitante	Cloruro magnésico	2 mmol/L
Optional	Colesterol	Ref. 1001092 Ref. 1001093

PREPARACION

El reactivo está listo para su uso.

CONSERVACION Y ESTABILIDAD

Todos los componentes del kit son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta del vial, cuando se mantienen los viales bien cerrados a 2-8°C, protegidos de la luz y se evita la contaminación durante su uso.

No usar reactivos fuera de la fecha indicada.

Indicadores de deterioro de los reactivos:

- Presencia de partículas y turbidez.

MATERIAL ADICIONAL

- Espectrofotómetro o analizador para lecturas a 505 nm (500-550).
- Cubetas de 1,0 cm de paso de luz.
- Equipamiento habitual de laboratorio.

MUESTRASSuero o plasma¹.

No utilizar muestras hemolizadas. Separar el suero de las hemáticas lo antes posible.

Estabilidad de la muestra: 7 días a 2-8°C.

PROCEDIMIENTO

Precipitación

1. Dosificar en tubos de centrifuga:

R (µL)	100
Muestra (mL)	1,0

2. Mezclar y dejar reposar 10 minutos a temperatura ambiente.
3. Centrifugar 20 min a 4000 r.p.m. ó 2 min a 12000 r.p.m.
4. Recoger el sobrenadante y determinar el HDL Colesterol.

Ensayo

Proceder según lo indicado en las instrucciones de trabajo del reactivo de Colesterol.

CÁLCULOS

- Con Calibrador:

$$\frac{(A)Muestra}{(A)Calibrador} \times (\text{Conc. Calibrador}) = \text{mg/dL HDLc en la muestra}$$

- Con Factor:

$$A_{505} \times Muestra \times 320 = \text{mg/dL HDLc en la muestra}$$

$$A_{505} \times Muestra \times 475 = \text{mg/dL HDLc en la muestra}$$

Cálculo LDL-colesterol

Se calcula mediante la fórmula de Friedewald

$$\text{LDL colesterol} = \text{Colesterol total} - \frac{\text{Triglicéridos}}{5} - \text{HDL colesterol}$$

CONTROL DE CALIDAD

Es conveniente analizar junto con las muestras suero control valorado: SPINROL H Normal y Patológico (Ref. 1002100 y 1002210).

Si los valores hallados se encuentran fuera del rango de tolerancia, revisar el instrumento, los reactivos y el calibrador.

Cada laboratorio debe disponer su propio Control de Calidad y establecer conexiones en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias.

VALORES DE REFERENCIA²

HDL-colesterol:

	Hombres	Mujeres
Riesgo menor	> 55 mg/dL	> 65 mg/dL
Riesgo normal	35-55 mg/dL	45-65 mg/dL
Riesgo elevado	< 35 mg/dL	< 45 mg/dL

LDL-colesterol:

Valores sospechosos a partir de	: 150 mg/dL
Valores elevados a partir de	: 190 mg/dL

Estos valores son orientativos. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO

Rango de medida: Desde el límite de detección de 1,57 mg/dL hasta el límite de linealidad de 375 mg/dL.

Si la concentración es superior al límite de linealidad, diluir la muestra 1/2 con CH₂O 9 g/L y multiplicar el resultado final por 2.

Precisión:

	Iniciante (m20)		Iniciante (m20)	
Media (mg/dL)	75,6	33,9	85,2	182
SD	0,89	0,85	2,55	3,24
CV (%)	1,18	2,51	2,73	1,88

Sensibilidad analítica: 1 mg/dL = 0,0015 A.

Exactitud: Los reactivos SPINREACT (y) no muestran diferencias sistemáticas significativas cuando se comparan con otros reactivos comerciales (x).

Los resultados obtenidos con 50 muestras fueron los siguientes:

Coefficiente de correlación (r): 0,99.

Ecuación de la recta de regresión: y=0,994x - 1,2345.

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

INTERFERENCIAS

No se han observado interferencias con triglicéridos hasta 4 g/L¹.

Se han descrito varias drogas y otras sustancias que interfieren en la determinación del Colesterol HDL^{1,6}.

NOTAS

SPINREACT dispone de instrucciones detalladas para la aplicación de este reactivo en distintos analizadores.

BIBLIOGRAFIA

1. Nels H K. High-density lipoprotein (HDL) cholesterol. Kaplan A et al. Clin Chem The C.K. Mosby Co. St Louis, Toronto, Princeton 1984; 1207-1213 and 437.
2. Grove T H. Effect of reagent pH on Determination of HDL Cholesterol by precipitation with Sodium Phosphotungstate-magnesium. Clin Chem 1978; 25:580.
3. US National Cholesterol Education Program of the National Institutes of Health.
4. Young SS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed. AACCC Press, 1995.
5. Young SS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed. AACCC Press, 1995.
6. Burtis A. et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed. AACCC 1998.
7. Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed. AACCC 1995.

PRESENTACIONRef: 1001095

004

 4 x 5 mL

82912 Ed.2005



SPINREACT, S.A. Cda. Reina Coelia, 18. 17115 SANT ESTEVE DE BAS (GI) SPAIN
Tel: +34 972 88 00 Fax: +34 972 89 00 e-mail: comercial@spinreact.com



CE GPT (ALT)-LQ

GPT (ALT)

NADH. Clínico UV. IFCC rec. Líquido

Determinación cuantitativa de alanina aminotransferasa GPT (ALT) IVD

Conservar a 2-8°C

PRINCIPIO DEL MÉTODO

La alanina aminotransferasa (ALT) inicialmente llamada transaminasa glutámico pirúvico (GPT) cataliza la transferencia reversible de un grupo amino de la alanina al α -cetoglutarato con formación de glutamato y piruvato. El piruvato producido es reducido a lactato en presencia de lactato deshidrogenasa (LDH) y NADH:



La velocidad de disminución de la concentración de NADH en el medio, determinado fotométricamente, es proporcional a la concentración catalítica de ALT en la muestra ensayada.

SIGNIFICADO CLÍNICO

La ALT es una enzima intracelular, se encuentra principalmente en las células del hígado y el riñón.

Su mejor aplicación es en el diagnóstico de las enfermedades del hígado. Se observan niveles elevados en enfermedades hepáticas como la hepatitis, enfermedades de los músculos y traumatismos.

Cuando se emplean en conjunto con la AST ayuda en el diagnóstico de infartos de miocardio, ya que el valor de la ALT se mantiene dentro de los límites normales y aumenta en los niveles de AST^{1,2}.

El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio.

REACTIVOS

R 1 Tampon	TRIS pH 7,8 Lactato deshidrogenasa (LDH) L-Alanina	100 mmol/L 1200 U/L 500 mmol/L
R 2 Substrato	NADH α -Cetoglutarato	0,18 mmol/L 15 mmol/L

PREPARACION

Reactivo de trabajo (RT)

Mixturar:

8 vol. (R1) Tampon + 1 vol. de (R2) Substrato

Estabilidad: 21 días a 2-8°C o 72 horas a temperatura ambiente.

CONSERVACION Y ESTABILIDAD

Todos los componentes del kit son estables, hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, cuando se mantienen los frascos bien cerrados a 2-8°C, protegidos de la luz y se evita su contaminación.

No usar reactivos fuera de la fecha indicada.

Indicaciones de deterioro de los reactivos:

- Presencia de partículas y turbidez.
- Absorbancias del blanco a 340 = 1,00.

MATERIAL ADICIONAL

- Espectrofotómetro o analizador para lecturas a 340 nm.
- Baño termostable a 25°C, 30°C o 37°C (u 0,1°C)
- Cubetas de 1,0 cm de paso de luz.
- Equipamiento habitual de laboratorio.

MUESTRAS

Suero o plasma¹. Estabilidad de la muestra: 7 días a 2-8°C.

PROCEDIMIENTO

- Condiciones del ensayo:
Longitud de onda: 340 nm
Cubeta: 1 cm paso de luz
Temperatura constante: 25°C / 30°C / 37°C
- Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada o aire.
- Pipetear en una cubeta:

RT (mL)	1,0
Muestra (μ L)	100

- Mixturar, incubar 1 minuto.
- Leer la absorbancia (A) inicial de la muestra, poner en marcha el cronómetro y leer la absorbancia cada minuto durante 3 minutos.
- Calcular el promedio del incremento de absorbancia por minuto ($\Delta A/\text{min}$).

CALCULOS

$\Delta A/\text{min} \times 1750 = \text{U/L de ALT}$

Unidades: La unidad internacional (UI) es la cantidad de enzima que convierte 1 μ mol de sustrato por minuto, en condiciones estándar. La concentración se expresa en unidades por litro (U/L).

Factores de conversión de temperaturas

Los resultados pueden transformarse a otras temperaturas multiplicando por:

Temperatura de medición	Factor para convertir a		
	25°C	30°C	37°C
25°C	1,00	1,33	1,83
30°C	0,75	1,00	1,33
37°C	0,55	0,75	1,00

CONTROL DE CALIDAD

Es conveniente analizar junto con las muestras suero control valorados SPINROL H Normal y Patológico (Ref. 1000100 y 1000210).

Si los valores hallados se encuentran fuera del rango de tolerancia, se debe revisar el instrumento, los reactivos y la técnica.

Cada laboratorio debe disponer su propio Control de Calidad y establecer condiciones en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias.

VALORES DE REFERENCIA^{1,2}

	25°C	30°C	37°C
Hombres	Hasta 22 U/L	29 U/L	40 U/L
Mujeres	Hasta 16 U/L	22 U/L	32 U/L

En recién nacidos normales se han descrito valores de referencia hasta el doble del de los adultos, debido a su inmadurez hepática, estos valores se normalizan aproximadamente a los tres meses.

Estos valores son orientativos. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

CARACTERISTICAS DEL MÉTODO

Rango de medida: Caeza el límite de detección 0,9 U/L hasta el límite de linealidad 200 U/L.

Si la concentración de la muestra es superior al límite de linealidad, diluir 1/10 con Clita 9 g/L y multiplicar el resultado final por 10.

Precisión:

	Intraensayo (n=20)	Interensayo (n=20)
Media (U/L)	55,2	128
SD	1,00	1,47
CV (%)	1,83	1,14

Sensibilidad analítica: 1 U/L = 0,00052 ΔA / min.

Especificidad: Los reactivos SPINREACT (y) no muestran diferencias sistemáticas significativas cuando se comparan con otros reactivos comerciales (x).

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

INTERFERENCIAS

Los anticoagulantes de uso corriente como la heparina, EDTA oxalato o fluoruro no afectan los resultados. La hemólisis interfiere con la determinación¹. Se han descrito varias drogas y otras sustancias que interfieren en la determinación de la ALT^{1,2}.

NOTAS

SPINREACT dispone de instrucciones detalladas para la aplicación de este reactivo en distintos analizadores.

BIBLIOGRAFIA

- Murray R. Alanina aminotransferasa. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis, Toronto, Princeton 1984; 1088-1090.
- Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed. AACO Press, 1996.
- Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed. AACO Press, 1996.
- Burtis A, et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd edition. AACO 1999.
- Tietz N. W. et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed. AACO 1995.

PRESENTACION

Ref. 40204	R 1	80 mL
	R 2	7 mL
Ref. 40205	R 1	255 mL
	R 2	25 mL



IMPORTADORES EXCLUSIVOS: LAB. CENTRA DE MÉDICO S.A. DE C.V.
Carretera de las Torres 258, Pte. Boca Nueva, Naucampul, Méx. de México C.P. 52143
TEL.: 01 (52) 52534771-7143 FAX: 01 (52) 52534772 SPIN (T749)
www.spinreact.com.mx e-mail: spin@spinreact.com.mx



GOT (AST)

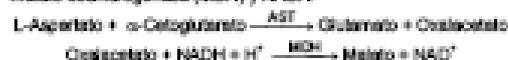
NADH. Cinético UV. IFCC rec. Líquido

Determinación cuantitativa de aspartato aminotransferasa GOT (AST) IVD

Conservar a 2-8°C

PRINCIPIO DEL MÉTODO

La aspartato aminotransferasa (AST) inicialmente llamada transaminasa glutamato oxalacético (GOT) cataliza la transferencia reversible de un grupo amino del aspartato al α -cetoglutarato con formación de glutamato y oxalacetoato. El oxalacetoato producido es reducido a malato en presencia de malato deshidrogenasa (MDH) y NADH.



La velocidad de disminución de la concentración de NADH en el medio, determinada fotométricamente, es proporcional a la concentración catalítica de AST en la muestra ensayada¹.

SIGNIFICADO CLÍNICO

La AST es una enzima intracelular, se encuentra en niveles altos en el músculo del corazón, las células del hígado, las células del músculo esquelético y en menores cantidades en otros tejidos. Aunque un nivel elevado de AST en suero no es específico de enfermedad hepática se emplea principalmente para su diagnóstico y seguimiento, junto con otras enzimas como la ALT y ALP. También se emplea en el control post-infarto, en pacientes con trastornos del músculo esquelético, y en otras afecciones^{2,3,4}.

El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio.

REACTIVOS

R 1	TRIS pH 7,8 Lactato deshidrogenasa (LDH) Tempón	80 mmol/L 600 U/L 600 U/L
R 2	NADH Substrato α -Cetoglutarato	0,18 mmol/L 12 mmol/L

PREPARACION

Reactivo de fondo (RT)

Mezclar:

9 vol. (R1) Tempón + 1 vol. de (R2) Substrato

Estabilidad: 21 días a 2-8°C o 72 horas a temperatura ambiente.

CONSERVACION Y ESTABILIDAD

Todos los componentes del kit son estables, hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, cuando se mantienen los frascos bien cerrados a 2-8°C, protegidos de la luz y se evita su contaminación. No usar reactivos fuera de la fecha indicada.

Indicaciones de deterioro de los reactivos:

- Presencia de partículas y turbidez.
- Absorbancias del blanco a 340 \pm 1,00.

MATERIAL ADICIONAL

- Espectrofotómetro o analizador para lecturas a 340 nm.
- Baño termocostable a 25°C, 30°C o 37°C (\pm 0,1°C)
- Cubetas de 1,0 cm de paso de luz.
- Equipamiento habitual de laboratorio.

MUESTRAS

Suero o plasma⁵. Estabilidad de la muestra: 7 días a 2-8°C.

PROCEDIMIENTO

- Condiciones del ensayo:
Longitud de onda: 340 nm
Cubeta: 1 cm paso de luz
Temperatura constante: 25°C / 30°C / 37°C
- Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada o aire.
- Pipetear en una cubeta:

RT (mL)	1,0
Muestra (μ L)	100

- Mezclar, incubar 1 minuto.
- Leer la absorbancia (A) inicial de la muestra, poner en marcha el cronómetro y leer la absorbancia cada minuto durante 3 minutos.
- Calcular el promedio del incremento de absorbancia por minuto (Δ A/min).

CALCULOS

Δ A/min \times 1750 = U/L de AST

Unidades: La unidad internacional (UI) es la cantidad de enzima que convierte 1 μ mol de sustrato por minuto, en condiciones estándar. La concentración se expresa en unidades por litro (U/L).

Factores de conversión de temperaturas

Los resultados pueden transformarse a otras temperaturas multiplicando por:

Temperatura de medición	Factor para convertir a		
	25°C	30°C	37°C
25°C	1,00	1,37	2,08
30°C	0,73	1,00	1,54
37°C	0,48	0,65	1,00

CONTROL DE CALIDAD

Es conveniente analizar junto con las muestras suero control valorado:

SPINROL H Normal y Patológico (Ref. 1002100 y 1002210).

Si los valores hallados se encuentran fuera del rango de tolerancia, se debe revisar el instrumento, los reactivos y la blanko.

Cada laboratorio debe disponer su propio Control de Calidad y establecer correcciones en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias.

VALORES DE REFERENCIA⁶

	25°C	30°C	37°C
Hombres	Hasta 19 U/L	38 U/L	38 U/L
Mujeres	Hasta 16 U/L	22 U/L	31 U/L

Estos valores son orientativos. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

CARACTERISTICAS DEL MÉTODO

Rango de medida: Desde el límite de detección 1 U/L hasta el límite de linealidad 200 U/L.

Si la concentración de la muestra es superior al límite de linealidad, diluir 1/10 con Clira 9 μ L y multiplicar el resultado final por 10.

Precisión:

	Intensidad (m 25)		Intensidad (m 30)	
Media (U/L)	17,0	135	17,3	131
SD	0,73	1,25	0,81	2,25
CV (%)	4,27	0,77	4,68	1,73

Sensibilidad analítica: 1 U/L = 0,0048 μ A/min.

Especificidad: Los reactivos SPINREACT (y) no muestran diferencias estadísticas significativas cuando se comparan con otros reactivos comerciales (z).

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

INTERFERENCIAS

Los anticoagulantes de uso corriente como la heparina, EDTA oxalato o suero no afectan los resultados. La hemólisis interfiere con la determinación⁷.

Se han descrito varias drogas y otras sustancias que interfieren en la determinación de la AST^{8,9}.

NOTAS

SPINREACT dispone de instrucciones detalladas para la aplicación de este reactivo en distintos analizadores.

BIBLIOGRAFIA

- Murray R. Aspartato aminotransferasa. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis, Toronto, Princeton, 1984; 1112-118.
- Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACO Press, 1996.
- Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACO 2001.
- Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACO 1999.
- Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed AACO 1995.

PRESENTACION

Ref. 40264	Cont.	R1	80 mL
		R2	7 mL
Ref. 40265		R1	205 mL
		R2	35 mL



IMPORTADORES EXCLUSIVOS: LAB. CENTROS DE MEDICO S.A. DE C.V.
Carretera de las Tumbas 226 Prato, Residencial Hacienda Palo, de Mexico C.P. 02140
TEL.: 01 (55) 2861.521 / 2146.280 / 2146.280 / 2146.280 FAX: 01 (55) 2861.521
www.galaxy.com.mx - info@galaxy.com.mx

ANEXO 7

DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE ALBUMINA BOVINA(BSA) POR EL METODO DE LOWRY

Para determinar la concentración de proteína de la muestra se construye una curva patrón o de calibrado a partir de una solución patrón (BSA) (2mg/ml). La concentración que tienen las muestras se determinan por interpolación de los valores de absorbancia en la curva patrón. El tubo 0 solo tiene agua destilada y los reactivos, sirve de blanco para el ajuste del colorímetro a cero absorbancia.

Pasos a seguir:

- Numerar del cero al 6 tubos de plástico de 10 ml.
- Pipetear las cantidades de agua, solución patrón albúmina y solución señaladas en la tabla.
- Preparar reactivo C, a partir de la solución A(carbonato de sodio 2%, hidróxido de sodio 0.4% y tartrato de sodio y potasio 0.16%) y solución B (sulfato de cobre 4%)
- Pipetear a todos los tubos del reactivo C. Mezclar el contenido de cada tubo y dejarlo reposar por 10min.
- A continuación añadir a todos los tubos el reactivo folin (diluido 1/4) mezclando bien por agitación. Dejar reposar 20min.

Tubo	Agua	Patrón (2ml/ml)	Muestra	Reactivo C	Folin diluido
0	1.0ml	-----	-----	5ml	0.5ml
1	0.9ml	0.1ml	-----	5ml	0.5ml
2	0.8ml	0.2ml	-----	5ml	0.5ml
3	0.7ml	0.3ml	-----	5ml	0.5ml
4	0.6ml	0.4ml	-----	5ml	0.5ml
5	0.7ml	-----	0.3ml	5ml	0.5ml
6	0.5ml	-----	0.5ml	5ml	0.5ml

- Leer las absorbancia en el colorímetro a 850 mn. Previamente el aparato se ajusta a absorbancia = 0 con el blanco.