



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN

**“Evaluación de la Suplementación de un
Microencapsulado de Jugo de Granada
Roja sobre la Actividad Antioxidante y el
Nivel de Peroxidación Lipídica en
Pacientes VIH+”.**

T E S I S

Que para obtener el título de:

Licenciado en Nutrición

P R E S E N T A N

Maria Fernanda Resendiz Otero

Rodrigo Ronces Arrieta

Bajo la Dirección de:
Dr. Gabriel Betanzos Cabrera



Pachuca, Hgo., 30 de mayo del 2017.



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN**



De acuerdo con el artículo 134 del Reglamento de Control Escolar vigente, el jurado de examen recepcional designado, autoriza para su impresión la Tesis titulada

"Evaluación de la Suplementación de un Microencapsulado de Jugo de Granada Roja sobre la Actividad Antioxidante y el Nivel de Peroxidación Lipídica en Pacientes VIH+".

Que para obtener el Título de Licenciado de Nutrición sustentan los Pasantes

**C. Maria Fernanda Resendiz Otero.
C. Rodrigo Ronces Arrieta.**

**ATENTAMENTE
Pachuca, Hidalgo, 30 de mayo del 2017
"Amor, Orden y Progreso"**

PRESIDENTE: DR. JOSÉ ARIZA ORTEGA
SECRETARIO: M.T.E. MARÍA ELENA MARTÍNEZ ROMAN
PRIMER VOCAL: DRA. GUADALUPE LÓPEZ RODRÍGUEZ
SEGUNDO VOCAL: M. EN C. TEODORO SUÁREZ DIEGÉZ
TERCER VOCAL: DR. GABRIEL BETANZOS CABRERA
PRIMER SUPLENTE: DRA. JANNETT ALEJANDRA IZQUIERDO VEGA
SEGUNDO SUPLENTE: L.N. NACY NEFTALY ESTRADA DONÍZ

Índice

Índice.....	I
Índice de figuras.....	III
Índice de tablas.....	IV
Abreviaturas.....	V
1 Resumen.....	1
2 Abstrac.....	2
3 Marco teórico.....	3
3.1 VIH/SIDA.....	3
3.2 Sistema antioxidante, estrés oxidativo, peroxidación lipídica y antioxidantes.....	10
3.3 Estrés Oxidativo originado por la infección de VIH y el TARGA.....	17
3.4 Granada (<i>Punica granatum</i> L.).....	20
3.5 Microencapsulado.....	23
4 Problema de investigación.....	24
5 Justificación.....	25
6 Objetivos.....	26
6.1 Objetivo general.....	26
6.2 Objetivos específicos.....	26
7 Hipótesis.....	26
8 Variables del estudio.....	27
9 Diseño metodológico.....	28
9.1 Aprobación del protocolo.....	28
9.2 Tipo de estudio.....	28
9.3 Esquema metodológico.....	29
9.4 Criterios de selección de la población de estudio.....	30
9.5 Granada.....	32
9.6 Ácido ascórbico (Vitamina C).....	32
9.7 Selección y asignación de tratamiento.....	32
9.8 Extracción de sangre.....	33
9.9 Metodología.....	35

9.10 Análisis estadístico	36
9.11 Aspectos éticos	36
10 Resultados	39
10.1 Características de los sujetos de estudio	39
10.2 Actividad antioxidante en suero.....	40
10.3 Detección de productos finales de la peroxidación lipídica de membrana plasmática por ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)	44
11 Discusión.....	53
11.1 Resultados basales	53
11.2 Resultados al final de la suplementación	55
12 Conclusiones.....	58
13 Referencias	59
14 Anexos	71
14.1 Cartas de aprobación de los comités de SS.....	71
14.2 Carta de autorización del CAPASITS	73
14.3 Consentimiento informado.....	74
14.4 Certificado de calidad del microencapsulado de granada roja	79
14.5 Solicitud de registro de patente	80
14.6 Profilaxis Post-Exposición	81
14.7 Carta de confidencialidad	82
14.8 Carta de declaración de no conflicto de interés.....	85

Índice de figuras

Figura 1. Ciclo vital del VIH	5
Figura 2 El sistema de defensa antioxidante integrado por antioxidantes endógenos como derivados de la dieta.....	11
Figura 3 Principales especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS) con importancia biología	12
Figura 4 Estructura química del ácido ascórbico	14
Figura 5 <i>Punica granatum L.</i>	20
Figura 6 Actividad antioxidante (ABTS ⁺) medida cada 30 días: Todos los subgrup	41
Figura 7 Actividad antioxidante (DPPH [*]) medida cada 30 días: Todos los subgrupo	43
Figura 8 Peroxidación lipídica (TBARS) medida cada 30 días: Todos los subgrupo	45
Figura 9 Correlación entre actividad antioxidante (ABTS ⁺) y peroxidación lipídica (TBARS) en el grupo VIH+	47
Figura 10 Correlación entre actividad antioxidante (ABTS ⁺) y peroxidación lipídica (TBARS) en el grupo VIH-	49
Figura 11 Correlación entre actividad antioxidante (DPPH [*]) y peroxidación lipídica (TBARS) en el grupo VIH+	50
Figura 12 Correlación entre actividad antioxidante (DPPH [*]) y peroxidación lipídica (TBARS) en el grupo VIH-	52

Índice de tablas

Tabla 1. Sistema de clasificación del VIH del CDC.....	7
Tabla 2. Sintomatología clásica por categoría clínica	8
Tabla 3 Fuentes de Ácido Ascórbico	15
Tabla 4 Clasificación general de los compuestos polifenólicos.....	16
Tabla 5 Fuentes de polifenoles.....	17
Tabla 6 Composición media de la granada por 100 g de porción comestible	21
Tabla 7 Descripción de variables del estudio.....	27
Tabla 8 Esquema metodológico.....	29
Tabla 9 Características generales de los sujetos.....	39
Tabla 10. Recomendación de Profilaxis Post-Exposición (PPE) al VIH de acuerdo con el tipo de lesión y el estado de infección de la fuente de exposición	81

Abreviaturas

AA	Ácido ascórbico
CAPASITS	Centro Ambulatorio para la Prevención y Atención en SIDA e Infecciones de Transmisión Sexual
CENSIDA	Centro Nacional para la prevención y el Control del VIH/SIDA
IF	Inhibidores de la fusión
II	Inhibidores de la integrasa
INNTI o INTI	Inhibidores de la transcriptasa inversa
IP	Inhibidores de proteasas
MGJR	Microencapsulado de jugo de granada roja
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
TARGA	Tratamiento antirretroviral de gran actividad
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana

1 Resumen

La infección por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) continúa siendo una pandemia, en México alrededor de 123 mil personas están infectadas por este virus, de los cuales 1.2% viven en el estado de Hidalgo. Un problema metabólico común en estos pacientes es el Estrés Oxidativo (EO), el cual se ha relacionado con la progresión de la enfermedad y la aparición de comorbilidades. La granada, es un fruto rico en antioxidantes, los cuales pueden inhibir o reducir el EO, no obstante, nunca se ha probado su efecto en personas VIH+. Por lo cual, en el presente estudio, evaluó el efecto de la suplementación de un Microencapsulado de Jugo de Granada Roja (MJGR) y el Ácido Ascórbico (AA) sobre actividad antioxidante (AAO) y peroxidación lipídica de sujetos VIH+. Para lo cual se reclutaron 60 sujetos, 30 VIH+ y 30 VIH-, de cada grupo se formaron 3 subgrupos (n=10): 1) Suplementado con MJGR (1g/d), 2) Suplementado con AA (1g/d) y 3) Control. La intervención duró 90 días y se realizaron tomas de muestras sanguíneas al inicio y cada 30 días. Se midió la AAO en suero sanguíneo por los métodos DPPH[•] y ABTS⁺ y la peroxidación lipídica por el método TBARS. Los resultados basales muestran reducción significativa de la AAO del grupo VIH+ que obtuvo 1151.08µgTEAC/mL en comparación de 1743.57µgTEAC/mL del grupo VIH- por el método de ABTS⁺, sin cambios significativos en los niveles de malondialdehído (MDA). Se ha planteado que la reducción de la AAO es consecuencia de la infección y tras la instauración de antirretrovirales se da una compensación de la capacidad antioxidante, que reduce significativamente el estrés oxidativo. Tras la intervención el AA, aumentó 142 puntos porcentuales (p.p.) la AAO medida por ABTS⁺ y 152 p.p. por DPPH[•], mientras que el MJGR 84 p.p. y 37 p.p. respectivamente en los subgrupos VIH+. Sin embargo, el MJGR redujo 61 p.p. el nivel de peroxidación lipídica en comparación de 10 p.p. por AA en sujetos VIH+, lo que tiene mayor impacto en las personas con VIH ya que se ha asociado la reducción de marcadores de EO a retraso de la evolución de la enfermedad y disminución del riesgo de muerte.

Palabras clave: Infección por virus de la inmunodeficiencia humana, Actividad antioxidante, Peroxidación lipídica, Microencapsulado de jugo de granada roja, Ácido ascórbico.

2 Abstrac

Human Immunodeficiency Virus (HIV) infection continues to be a pandemic, in Mexico around 123 thousands persons are infected by this virus, which represents the 1.2% of Hidalguense population. A common metabolic problem for these patients is the Oxidative Stress (OS), which has been related with the progression of the disease and the presence of comorbidities. Pomegranate is a fruit rich in antioxidants, which potentially can inhibit or reduce OS, however; it has never been tested in patients with VIH+ infection. Thus, the present project, evaluated the supplementation of a Microencapsulated Red Pomegranate Juice (MJGR) and Ascorbic Acid (AA) on antioxidant activity (AOA) and lipid peroxidation of HIV+ patients. Sixty subject were recruited, 30 HIV+ and 30 HIV-, there were 3 subgroups were formed from each group (n=10) as follows: 1) were supplemented with MJGR; (1g/d); 2) Supplemented with AA (1g/d); and 3) Control group. The intervention lasted 90 days and blood samples were taken at the beginning and every 30 days. AOA in blood serum was measured by the DPPH[•] and ABTS^{•+} methods; while lipid peroxidation by the TBARS method. The baseline results showed a significant decrease of AOA in HIV+ groups, which obtained 1151.08µgTEAC / mL compared to 1743.57µgTEAC / mL of the HIV- groups by ABTS^{•+} method, although Malondialdehyde (MDA) levels showed no significant difference. It has been suggested that the reduction of AOA is a consequence of infection and after antiretroviral treatment, there is a compensation of antioxidant capacity, which significantly reduces oxidative stress. After the intervention the AA, increased by 142 percentage points (p.p.) the AOA measured by ABTS^{•+} and 152 p.p. by DPPH[•], while the MJGR 84 p.p. and 37 p.p. respectively in the HIV+ subgroups. However, the MJGR reduced 61 p.p. the level of lipid peroxidation compared to 10 p.p. by AA in HIV+ subjects, which has the greatest impact on people with HIV since it has been associated with the reduction of EO markers to delay the evolution of the disease and decrease the risk of death.

Key words: Human Immunodeficiency Virus, Antioxidant activity, Lipid Peroxidation, Microencapsulated of red pomegranate juice, Ascorbic Acid

3 Marco teórico

3.1 VIH/SIDA

3.1.1 Definición

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) es un lentivirus compuesto de dos copias de ARN monocatenario (Isada *et al.*, 2001). Este virus infecta las células del sistema inmune, alterando o anulando su función, la infección produce un deterioro progresivo con la consiguiente inmunodeficiencia, lo que quiere decir que se pierde la función de defensa contra las infecciones y enfermedades (Organización Mundial de la Salud, 2016).

Así, el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), es definido como una depleción severa de los linfocitos T vinculada por la infección por VIH, que se asocia con un amplio espectro de infecciones oportunistas y neoplasmas que difieren a los que se producen en la población general por su alta agresividad, ubicación inusual, tendencia temprana a la generación, recaídas a corto plazo y corta supervivencia (Duesberg, 1989; Organización Mundial de la Salud, 2015a).

3.1.2 Epidemiología

La infección por VIH es un problema de salud pública mundial, que ha cobrado más de 34 millones de vidas hasta ahora (Organización Mundial de la Salud, 2015b). Según la ONUSIDA en 2015 vivían 39.8 millones de personas VIH+ y se diagnosticaron 2 millones de nuevas infecciones (Organización Mundial de la Salud, 2015c; UNAIDS, 2016).

En México la prevalencia de VIH/SIDA es 0.2% (Banco Mundial, 2015), en Hidalgo para 2015 existían 2115 casos notificados, 1.2% del total nacional (CENSIDA, 2015a).

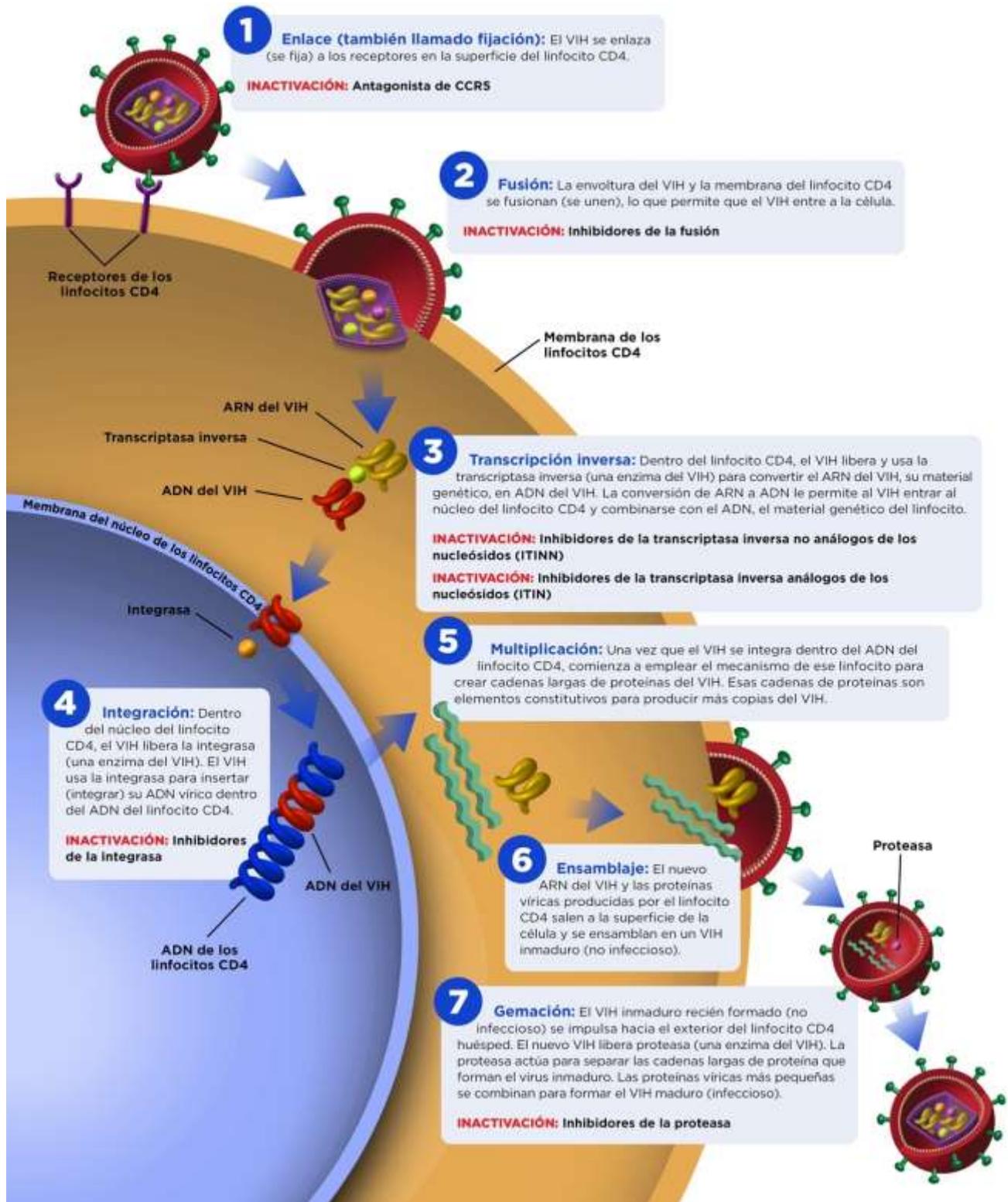
3.1.3 Tipos, grupos y subtipos

El VIH pertenece a la familia retroviridae y se clasifica en 2 tipos: el VIH-1 y el VIH-2. El VIH-1 es el causante de la pandemia mundial, las cepas de este tipo se han clasificado en 3 grandes grupos: el grupo M (mean), el grupo O (outlier) y el grupo N (no M, no O). El grupo M o principal causa 90% de las infecciones, este contiene al menos a ocho subtipos puros denominados con letras: A, B, C, D, F, G, H, J y

VIH-2 se encuentra confinado principalmente en África Occidental. (Soto, 2004; Rivas *et al.*, 2006).

3.1.4 Fisiopatología

La vía de infección más frecuente es el contacto sexual 95.15% aproximadamente en México (CENSIDA, 2015b), las secreciones genitales que contienen el virus, tanto en su forma libre como asociado con leucocitos infectados tienen contacto con la mucosas receptoras donde se encuentran las células blanco primario de la infección: los linfocitos T CD4+, los macrófagos y las células dendríticas (Faiinboim y Geffner, 2012). Posteriormente viaja en sangre alcanzado los nódulos linfáticos donde inicia la infección aguda o también conocida como síndrome retroviral agudo (White y Fenner, 1994). El inicio la infección (**Figura 1**) es la unión a la célula blanco al receptor CD4 y los correceptores CCR5 y CXCR4 (Soto, 2004), posteriormente se produce la fusión de la envoltura externa del virus a la membrana celular a través de las proteínas gp-41 y la gp-120, el virus pierde su envoltura y libera su ARN y proteínas víricas incluyendo la transcriptasa reversa, la cual copia el material genético viral y lo convierte en una cadena simple de ADN, completándola para crear ADN de doble cadena que se incorporara al material genético de la célula huésped por medio de una integrasa (integración) denominándolo provirus, el cual dirige la creación de nuevas partículas virales, dichas proteínas se sintetizan como poliproteínas y se dividen para formar proteínas funcionales mediante la proteasa. Tras la asociación de dos copias del genoma a moléculas de ARNt celular se estimula el brote del virión, finalmente tras la envoltura se desprende el nuevo virus de la célula infectada (Leyva y Gaitán, 2008; Regueiro, 2010; Mercado y Castro, 2014).



Fuente: InfoSIDA 2017

Figura 1. Ciclo vital del VIH Las siete etapas del ciclo de vida del VIH son: 1) enlace, 2) fusión 3) transcripción inversa, 4) integración, 5) multiplicación, 6) ensamblaje y 7) gemación

3.1.5 Estadios de la enfermedad

La enfermedad transcurre a través de distintas etapas: primoinfección, seroconversión, fase asintomática y SIDA (Faiinboim y Geffner, 2012).

3.1.5.1 Primoinfección

La primoinfección es la etapa inmediata a la entrada del virus al organismo y antes del desarrollo de anticuerpos, existen altos niveles de copias del virus, es sintomática en un 70% de los casos (Mercado y Castro, 2014), los síntomas comunes son la fiebre, letargia, cefalea, diarrea crónica y adenomegalia generalizada (McKee, 2009), lamentablemente estos síntomas son muy inespecíficos. La única forma de diagnosticarla es por la detección del antígeno p24 o RNA viral (Mercado y Castro, 2014).

3.1.5.2 Seroconversión

La seroconversión o ventana inmunológica es el lapso desde 4 semanas hasta 6 meses (Méndez, 2002), en el que el paciente portador del VIH produce anticuerpos contra el virus (InfoSIDA, 2016), a partir de esta etapa se puede confirmar la infección mediante pruebas de detección de anticuerpos contra VIH.

Esta etapa se asocia con una intensa replicación viral y niveles elevados de viremia, que conlleva una extensa diseminación del virus, a este aumento le sigue una rápida disminución de la replicación viral (Faiinboim y Geffner, 2012).

3.1.5.3 Fase asintomática

A esta fase también se le conoce como latencia clínica, donde existe una producción vírica sostenida, además de un decremento consistente de linfocitos CD4 y de todo el sistema inmunológico integral (Yábar, 2003).

La duración puede ir desde menos de tres años hasta más de diez, el ritmo de progresión varía de individuo a individuo, los factores que afectan este proceso son múltiples dividiéndose en factores del huésped y factores virológicos. Los primeros son los propios del organismo como la edad, el género, la genética, forma de transmisión y factores inmunológicos. Los factores virológicos son la cantidad de copias del virus, las mutaciones de resistencia al tratamiento, el tropismo de

receptores de quimioquinas (CCR5 Y CXCR4) y la relación del subtipo viral con la raza (Langford *et al.*, 2007).

3.1.5.4 SIDA

Se caracteriza por la aparición de infecciones oportunistas, ciertas neoplasias, además del síndrome de caquexia progresiva y alteraciones neurológicas que llevan al fallecimiento del paciente (Organización Mundial de la Salud, 2015b).

3.1.6 Sistemas clasificación de la infección por VIH

El Centro de Control de Enfermedades de Estados Unidos de América establece nueve grupos según los cuadros clínicos en categorías A, B y C y el recuento de linfocitos T CD4 en tres niveles (**Tabla 1 y 2**).

Tabla 1. Sistema de clasificación del VIH del CDC

Niveles de células CD4 ¹	Categoría clínica		
	A	B	C
≥ 500/mm ³	A1	B1	C1
200-499/mm ³	A2	B2	C2
< 200/mm ³	A3	B3	C3

Los cuadros sombreados deben notificarse como casos de SIDA. ¹Existe variación circadiana en los recuentos de CD4 con valores promedio de 60/mm³ más altos por la tarde en individuos VIH+. Para los recuentos consecutivos de CD4, la sangre debe extraerse aproximadamente a la misma hora.

Fuente: Guía Sanford para el tratamiento del VIH/SIDA y de la Hepatitis viral 2014

Tabla 2. Sintomatología clásica por categoría clínica

Categoría clínica	
	Infección asintomática por VIH.
A	Adenomegalia generalizada persistente. Infección aguda (primaria) por el VIH.
	Cuadros sintomáticos atribuibles al VIH distintos de A y C, por ejemplo:
B	Angiomatosis bacilar. Candidiasis vulvovaginal persistente >1mes. Candidiasis orofaríngea. Carcinoma localizado. Signos constitucionales, p. ej.: fiebre o diarrea >1mes. Candidiasis esofágica, traqueal o bronqueal. Síndrome de emaciación por VIH. Cáncer de cuello uterino, invasor. Criptosporidiosis intestinal crónica. Infección por CMV, en lugares distintos del hígado, bazo o ganglios linfáticos. VHS con úlcera mucocutánea >1mes, bronquitis, neumonía.
C	Histoplasmosis generalizada, extrapulmonar. Isosporiasis crónica >1mes. Sarcoma de Kaposi Linfoma: de Burkitt, inmunoblástico, cerebral primario. M. avium o M. kansasii extrapulmonar. Neumonía recurrente (>2 episodios/año). Leucoencefalopatía multifocal progresiva. Bacteremia por Salmonella recurrente Toxoplasmosis cerebral.

Fuente: Guía Sanford para el tratamiento del VIH/sida y de la Hepatitis viral 2014.

3.1.7 Tratamiento

El tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA) consiste en la combinación de agentes que bloquean el ciclo vital del virus (Inhibidores de la proteasa (IP), Inhibidores de la transcriptasa inversa (INNTI e INTI), Inhibidores de la integrasa e Inhibidores de la fusión (Bazzoli *et al.*, 2010), lo que produce una mayor supresión viral, limita la aparición de resistencia a los medicamentos y es más eficaz incluso con cepas más resistentes. El objetivo del tratamiento es disminuir la replicación viral (conteo viral <50 copias /mL), restaurar y preservar el sistema inmunológico, reducir la morbilidad y la mortalidad relacionada con el VIH, disminución de la transmisión del VIH y aumentar la cantidad y la calidad de vida (Thaker y Snow, 2003; Burgoyne y Tan, 2008; Ailawadi y Pandhi, 2014).

3.1.8 Problemas metabólicos relacionados con la infección por VIH y el TARGA

Muchos de los problemas metabólicos y nutricionales que ocurrieron entre las personas infectadas por VIH en la era previa a la TARGA persisten en la actualidad. El síndrome de desgaste es aún una condición que define al SIDA, esta pérdida de la masa magra del cuerpo, en particular, continúa asociado con una disminución de la calidad de vida (Mangili *et al.*, 2006).

Además de esto los problemas gastrointestinales todavía plagan las personas que están infectadas, principalmente la diarrea y la malabsorción. También es común la enfermedad hepática progresiva y cirrosis, que están asociados con la pérdida de grasa y masa magra corporal independiente de la infección por el VIH.

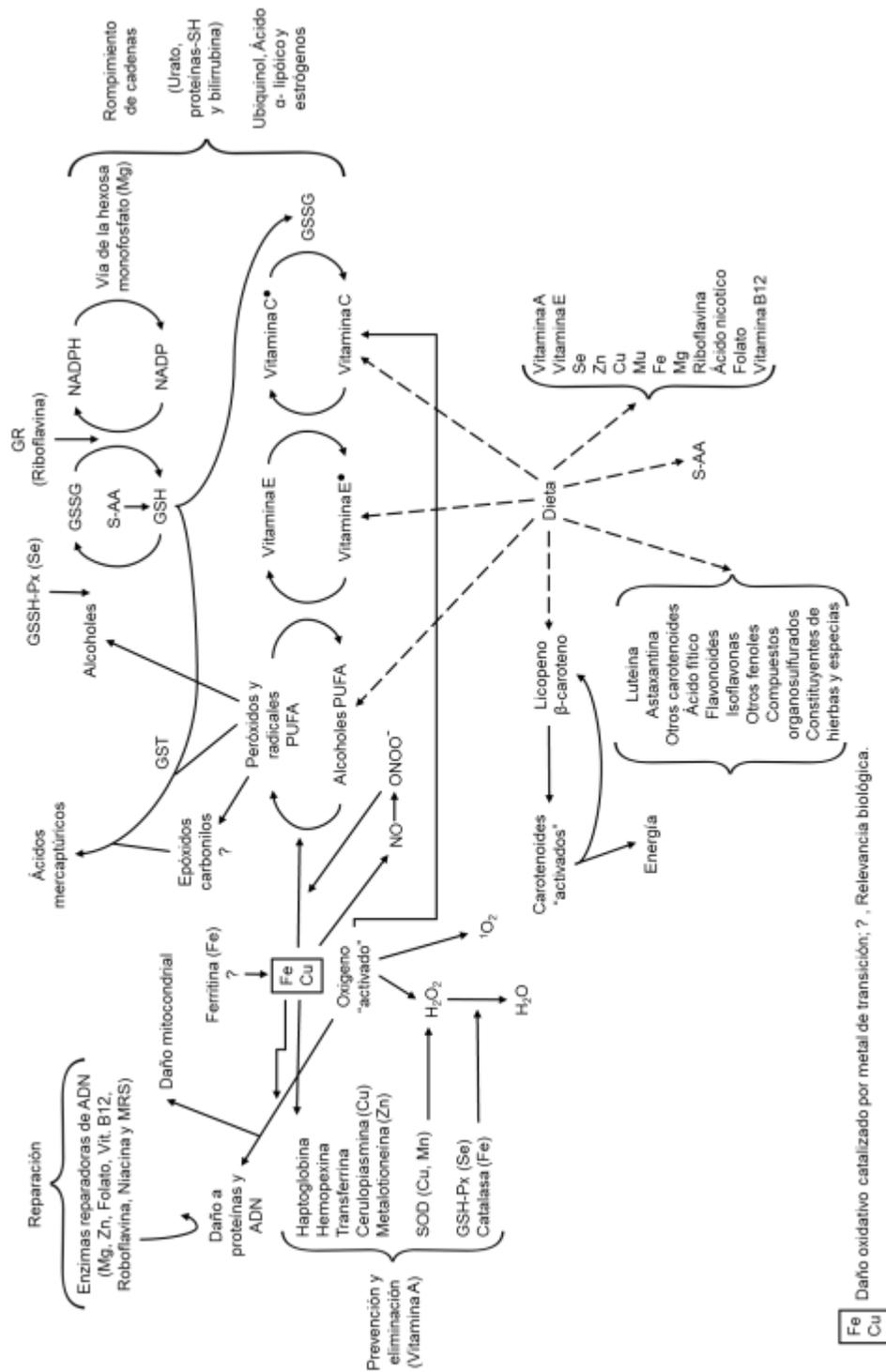
A pesar de los problemas metabólicos asociados al VIH, con el TARGA la infección por VIH se ha convertido en una enfermedad crónica, se ha logrado una considerable reducción de la morbilidad y la mortalidad, como consecuencia otros problemas clínicos están adquiriendo una relevancia creciente en los pacientes VIH+. Estos trastornos son generalmente provocados por los fármacos (aunque la infección en si también contribuye), algunos de los cuales son: las dislipidemias, la lipodistrofia, la intolerancia a la glucosa o el síndrome de la elevación del ácido láctico y el estrés oxidativo (Shevitz y Knox, 2011; Husain y Ahmed, 2015). Todo esto como resultado del tratamiento que no restaura completamente la salud

inmunológica, provocando estas complicaciones asociadas a la inflamación y/o inmunodeficiencia, lo que ha aumentado el desarrollo de otras enfermedades crónicas tales como la enfermedad cardiovascular, diabetes, hipertensión, enfermedad renal, enfermedad hepática, la osteopenia, osteoporosis, enfermedades neurocognitivas y el cáncer en estos pacientes (Roca, 2003; Deeks *et al.*, 2013).

3.2 Sistema antioxidante, estrés oxidativo, peroxidación lipídica y antioxidantes

3.2.1 Sistema antioxidante

Las reacciones de oxidación son esenciales en los procesos metabólicos. Donde la transferencia de electrones produce radicales libres. Por lo cual existen mecanismos de defensa que neutralizan a los radicales libres. A esta defensa se le denomina sistema antioxidante, el cual está conformado por antioxidantes que al unirse con los radicales libres los transforman en radicales libres débiles no tóxicos (**Figura 2**) (Benzie y Strain, 2005; Mayor, 2010).



Fuente: Encyclopedia of Human Nutrition 2005

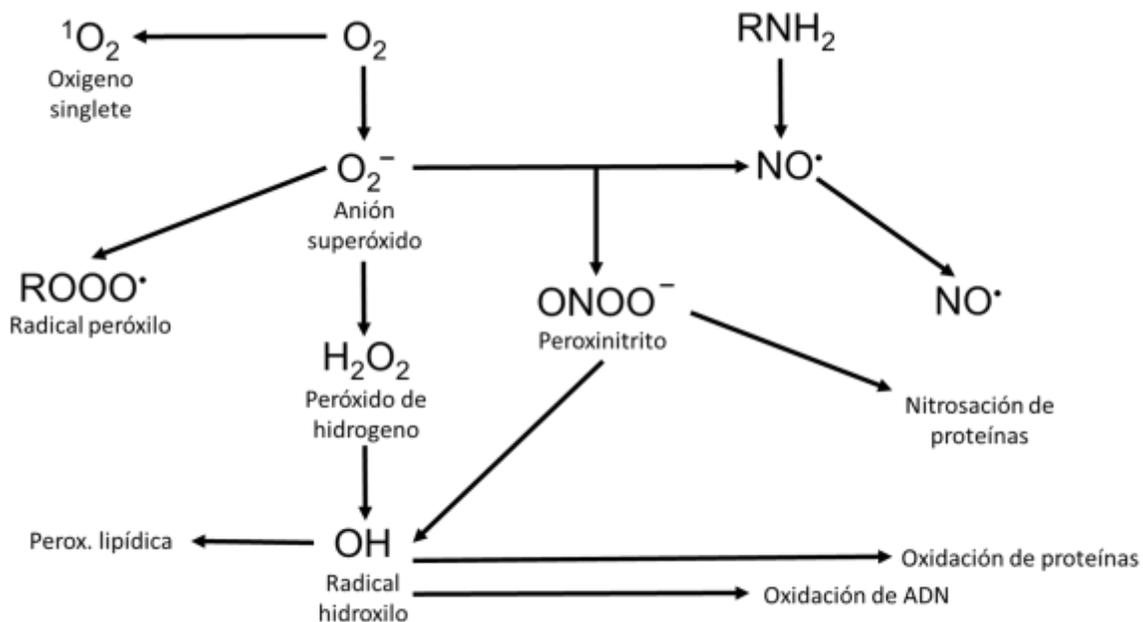
Figura 2 El sistema de defensa antioxidante integrado por antioxidantes endógenos como derivados de la dieta

3.2.2 Los radicales libres y las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno

Un radical libre se define como aquella especie química que posee uno o más electrones desapareados. Esta propiedad les confiere una alta capacidad de reacción, e inestabilidad. Por lo que ellos pueden donar o aceptar un electrón de otras moléculas, por lo tanto se comportan como oxidantes o reductores.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS) se derivan de procesos metabólicos esenciales como la cadena respiratoria o de fuentes externas tales como la exposición al ozono, el consumo de cigarrillos, contaminantes del aire y productos químicos industriales (De la Fuente, 2011).

Las principales especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (**Figura 3**) son capaces de generar un daño en el núcleo y en las membranas de las células generando un daño relevante en ADN, estos daños conducen a daños celulares generando un desbalance (Lobo *et al.*, 2010; De la Fuente, 2011).



Fuente: Inmunonutrición en la salud y la enfermedad

Figura 3 Principales especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS) con importancia biológica

3.2.3 El estrés oxidativo

El estrés oxidativo se produce cuando la generación de radicales libres y activos intermedios supera la capacidad del sistema para neutralizarla o eliminarlas. En el concepto actual también se incluyen las vías relacionadas con el estrés nitrosante por su implicación en las reacciones celulares y extracelulares. Las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno se producen constantemente ya que son indispensables para el organismo vivo. Estas sustancias reaccionan con biomoléculas (ADN, proteínas, carbohidratos y lípidos) por lo que la alteración en la homeostasis conduce a una posible muerte celular (Rahman *et al.*, 2012).

3.2.4 Peroxidación lipídica

El estrés oxidativo tiene como consecuencia la modificación de las biomoléculas que están involucrados en los procesos fisiológicos y fisiopatológicos, como el envejecimiento, la inflamación, la carcinogénesis y la toxicidad de un fármaco. Un grupo de estas biomoléculas afectadas son los lípidos de las membranas celulares, a las cuales el exceso de radicales libres generan lesiones bioquímicas. La peroxidación lipídica se produce en los ácidos grasos poliinsaturados que se encuentran en las membranas. Se sabe que el radical hidroxilo es el iniciador del daño, promoviendo la adición de oxígenos formando el radical peroxilo, que es altamente reactivo a los ácidos grasos formando un nuevo radical el hidroperóxido. Como consecuencia se forman compuestos como alcanos y malonaldehído, que son utilizados como marcadores de peroxidación lipídica (Lobo *et al.*, 2010).

3.2.5 Los antioxidantes

La definición de antioxidantes, dada en 1995 por Halliwell y Gutteridge, los define como "cualquier sustancia que, cuando está presente en bajas concentraciones en comparación con la de un sustrato oxidable, demora o inhibe significativamente la oxidación de ese sustrato" (Shebis *et al.*, 2013).

3.2.5.1 Los antioxidantes endógenos

La protección de las células frente al daño oxidativo es proporcionada por algunas enzimas. El superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y la catalasa son los antioxidantes enzimáticos clave de este sistema de defensa mediante el cual se

eliminan los radicales libres que se producen durante las reacciones metabólicas (Jeeva *et al.*, 2015).

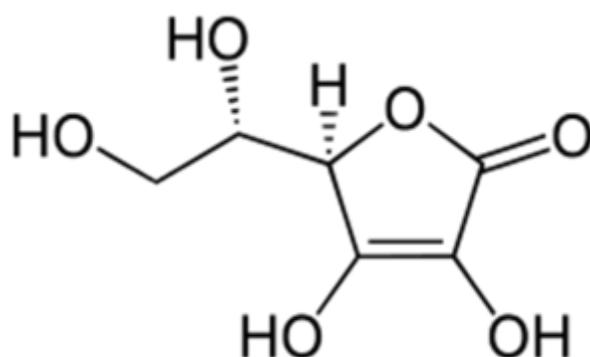
3.2.5.2 Los antioxidantes exógenos

Al igual que los antioxidantes endógenos, los exógenos son capaces de combatir las especies reactivas de oxígeno. Estos antioxidantes proviene de la dieta siendo los más importes el ácido ascórbico, vitamina E y el beta caroteno (Percival, 1996; De la Fuente, 2011).

A continuación se mencionan algunas sustancias de bajo peso molecular de origen exógeno con cualidades antioxidantes de interés para la investigación.

3.2.5.2.1 El ácido ascórbico

El ácido ascórbico o vitamina C (**Figura 4**) es un derivado de un monosacárido y es un antioxidante hidrosoluble de bajo peso molecular. El ácido ascórbico es un micronutriente esencial, ya que no se puede sintetizar, por lo que se debe obtener a través de la dieta. Se presenta en forma de ascorbato en todos los compartimientos celulares acuosos (citosol, plasma, liquido extracelular) considerándose un agente reductor ya que puede reducir o neutralizar las especies reactivas de oxígeno como el peróxido de hidrógeno antes de que inicie la peroxidación lipídica (Lobo *et al.*, 2010; De la Fuente, 2011).



Fuente: Dep. Física-Química, UNAM

Figura 4 Estructura química del ácido ascórbico

3.2.5.2.1.1 Fuentes de ácido ascórbico

Los alimentos ricos en ácido ascórbico (**Tabla 3**)

Tabla 3 Fuentes de Ácido Ascórbico

Alimento	Ácido Ascórbico
	mg/100 g
Pimientos	1900
Acerolas	1677.60
Guayabas	228.30
Grosellas	181
Kiwi	161.30
Durazno	94.20
Brócoli	93.20
Naranja	53.20
Limón	53
Granada	10.2

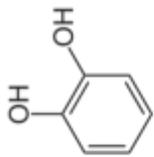
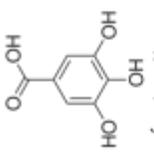
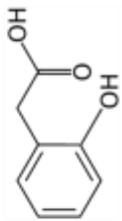
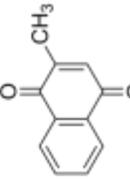
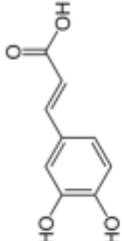
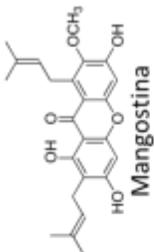
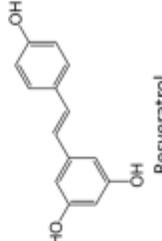
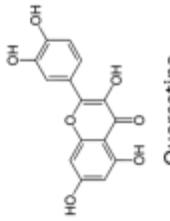
Fuente: USDA

3.2.5.2.2 Polifenoles

Los polifenoles son compuestos formados por uno o más anillos fenólicos unidos a uno o más grupos hidroxilo. Se conocen alrededor de 8000 polifenoles, los cuales se clasifican en 8 clases (**Tabla 4**). Se sabe que los polifenoles actúan como agentes antioxidantes, modulando las rutas relacionadas con el estrés oxidativo, y aunque dependiendo de su polaridad, metabolismo y forma pueden actuar de agente antioxidante en la fase acuosa o en medios lipofílicos. Proporcionarles

importancia ya que algunos polifenoles pueden interactuar de manera integrada con antioxidantes adyacentes en diferentes fases ocasionando reacciones en cadena en las actividades de lo mismo (De la Fuente, 2011).

Tabla 4 Clasificación general de los compuestos polifenólicos

Clase	Estructura	Ejemplo	Clase	Estructura	Ejemplo
Fenoles simples	C ₆	 Catecol	Ácidos hidroxibenzoicos	C ₆ -C ₁	 Ácido gálico
Ácidos fenilacéticos	C ₆ -C ₂	 Ácido 2-hidroxi-fenilacético	Naftoquinonas	C ₆ -C ₄	 Menadiona
Ácidos hidroxicinámicos	C ₆ -C ₃	 Ácido caféico	Xantomas	C ₆ -C ₁ -C ₆	 Mangostina
Estibenos	C ₆ -C ₂ -C ₆	 Resveratrol	Flavonoides	C ₆ -C ₃ -C ₆	 Quercetina

Fuente: Nutr. Hosp. vol.28 no.1 Madrid ene./feb. 2013

3.2.5.2.2.1 Fuentes de polifenoles

Los alimentos con alta cantidad de polifenoles. (Tabla 5)

Tabla 5 Fuentes de polifenoles

Alimento	Polifenoles totales
	mg EAG/100 g
Granada	275
Arándano	262
Uva roja	240
Manzana roja	213
Uva verde	192
Kiwi	172
Durazno	170
Tuna	169
Naranja	152
Higo	91

Los datos son en peso fresco de los alimentos
Fuente: Laboratorio de Análisis de Antioxidantes del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA)

3.3 Estrés Oxidativo originado por la infección de VIH y el TARGA

El estrés oxidativo definido como el desequilibrio entre el sistema oxidante y el antioxidante, se ha asociado con la progresión de la infección por el VIH y el TARGA. Se han observado perturbaciones en los sistemas de defensa antioxidante en muchos tejidos de pacientes VIH+ (Sharma, 2014). Se ha demostrado que la infección en si aumenta el estrés oxidativo y el TARGA incrementa la oxidación lipídica y proteica, se cree que la presencia de especies reactivas de oxígeno puede

aumentar la replicación viral mediante la activación de factores de transcripción, que en última instancia conducen a la expresión genética viral (Ngondi *et al.*, 2006). También se ha descubierto que los marcadores de estrés oxidativo son inversamente proporcionales al recuento de células CD4 en pacientes VIH+, que reflejan el aumento de la peroxidación lipídica conllevando a la inmunodeficiencia progresiva (Annam y Suresh, 2012). Este estrés oxidativo ya se ha relacionado con efectos perjudiciales sobre el sistema cardiovascular (Reyskens y Essop, 2014), también con el desarrollo de la diabetes, el cáncer, el envejecimiento, la insuficiencia renal (aguda y crónica), la hipertensión arterial, la cirrosis, entre otros (Elejalde, 2001; Calderón *et al.*, 2013; García *et al.*, 2013).

Como se mencionó es un hecho que en los pacientes VIH+ la producción de especies reactivas de oxígeno es continua, por lo que se ha planteado en varias ocasiones el uso de antioxidantes para inhibir el estrés oxidativo, diversos estudios han probado la eficacia de la suplementación de distintos nutrimentos. Oguntibeju *et al.* (2004) suplementaron vitaminas A, C, E y complejo B a mujeres embarazadas VIH+ y encontraron que las mujeres que tomaron el multivitamínico estaban en estados menos avanzados de la enfermedad por VIH, con mayor cantidad de linfocitos y menor carga viral en comparación con el placebo, por lo que se mejoró el pronóstico de la enfermedad (Oguntibeju *et al.*, 2009). En otro estudio dirigido por Amador-Licona *et al.* (2016) donde se suplementó ácidos grasos Omega 3 y su relación con el estrés oxidativo en pacientes VIH+ encontraron una disminución de peroxidación lipídica además de la disminución de la carga viral (Amador-Licona *et al.*, 2016). Otras investigaciones también han demostrado que la suplementación de antioxidantes como la vitamina A, C y E, reducen tanto el estrés oxidativo como la carga viral (Allard *et al.*, 1998; Kaio *et al.*, 2013; Itinoseki *et al.*, 2014). No solo se han hecho intervenciones con nutrimentos aislados, sino también con alimentos, Figueira M *et al.* (2014) utilizó como suplemento en niños VIH+ un hongo (*Agaricus sylvaticus*) que contiene una gran diversidad de compuestos antioxidantes, el cual redujo el estrés oxidativo (Figueira *et al.*, 2014). Un fruto con un gran contenido de antioxidantes, es el fruto de granada (*Punica granatum L.*) donde la investigación se centró en evaluar las propiedades antimicrobianas de manera tópica para la inhibición de la entrada del VIH-1, se encontró que el jugo de granada inhibió la

unión al receptor CD4, a los correceptores CCR5 Y CXCR4 y por lo tanto inhibiendo la infección primaria del virus de los subtipos de la A a la G y el grupo O, pero no existen estudios en modelos *in vivo* que corroboren esta acción (Neurath *et al.*, 2004).

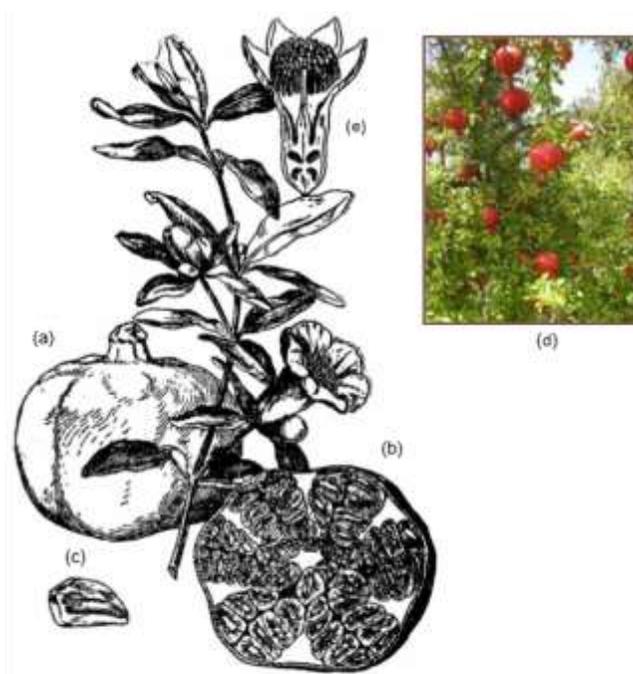
Debido a lo anterior es importante contrarrestar el estrés oxidativo. Como se mencionó las intervenciones con alimentos ricos en antioxidantes han demostrado buenos resultados, por lo cual la granada que contiene una gran cantidad de polifenoles es de interés para esta investigación, a continuación se describirán aspectos generales de este fruto.

3.4 Granada (*Punica granatum* L.)

3.4.1 Características generales

Es la fruta carnosita del granado, árbol de la familia de las *Punicaceae* (**Figura 5**) y su significado etimológico proviene de 2 vocablos, púnica: manzana y grainy: granoso, lo que literalmente se denominaría una manzana granosa. El granado es un arbusto caducifolio que puede alcanzar de 5 a 8 m de altura. Las hojas son opuestas o sub-opuestas, brillantes, oblongas estrechas, enteras, de 3 a 7 cm de longitud y 2 cm de anchura. Las flores son de un color rojo brillante, de 3 cm de diámetro, con cinco pétalos (Jurenka, 2008; MAGRAMA, 2013).

El fruto es una baya de color amarillento con una corteza coriácea, coronado por un cáliz y el interior se encuentra dividido en pequeños lóbulos separados por una membrana llamada pericarpio, estos lóbulos contienen numerosas semillas revestidas con una cubierta, llamada sarcotesta, y rellenas de pulpa roja y jugosa. (MAGRAMA, 2013; Coop, 2011).



Fuente: Encyclopaedia Britannica 1911

Figura 5 *Punica granatum* L. Donde **a.** Fruto, tamaño y forma normal, **b.** Corte longitudinal mostrando semillas, **c.** Arilos, **d.** Granado (árbol) y **e.** Flor.

3.4.2 La granada como alimento funcional

Los alimentos funcionales se pueden definir como “Alimentos, que se consumen como parte de una dieta normal y contienen componentes biológicamente activos, que ofrecen beneficios para la salud y reducen el riesgo de sufrir enfermedades” (Vidal, 2008). De acuerdo a esto, y a diversos estudios realizados en los últimos 20 años sobre la composición química de la granada y más recientemente acerca de sus efectos sobre la salud, podemos considerar a la granada como un alimento funcional ya que se ha demostrado que posee capacidades antihipertensivas, anticancerígenas y anti-inflamatorias, antimicrobianas, entre otros (**Tabla 6**). (Gil *et al.*, 2000; Jurenka, 2008; Basu y Penugonda, 2009; Viuda-Martos *et al.*, 2010; Viuda-Martos *et al.*, 2011; Viladomiu *et al.*, 2013; United States Department of Agriculture, 2017).

Tabla 6 Composición media de la granada por 100 g de porción comestible

	Valor por 100g	Unidad		Valor por 100g	Unidad
Agua	77.93	g	Potasio	236	mg
Energía	83	kcal	Sodio	3	mg
Proteína	1.67	g	Zinc	0.35	mg
Lípidos totales	1.17	g	Vitamina C	10.2	mg
Carbohidratos	18.7	g	Tiamina	0.067	mg
Fibra	4	g	Riboflavina	0.053	mg
Azúcar	13.67	G	Niacina	0.293	mg
Calcio	10	mg	Vitamina B6	0.075	mg
Hierro	0.3	mg	Folato	38	µg
Magnesio	12	mg	Vitamina K	16.4	mg
Fosforo	36	mg	Vitamina E	0.6	µg

Fuete: USDA

3.4.3 Compuestos presentes en la granada

3.4.3.1 Antocianinas

Las antocianinas son consideradas responsables del color rojo de las granadas y de sus semillas, este color depende de la concentración de antocianinas que éstas contengan y del tipo de antociano. En la granada se han identificado 6 antocianinas: delphinidina 3-glucósido y 3,5-diglucósido; cianidina 3-glucósido y 3,5-diglucósido y pelargonidina 3-glucósido y 3,5-diglucósido (Du *et al.*, 1975). La actividad captadora de radicales libres de estos flavonoides ha sido demostrada, lo que hace que un 10% de la actividad antioxidante del zumo de granada se deba a la presencia de estos polifenoles. La actividad antioxidante del zumo de granada es tres veces superior a la del vino tinto y a la del té verde (Espín *et al.*, 2000; Gil *et al.*, 2000).

3.4.3.2 Taninos

Son sustancias de origen vegetal y estructura polifenólica, de sabor astringente, solubles en agua, en alcohol y en acetona; tienen la capacidad de formar complejos y precipitar metales, alcaloides y proteínas (Arango, 2010). Por lo que:

- Son astringentes y antidiarreicos, se unen y precipitan las proteínas presentes en las secreciones.
- Antimicrobianos y antifúngicos.
- Antídotos para el envenenamiento con alcaloides y metales pesados.

La corteza de la granada contiene taninos hidrolizables llamados elagitaninos, que al ser hidrolizados en el cuerpo producen ácido elágico. Es una sustancia que promueve la apoptosis (muerte celular natural) de las células cancerosas sin dañar a las células normales. Se trata de un potente antioxidante y anticarcinógeno que protege a las células frente a los daños provocados por los radicales libres e inhibe las mutaciones del ADN (Universitas Miguel Hernández de Elche, 2010).

La punicalagina es el polifenol de mayor peso molecular conocido, que se hidroliza en ácido elágico y se metaboliza en el tracto intestinal dando urolitinas (compuesto más activo anti-inflamatorio). Las punicalaginas son los compuestos que presentan mayor actividad antioxidante o captadora de radicales libres y son responsables de aproximadamente el 50% de esta actividad en el zumo de granada, seguida de otros

taninos hidrolizables (33% de la actividad total), y en menor medida se encuentra el ácido elágico (3%) (Gil *et al.*, 2000; Universitat Miguel Hernández de Elche, 2010).

Las principales propiedades funcionales las punicalaginas son (Sánchez, 2009):

- Poderoso efecto antioxidante.
- Anticancerígeno
- Protector del sistema cardiovascular

3.5 Microencapsulado

Por todos los beneficios que se mencionan anteriormente se creó el microencapsulado de jugo de granada roja, un producto en el que se logra encapsular y conservar las propiedades de la granada.

La encapsulación se puede definir como una técnica por la cual gotas líquidas, partículas sólidas o gaseosas, son cubiertas con una película polimérica porosa conteniendo una sustancia activa, esta membrana, barrera o película está generalmente hecha de componentes con cadenas para crear una red con propiedades hidrofóbicas y/o hidrofílicas (Parra, 2010).

En la industria alimentaria, las aplicaciones de esta técnica han aumentado, debido a la protección de las sustancias encapsuladas contra factores como calor y humedad, permitiendo mantener su estabilidad y viabilidad. Esta membrana tiene como objetivo liberar los componentes encapsulados de forma gradual y en condiciones controladas (Yáñez *et al.*, 2006; Parra, 2010).

Derivado a lo anterior, la aplicación de la microencapsulación es empleada por varias razones (Beristáin, 2001).

- a) La encapsulación puede proteger al material de la degradación al reducir su reactividad con el ambiente externo (calor, humedad, aire y luz).
- b) Reducción o retardo de su velocidad de evaporación o transferencia del material al ambiente externo.
- c) El producto se puede diseñar para la liberación lenta a lo largo del tiempo o liberarse en un determinado instante (hasta el estímulo correcto).

Por tal motivo el presente trabajo tiene como finalidad abordar el siguiente problema.

4 Problema de investigación

En la actualidad la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana persiste como una pandemia a nivel mundial, alrededor de 37 millones de personas alrededor de todo el mundo viven con esta enfermedad, para el caso de México cerca de 123 mil personas son VIH+. Sin embargo, gracias a la evolución del tratamiento antirretroviral de gran actividad, la infección por VIH se ha convertido en una enfermedad crónica, la esperanza de vida aumenta cada vez más para estos pacientes, pero con la disminución de la mortalidad surge un problema nuevo, los casos se acumulan y las personas seropositivas están envejeciendo y con ello el aumento de pacientes que sufren otros procesos patológicos relacionados con la edad, además de la infección en sí y su tratamiento. Las alteraciones metabólicas como el estrés oxidativo son un claro ejemplo de esto, este desequilibrio es común en pacientes VIH+ bajo TARGA, al igual que la infección, esta alteración se ha vuelto crónica por el uso parmente de fármacos que se han relacionado con un aumento en la oxidación de lipídica y proteica, además de un sistema inmune comprometido en el cual el sistema antioxidante está depletado, por lo cual es de vital importancia continuar buscando e implementando alternativas para contrarrestar el acumulo de radicales libres. Existe información con relación al efecto benéfico de la suplementación de sustancias antioxidantes en pacientes VIH+, donde se ha demostrado la disminución de marcadores de estrés oxidativo, la carga viral y el retardamiento de la progresión a estadios más avanzados de la enfermedad. Por otro lado, no existe información sobre los efectos benéficos del consumo de granada (*Punica granatum* L.) en pacientes VIH+, este fruto posee un alto contenido de sustancias bioactivas y propiedades funcionales, además de que la microencapsulación de su jugo ha permitido su accesibilidad todo el año. Entonces la pregunta de investigación que surge es: **¿Cuál será el efecto de la suplementación con microencapsulado de jugo de granada roja por 90 días sobre marcadores de actividad antioxidante y de peroxidación lipídica en suero en pacientes VIH+, en comparación con la suplementación con ácido ascórbico?**

5 Justificación

Existe una necesidad entre los pacientes que viven con VIH y del sistema de salud por reducir el riesgo de desarrollar comorbilidades asociadas a la infección crónica por VIH y la toxicidad por los antirretrovirales, los cuales se ha comprobado se relacionan a la inflamación y al estrés oxidativo.

El jugo de granada roja ha demostrado diversos efectos terapéuticos entre los que se encuentran; los anti-inflamatorio, la activación del sistema inmune, anti-cancerígenos, además de su alto contenido de sustancias antioxidantes que ayudan a reducir la cantidad de radicales libres; cabe mencionar que su microencapsulación permite la preservación de las sustancias bioactivas y su accesibilidad en cualquier época del año.

La presente investigación pretende comprobar que el consumo de microencapsulado de jugo de granada roja aumenta la actividad antioxidante y reduce la peroxidación lipídica especialmente en paciente VIH+. La inclusión de un grupo control con sujetos VIH- saludables nos permitirá conocer la magnitud de la eficiencia en los valores de la actividad antioxidante y el nivel de peroxidación lipídica debido a que estos no se han establecido y así poder comparar los resultados. Para evaluar el efecto de la suplementación con MJGR, se tuvieron subgrupos suplementados con ácido ascórbico, cuyos efectos en el balance antioxidante-oxidante en las personas que viven con VIH ya se ha reportado (Ngondi *et al.*, 2006; Teto *et al.*, 2013). El Estado de Hidalgo tiene a 1.2% del total de pacientes que viven con VIH en el país, la institución que trata a la mayor parte de este tipo de pacientes no derechohabientes es el CAPASITS, ya que se cuenta con la autorización de este centro, los resultados de la aplicación de esta investigación nos permitirían informar a los profesionales de la salud que trabajan con personas VIH+ y a los mismos pacientes, la posibilidad de la utilización de este producto natural como alternativa terapéutica para el estrés oxidativo en personas que viven con la infección por el VIH, a fin de poder mejorar pronóstico de la enfermedad, aumentar su calidad de vida y posiblemente reduciendo los gastos relacionados a el tratamiento de las comorbilidades.

6 Objetivos

6.1 Objetivo general

Comparar el efecto de la suplementación de microencapsulado de jugo de granada roja vs. ácido ascórbico por 90 días sobre la actividad antioxidante y el nivel de peroxidación lipídica en sujetos VIH- y VIH+ con categorías clínicas A1, A2, B1 y B2 que son tratados con antirretrovirales.

6.2 Objetivos específicos

- 1) Determinar y comparar las diferencias de la actividad antioxidante y el nivel de peroxidación lipídica entre sujetos VIH+ y VIH- antes de la suplementación.
- 2) Determinar y comparar los niveles de actividad antioxidante por los métodos ABTS⁺ y DPPH[•] de los subgrupos que fueron suplementados con MJGR y AA durante 90 días.
- 3) Determinar y comparar los niveles de peroxidación lipídica por el método de TBARS de los sujetos que fueron suplementados con MJGR y AA durante 90 días.

7 Hipótesis

El polvo de microencapsulado de jugo de granada roja mejorará la actividad antioxidante y reducen el nivel de peroxidación lipídica de forma más efectiva que el ácido ascórbico cuando es suplementado por 90 días en sujetos VIH+ tratados con tratamiento antirretroviral.

8 Variables del estudio

Tabla 7 Descripción de variables del estudio

Variable	Tipo de variable	Definición conceptual	Definición operacional	Instrumentos de medición	Unidad de medición
Infección por VIH	Cualitativa	Infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) el cual infecta las células del sistema inmune, alterando o anulando su función, la infección produce un deterioro progresivo con la consiguiente inmunodeficiencia.	Prueba positiva o negativa para la detección del virus de forma directa o indirecta.	ELISA, Western Blot, Inmunofluorescencia o cualquier método que detecte la presencia del virus.	Positivo o negativo
Capacidad antioxidante	Cuantitativa	Capacidad de captar radicales libres y neutralizarlos	Inhibición del radical ABTS ⁺ y DPPH [•]	Ensayo de decoloración con el radical catiónico ABTS ⁺ Ensayo de decoloración del radical 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH [•])	µg TEAC por mL de muestra
Estrés oxidativo	Cuantitativa	Desequilibrio metabólico entre sistema oxidante y antioxidante	Presencia de malonaldehído en suero	Ensayo del ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS)	nmol MDA/mL de muestra

9 Diseño metodológico

9.1 Aprobación del protocolo

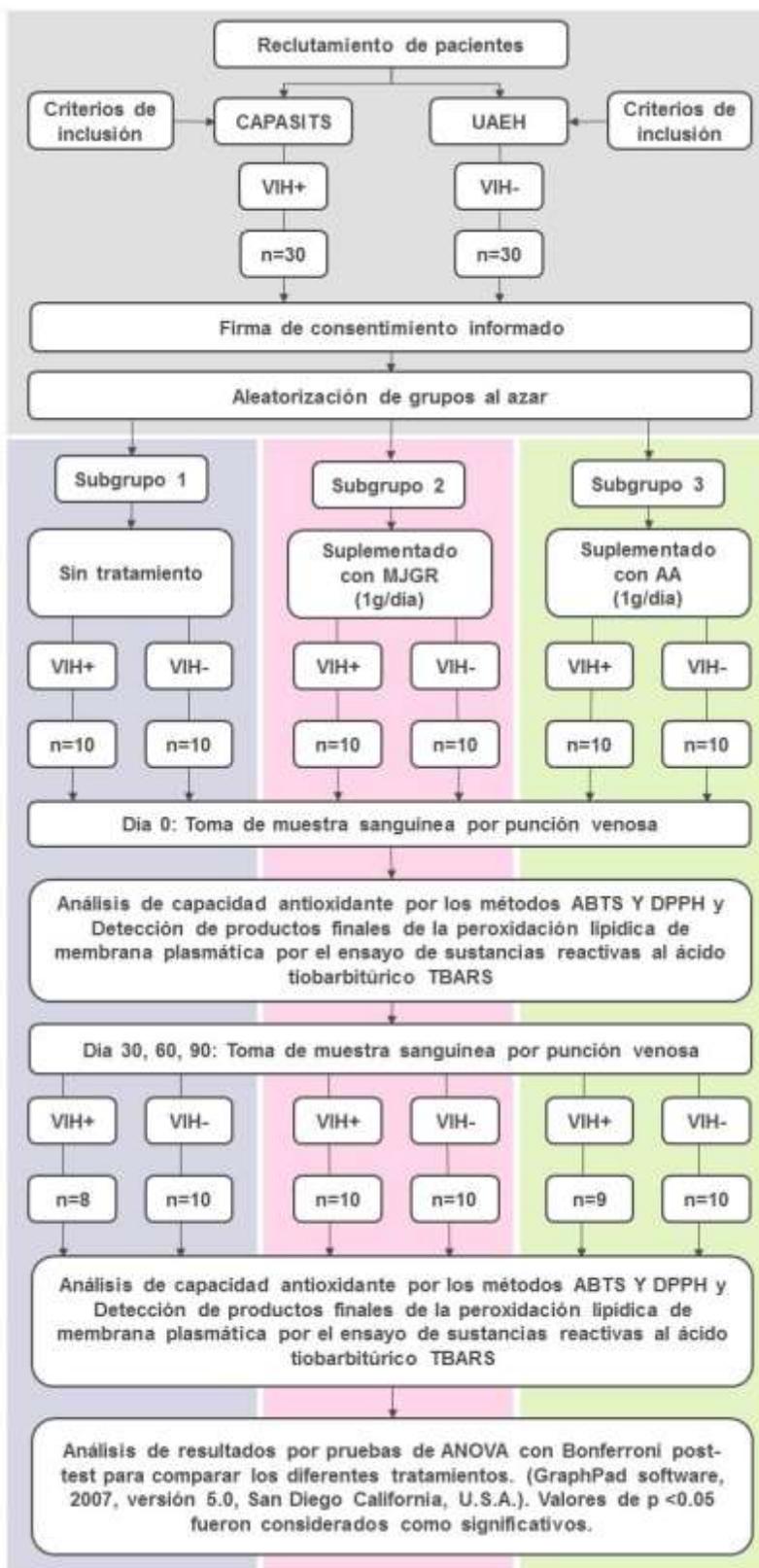
El proyecto fue revisado y aprobado por el Comité de Investigación en Salud y el Comité de Ética en Investigación de los Servicios de Salud del Estado de Hidalgo **(Anexo 13.1)**.

9.2 Tipo de estudio

Ensayo clínico con diseño longitudinal prospectivo, con asignación aleatoria. Con una muestra a conveniencia de acuerdo al número de pacientes que asisten a cita en el CAPASITS.

9.3 Esquema metodológico

Tabla 8 Esquema metodológico



9.4 Criterios de selección de la población de estudio

9.4.1 Sujetos de estudio.

Los sujetos VIH+ fueron invitados en el CAPASITS de Hidalgo (Fraccionamiento Luis Donald Colosio II s/n 3era etapa fracción A) con previa autorización de la Directora del Centro (**Anexo 13.2**) y VIH- en la Universidad Autónoma de Hidalgo. Firmando una carta de consentimiento informado (**Anexo 13.3**).

9.4.2 Criterios

9.4.2.1 Criterios de inclusión

Sujetos VIH+:

- Mayores de 18 años.
- Que tengan un diagnóstico positivo de VIH.
- Tener tratamiento antirretroviral.
- Que se encuentre en alguna de las siguientes categorías clínicas A1, A2, B1 y B2 en el momento del inicio del estudio, esta clasificación se realizó con base al expediente clínico y la consulta médica, la cual fue realizada por personal del CAPASITS.
- Residentes de la ciudad de Pachuca.

Sujetos VIH-:

- Mayores de 18 años.
- Que tengan un diagnóstico negativo de VIH, de máximo 3 meses de antigüedad.
- Que refieran un buen estado de salud general.
- Residentes de la ciudad de Pachuca.

9.4.2.2 Criterios de exclusión

Sujetos VIH+:

- Que no estén recibiendo algún suplemento antioxidante.
- Mujeres que por medio de una prueba de embarazo proporcionada por los investigadores, confirmen estar embarazadas.

- Que consuman inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (como el captopril o enalapril).
- Que no cumplan con al menos el 95% de la adherencia de la suplementación, en el caso de los sujetos que tomaran microencapsulado o ácido ascórbico.

Sujetos VIH-:

- Que no estén recibiendo algún suplemento antioxidante.
- Mujeres que por medio de una prueba de embarazo proporcionada por los investigadores, confirmen estar embarazadas.
- Que consuman inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (como el captopril o enalapril).
- Que no cumplan con al menos el 95% de la adherencia de la suplementación, en el caso de los sujetos que tomaran microencapsulado o ácido ascórbico.

9.4.2.3 Criterios de eliminación

Sujetos VIH+:

- Evolución de la enfermedad a la categoría clínica de SIDA (A3, B3, C1, C2 y C3).
- Abandonar el tratamiento antirretroviral.
- Sujetos que no sigan la suplementación del microencapsulado de jugo de granada roja y de ácido ascórbico.
- Mujeres que durante la investigación se embaracen.
- Sujetos que no asistan a la toma sanguínea de seguimiento.
- Sujetos que fallezcan.

Sujetos VIH-:

- Sujetos que no sigan la suplementación del microencapsulado de jugo de granada roja y de ácido ascórbico.
- Mujeres que durante la investigación se embaracen.
- Sujetos que no asistan a la toma sanguínea de seguimiento.
- Sujetos que fallezcan.

9.5 Granada

El microencapsulado de jugo de granada roja fue obtenido por la compañía, Granding International SA de CV, el cual tiene características aptas para consumo humano, con certificado de calidad cumpliendo con las normas microbiológicas y de elaboración (**Anexo 13.4**) y se encuentra bajo registro para patente por el Dr Gabriel Betanzos Cabrera, Alfonso Atitlán Gil (UAEH) y por Javier Alanís. (**Anexo 13.5**)

9.6 Ácido ascórbico (Vitamina C)

Se suplementó ácido ascórbico puro cristiano en polvo de grado alimento (Laboratorio Cedrosa) y se dosificó en 1g en vasos con tapadera.

9.7 Selección y asignación de tratamiento

Los dos grupos principales (VIH+ y VIH-) serán subdivididos en tres subgrupos de 10 sujetos cada uno por medio de asignación aleatoria por tratamiento. Los tres subgrupos estarán conformados por: un subgrupo control que no recibirá suplementación (Subgrupo 1) y dos subgrupos suplementados, uno con microencapsulado de jugo de granada roja (Subgrupo 2) y ácido ascórbico (Subgrupo 3).

9.7.1 Detalles de la ingesta de la suplementación

9.7.1.1 Suplementación con Microencapsulado de Jugo de Granada Roja (MJGR)

Los sujetos pertenecientes a los subgrupos 2 tomarán 1g de microencapsulado en un vaso de agua (240mL) en ayunas, diariamente durante los 90 días de la intervención.

9.7.1.2 Suplementación con ácido ascórbico (AA)

Los sujetos pertenecientes a los Subgrupos 3 tomarán 1g de microencapsulado en un vaso de agua (240mL) en ayunas, diariamente durante los 90 días de la intervención.

Para ambos grupos suplementados la entrega se realizó a conveniencia del paciente en la modalidad semanal, se entregó empacado por dosis diaria, para que los sujetos los disolvieran en agua.

9.8 Extracción de sangre

Para los sujetos VIH+ la extracción de sangre se llevó a cabo por parte del personal de enfermería del CAPASITS, en las instalaciones de la institución de acuerdo a sus manuales de procedimientos. En el caso de los sujetos VIH- la toma de sangre se llevó a cabo en el consultorio 1 y 2 del laboratorio de Antropometría, del Instituto de Ciencias de la Salud, de la UAEH.

Se extrajeron 10 mL de sangre periférica por medio de punción venosa empleando tubos Vacutainer® (Serum REF 367820, BD Vacutainer, New Jersey, USA). Todo el material empleado fue nuevo y estéril, las agujas empleadas fueron depositadas en un recipiente RPBI para objetos punzocortantes. Se realizó una extracción al inicio de la investigación y posteriormente cada mes, dando en total 4 tomas.

9.8.1 Procedimiento para la extracción de sangre

Materiales: Ligadura, alcohol etílico al 70%, torundas, guantes estériles, agujas de 21G de diámetro, adaptador para tubos Vacutainer® y tubos de colección al vacío Vacutainer® amarillos.

La toma de muestra se llevó a cabo bajo la siguiente técnica:

1. Con previo lavado de manos clínico, usando guantes estériles, bata y googles.
2. Se le pidió al paciente que se colocara en una posición cómoda, con el brazo apoyado en una superficie plana y firme.
3. Se colocó el torniquete 5-10 cm por encima del sitio a puncionar.
4. Se seleccionó la vena a puncionar mediante palpación (vena cubital o cefálica).
5. Se realizó asepsia con alcohol.
6. Se fijó la vena sin entrar en contacto con la zona preparada (poniendo el dedo pulgar junto a la vena y tirando hacia abajo, con el dedo índice sobre el área se tiró hacia arriba, con cuidado de no contaminar).

7. Antes de puncionar el bisel debió estar hacia arriba, en ángulo de 10° a 30° para atravesar la piel y luego disminuyó el ángulo para no atravesar la vena.
8. Con la otra mano se conectó el tubo de vacío.
9. Se desconectó al tener la cantidad de sangre requerida.
10. Se removió la aguja del brazo.
11. Se colocó un algodón en el sitio de la punción.
12. Se desechó la aguja en un recipiente RPBI para objetos punzocortantes.
13. Se etiquetó el tubo con la información de identificación del paciente.
14. Se guardaron las muestras en una hielera para su transporte.

9.8.2 Transporte

En el caso de las muestras tomadas en el CAPASITS, las cuales estuvieron contenidas en tubos Vacutainer® de plástico rígido correctamente rotulado con el folio del paciente, se transportaron al Laboratorio de Nutrigenómica de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, colocadas en una gradilla, selladas en una bolsa, dentro de una hielera y finalmente empaquetadas y selladas en una caja.

9.8.3 Tratamiento profiláctico post-exposición accidental

En caso de haber tenido una lesión percutánea debido a una pinchadura con una aguja que fue utilizada para el manejo de una muestra sanguínea de un paciente VIH+ se tenía preparado la profilaxis post-exposición que de acuerdo a la gravedad de la lesión y el estado de la fuente de exposición, según lo indica la Guía de práctica clínica para la prevención, diagnóstico y tratamiento de la exposición laboral al VIH en trabajadores de la Salud de la Secretaría de Salud Mexicana (**Anexo 13.6**).

La exposición requeriría una evaluación médica urgente, tomando en cuenta que toda pauta de profilaxis postexposición se ha de iniciar antes de transcurridas 72 h de la exposición, administrándose las dosis diarias adecuadas durante 4 semanas de los medicamentos prescritos, si es posible se recomienda la determinación de ARN viral en el plasma al terminar este periodo (Secretaría de Salud, 2012).

El tratamiento profiláctico quedará a cargo del Médico Internista Jorge Luis Ramírez Martínez con cédula de especialidad 4831297, los gastos ocasionados a

consecuencia de este procedimiento de emergencia serian solventados por parte de los propios investigadores.

9.9 Metodología

Después de la extracción, se centrifugó (en las instalaciones del CAPASITS) a 1600 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente (durante las dos horas siguientes a la extracción). El suero se alicuotó y almacenó a -80°C.

9.9.1 Actividad antioxidante en suero

9.9.1.1 Ensayo de decoloración del catión radical α - α -difeníl- β -picrilhidrazilo (DPPH[•]):

Se basa en la medición del grado de decoloración que provocan los componentes de la muestra sobre el DPPH[•], mediante el método reportado por Molares y Jiménez-Pérez, 2001. Se preparó una solución de DPPH[•] al 7.5% y se realizó una curva de calibración con Trolox a diferentes concentraciones (0, 20, 40, 60, 80y 100 μ g/L). Tomando 900 μ L de la solución de DPPH[•] y agregando 100 μ L de cada muestra, se dejó reposar por 1 hora, posteriormente se realizó una lectura de absorbancia a 520 nm. Se tomaron como válidas las curvas del calibrador de Trolox con una $R^2 \geq 0.995$. Los resultados se expresaron en μ g de TEAC (actividad antioxidante equivalente al Trolox) por mililitro de suero.

9.9.1.2 Ensayo de decoloración con el radical catiónico ABTS^{•+}:

Fundamentada en la decoloración del radical ABTS^{•+}, debido a la reducción en presencia de especies donantes de hidrógeno (Re *et al.*, 1999). Se preparó una solución compuesta por ABTS^{•+} a una concentración de 3.6 mg/mL y 6 mg de persulfato de potasio. Dejándola reposar en obscuridad por 24 horas a temperatura ambiente. Se realizó una dilución con etanol hasta tener valores de absorbancia de 0.70 ± 0.02 a 734 nm. Simultáneamente se realizó una curva de calibración con Trolox a diferentes concentraciones (0, 20, 40, 60, 80y 100 μ g/L). Tomando 100 μ L de la muestra y adicionándole 900 μ L de la solución de ABTS^{•+} previamente preparada, dejando en reposo por 5 min en obscuridad y posteriormente se realizó una lectura de absorbancia a 734 nm. Se tomaron como válidas las curvas del calibrador de Trolox con una $R^2 \geq 0.995$. Los resultados de expresaron en μ g de TEAC por mililitro de suero.

9.9.2 Detección de productos finales de la peroxidación lipídica de membrana plasmática.

9.9.2.1 Ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico TBARS:

Para un volumen de 100µl de plasma se añadió 25µl de NaOH 3M y se colocaron en baño María a 60°C por 30 min. Posteriormente se agregaron 1000µl de H₂SO₄ 0.05M, se disolvieron y se añadieron 500 µl de TCA al 20%. Se centrifugó a 3000rpm por 10 minutos, se tomaron 250µl de sobrenadante y se agregaron 500µl de TBA, se disolvieron y se incubaron a 90° C por 40 minutos. Al enfriarse finalmente se leyeron con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 532 nm. Los resultados se expresaron en U mol/L de MDA (Grotto *et al.*, 2008).

9.10 Análisis estadístico

Se realizaron pruebas de ANOVA con Bonferroni post-test para comparar las diferencias dentro del grupo durante el tratamiento. (GraphPad software, 2007, versión 5.0, San Diego California, U.S.A.). Para evaluar la correlación entre las variables se aplicó el coeficiente de correlación de Pearson, el nivel de correlación se catalogó usando la clasificación propuesta por Zou, Tuncall y Silverman: débil ($r < 0.3$), moderada ($0.3 < r < 0.6$) y fuerte ($r > 0.6$) (Zou *et al.*, 2003).

Valores de $p < 0.05$ fueron considerados como significativos.

9.11 Aspectos éticos

La primera preocupación fue la salud del voluntario además respetar sus derechos como lo establece la declaración de Madrid de la Asociación Médica Mundial (AMM) en 1987. El voluntario fue adecuadamente informado sobre el procedimiento, ya que tenía derecho a aceptarlo o negarlo, mediante el uso del consentimiento informado del cual se le entregó una copia al sujeto de estudio (**Anexo 13.3**), además de que todos los principios, deberes éticos y estándares relacionados con la confidencialidad fueron tratados mediante el secreto profesional, y el anonimato, que se protegió por medio de la asignación de un número de folio y una carta de confidencialidad (**Anexo 13.7**).

Fue una investigación con riesgo mayor que el mínimo según lo define la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, en su Título Segundo

“De los Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos”, Capítulo I, Artículo 17, Fracción III: “Son aquéllas en que las probabilidades de afectar al sujeto son significativas, entre las que se consideran: estudios radiológicos y con microondas, ensayos con los medicamentos y modalidades que se definen en el artículo 65 de este Reglamento, ensayos con nuevos dispositivos, estudios que incluyan procedimientos quirúrgicos, extracción de sangre 2% del volumen circulante en neonatos, amniocéntesis y otras técnicas invasoras o procedimientos mayores, los que empleen métodos aleatorios de asignación a esquemas terapéuticos y los que tengan control con placebos, entre otros.” Debido a que se utilizó un método aleatorio para la asignación de la intervención.

Se elaboró una carta de no conflicto de interés entre el responsable técnico del proyecto, el creador del producto con patente en proceso y los responsables técnicos **(Anexo 13.8)**.

9.11.1 Manejo de la información

La protección de la información de los sujetos de investigación se realizó como lo establece la normatividad mexicana (NOM-004-SSA3-2012 Del expediente clínico, NOM-040-SSA2-2004 En materia de información en salud) y la declaración de Lisboa de la AMM (Asamblea Médica Mundial, 2015a; Asamblea Médica Mundial, 2015b). El acceso a los informes foliados y/o cualquier documento físico o electrónico que contenga información personal o de identificación de los sujetos de investigación solo fue permitido para los investigadores: María Fernanda Reséndiz Otero y Rodrigo Ronces Arrieta. El resguardo de los mismos también concernió a ellos, estos documentos serán almacenados por un periodo máximo de un año después de la culminación de la intervención, con el fin de apoyar la redacción del documento final.

9.11.2 Manejo de las muestras sanguíneas

La toma, manejo y desecho de muestras se realizó acorde la normatividad mexicana. (NOM-253-SSA1-2012 Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos, NOM-087-ECOL-SSA1-2002 Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos -

Clasificación y especificaciones de manejo, NOM-010-SSA2-2010 Para la prevención y control de la infección por virus de la inmunodeficiencia humana)

El presente protocolo se apegó de forma estricta a los principios contenidos en la declaración de Helsinki, ya que está basado en cuidadoso conocimiento del tema (Art. 11), una cuidadosa evaluación de riesgos y beneficios (Art. 16-17), una probabilidad razonable que la población estudiada obtenga un beneficio (Art. 19) y fue manejado por técnicos capacitados (Art. 17) por lo que fue sometido a una revisión ética libre de conflicto de intereses (Asamblea Médica Mundial, 2015c). El desecho de las muestras se hizo en base al Plan de manejo integral de los RPBI, contenido en el Manual de procedimientos del departamento del control del medio ambiente de la UAEH.

10 Resultados

10.1 Características de los sujetos de estudio

Al inicio del estudio, se reclutaron 60 sujetos, sin embargo, 3 abandonaron el estudio por voluntad propia, por lo que finalmente el estudio se llevó a cabo en 57 sujetos [VIH+ (n=27) y VIH- (n=30)] los cuales completaron los 90 días de tratamiento, la descripción general de sus características se resume en la **Tabla 9**.

Todos los sujetos pertenecientes al grupo VIH+ se encontraban dentro de las categorías clínicas A1, A2, B1 y B2.

No se reportaron efectos secundarios por parte de los subgrupos que recibieron suplementación durante la intervención.

Tabla 9 Características generales de los sujetos

		VIH+	VIH-
	n	27	30
Genero	Hombre	5	15
	Mujer	22	15
Edad	18 a 30	10	16
	30 a 40	9	11
	+40	8	3
	Talla	1.69 ± .1	1.68 ± .1
	Peso	70 ± 12.4	72.3 ± 15.6
IMC	Bajo peso	1	
	Normopeso	13	13
	Sobrepeso	14	14
	Obesidad	2	3

10.2 Actividad antioxidante en suero

10.2.1 Ensayo de decoloración con el radical catiónico (ABTS^{•+})

En la **Figura 6** se observa la comparación de todos los subgrupos y la evolución de la actividad antioxidante medida por el ensayo ABTS^{•+} durante los 90 días, donde se muestra la comparación de la actividad antioxidante en los subgrupos controles tanto el VIH+ como en el VIH-, sin mostrar diferencias significativas (VIH+ \bar{x} = 1273.9±42.1µgTEAC/mL y VIH- \bar{x} = 1778.7±22.6µgTEAC/mL). El subgrupo VIH+ suplementado con MJGR, aumentó 53 puntos porcentuales (p.p.) del día 0 al día 30, 78 p.p. al día 60 y 84 p.p. al día 90. Mientras que el subgrupo VIH- aumentó del día 0 al 30 13 p.p., al día 60 32 p.p. y al día 90 41 p.p. El subgrupo VIH+ suplementado con AA logró un aumento de 89 p.p. al día 30, mientras que para el día 60 aumentaron 142 p.p. manteniéndose hasta el día 90. El subgrupo VIH- suplementado con AA logró un aumento de 53 p.p. al día 30, 85 p.p. al día 60 mientras que para el día 90 disminuyó un 1 p.p. En ambos subgrupos tanto los suplementados con MJGR y AA, presentaron diferencias significativas entre el día 0 y el día 30, 60 y 90, así como entre el día 30 y el día 60 y 90.

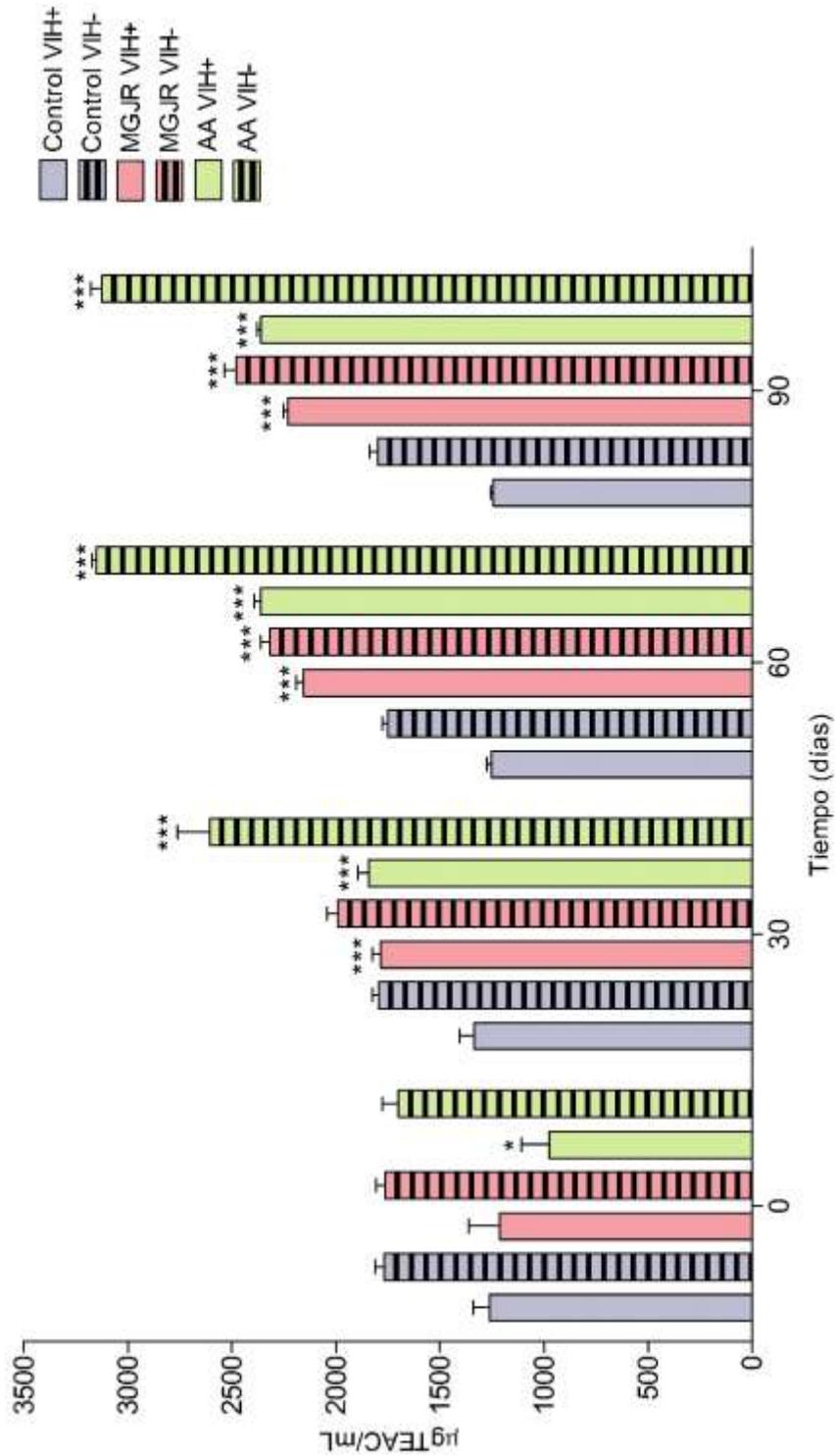


Figura 6 Actividad antioxidante (ABTS⁺) medida cada 30 días: Todos los subgrupos. Cada valor representa la media \pm error estándar. Las barras con diferentes caracteres son estadísticamente significativas respecto al mismo subgrupo en los diferentes tiempos. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

10.2.2 Ensayo de decoloración del catión radical a-a-difenil-β-picrilhidrazilo (DPPH[•])

En la **Figura 7** muestra la comparación de la actividad antioxidante medida por el ensayo DPPH[•], en los subgrupos controles tanto el VIH+ como en el VIH-, durante los 90 días de suplementación no mostraron diferencias significativas (VIH+ \bar{x} = 1816.5±22.8 µgTEAC/mL y VIH- \bar{x} = 1770.9±22.5 µgTEAC/mL). El subgrupo VIH+ suplementado con MJGR aumento 6 p.p. al día 30, 24 p.p. al día 60 y 37 p.p. al día 90. Solo se mostraron diferencias significativas en el día 60 y 90 comparadas con el día 0 y el día 90 comparado con el día 0. El subgrupo VIH- suplementado con MJGR aumentó 7 p.p. el día 30, 26 p.p. al día 60 manteniéndose hasta el día 90. Presentando diferencias significativas entre el día 0 y el día 30, 60 y 90, así como entre el día 30 y el día 60 y 90. Los subgrupos suplementados con AA lograron un aumento significativo los VIH+ 61 p.p. al día 30, 96 p.p. al día 60 y 152 p.p. al día 90. Mientras que los VIH- 30 p.p., 39 p.p. y 52 p.p. respectivamente. Ambos subgrupos presentaron diferencias significativas entre el día 0 y el día 60 y 90, entre el día 30 y el día 90, así como entre el día 60 y el 90.

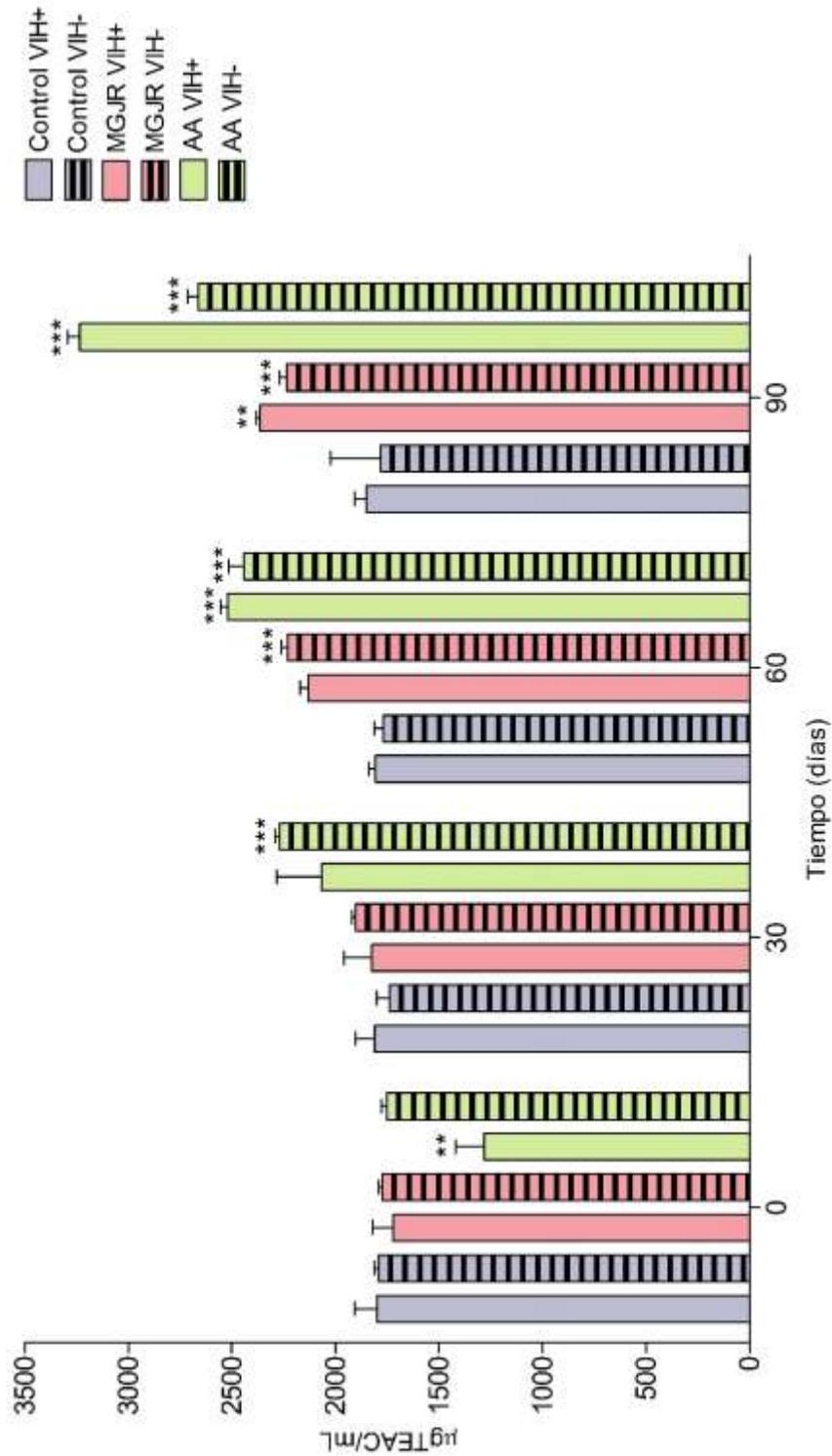


Figura 7 Actividad antioxidante (DPPH) medida cada 30 días: Todos los subgrupos. Cada valor representa la media \pm error estándar. Las barras con diferentes caracteres son estadísticamente significativas respecto al mismo subgrupo en los diferentes tiempos. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

10.3 Detección de productos finales de la peroxidación lipídica de membrana plasmática por ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)

En la **Figura 8** muestra la cantidad de MDA en plasma de los sujetos de los subgrupos controles (VIH+ $\bar{x} = 31 \pm 1.1$ nmol MDA/mL y VIH- $\bar{x} = 39.4 \pm 1.5$ nmol MDA/mL) sin presentar diferencias significativas. El subgrupo VIH+ suplantando con MJGR logró disminuir 35 p.p. para el día 0, 46 p.p. para el día 60 y finalmente disminuyó un 61 p.p. para el día 90. Mientras que para el subgrupo VIH- suplementado con MJGR la disminución fue de 37 p.p. el día 30, 45 p.p. para el día 60, y 55p.p. el día 90. Ambos grupos suplementados con MJGR mostraron una diferencia significativa entre el día 0 y el día 60 y 90. Para los subgrupos suplementados con AA, el subgrupo VIH+ disminuyó 9 p.p. al día 30, 14 p.p. al 60 y 10 p.p. al final de la suplementación día 90. Mientras que para el subgrupo VIH- día 30 disminuyó 12 p.p., al día 60 22 p.p. y al 90 24 p.p. Sin embargo, ninguno de estos subgrupos mostró diferencias significativas.

Demostrando que la suplementación con MJGR tuvo mejores resultados. Con una diferencia significativa en todos los tiempos.

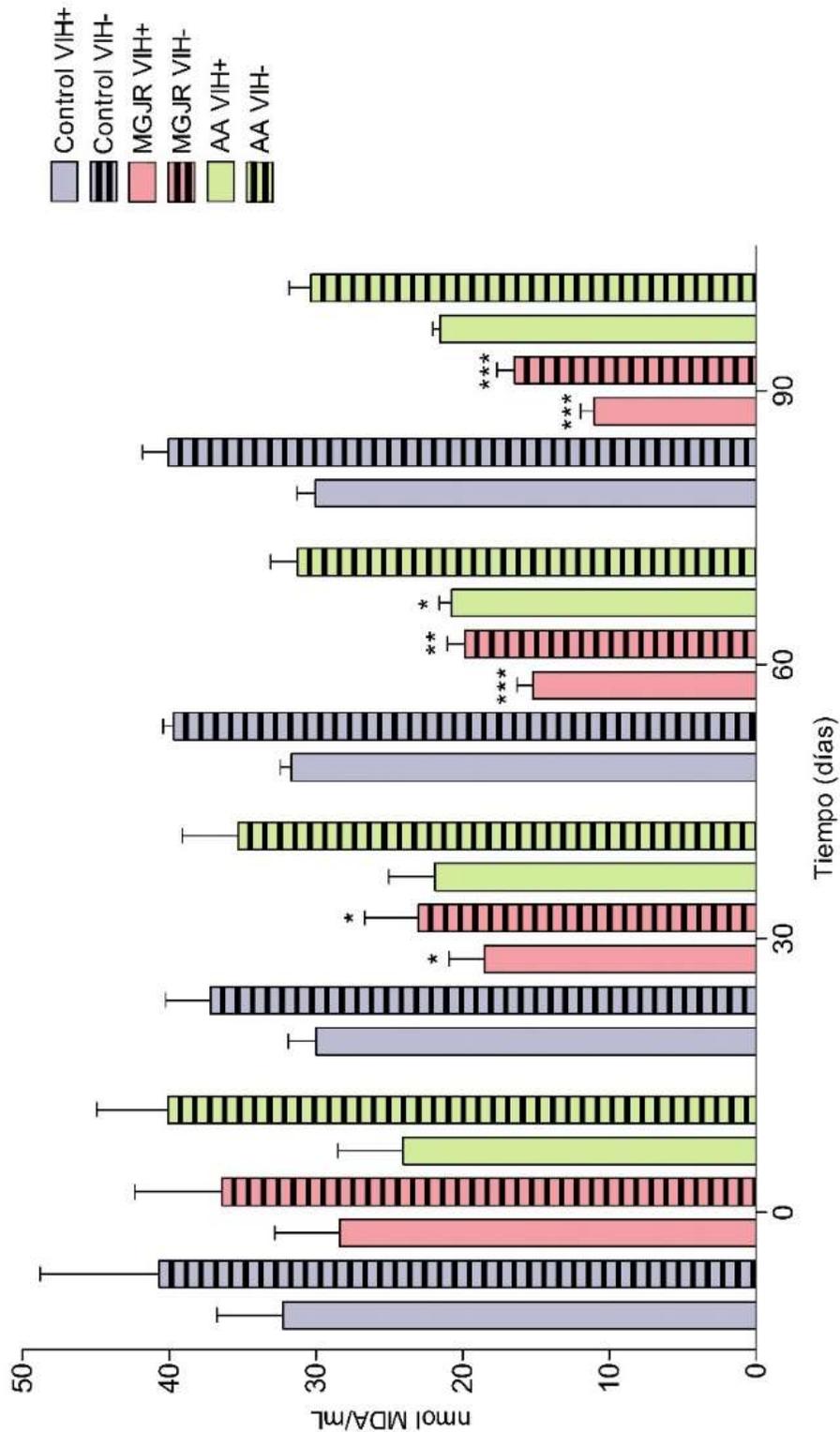


Figura 8 Peroxidación lipídica (TBARS) medida cada 30 días: Todos los subgrupos. Cada valor representa la media \pm error estándar. Las barras con diferentes caracteres son estadísticamente significativas respecto al mismo subgrupo en los diferentes tiempos. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

10.3.1 Correlación entre variables

El análisis de la correlación entre la actividad antioxidante medida por el ensayo de ABTS⁺ y la peroxidación lipídica medida por el ensayo de TBARS, en el grupo VIH⁺ se muestran la **Figura 9**, donde los resultados de los subgrupos controles no muestran correlación. El subgrupo suplementado con MJGR mostró una correlación negativa fuerte (-0.98) al igual que el subgrupo suplementado con AA donde la correlación fuerte fue de -0.96.

Las diferencias significativas son comparadas en los diferentes tratamientos, en el mismo tiempo se muestran en la **Figura 9**, donde en el día 0 no muestra ninguna, en el día 30 entre los subgrupos VIH⁺ controles, en el día 60 y 90 todos los tratamientos muestran diferencias entre sí.

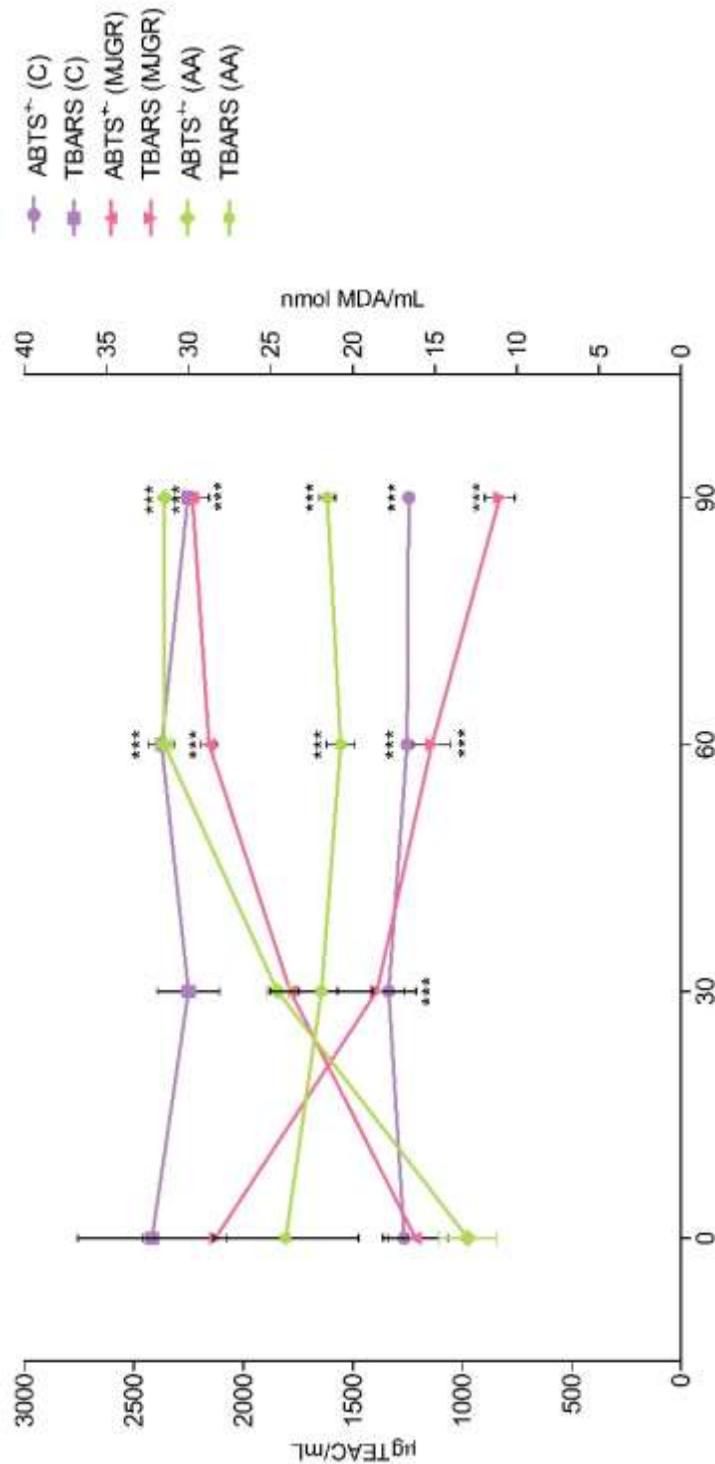


Figura 9 Correlación entre actividad antioxidante (ABTS⁺) y peroxidación lipídica (TBARS) en el grupo VIH+ Cada valor representa la media \pm error estándar. Las barras con diferentes caracteres son estadísticamente significativas respecto a diferentes tratamientos en el mismo tiempo. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

En la **Figura 10** se muestra la correlación entre la actividad antioxidante medida por el ensayo de ABTS⁺ y la peroxidación lipídica medida por el ensayo de TBARS, en el grupo VIH-, en el subgrupo control no se muestran correlaciones. Los resultados obtenidos a través del tiempo de suplementación del subgrupo suplementado con MJGR muestra correlación negativa fuerte (-0.92), al igual que el subgrupo suplementado con AA (-0.97).

Los subgrupos controles y suplementados con MJGR presentaron diferencias significativas en el día 30, mientras que en el día 60 y 90 todos los subgrupos presentaron diferencias.

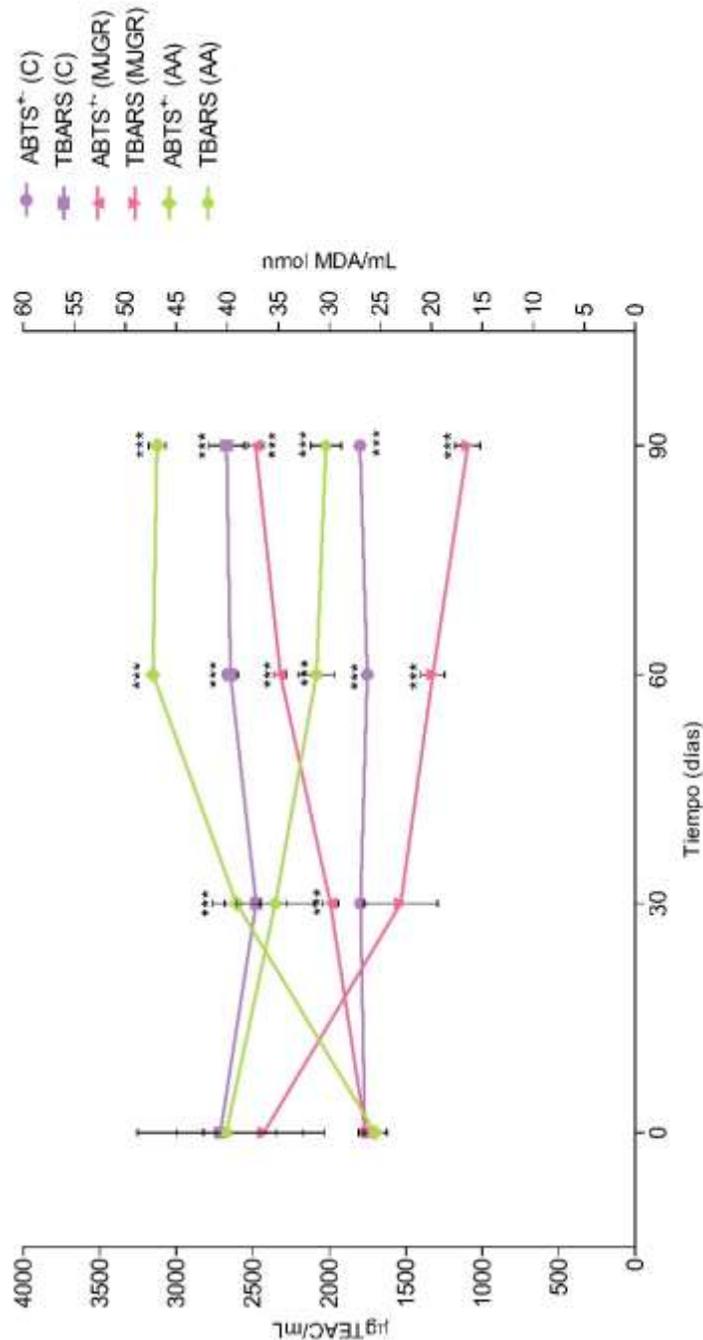


Figura 10 Correlación entre actividad antioxidante (ABTS⁺) y peroxidación lipídica (TBARS) en el grupo VIH- Cada valor representa la media \pm error estándar. Las barras con diferentes caracteres son estadísticamente significativas respecto a diferentes tratamientos en el mismo tiempo. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

La **Figura 11** muestra la correlación entre la actividad antioxidante medida por el ensayo de DPPH^{*} y la peroxidación lipídica medida por el ensayo de TBARS, en el grupo VIH+, no muestra correlaciones en ningún subgrupo.

Las diferencias significativas se muestran entre los diferentes tratamientos se muestran en el día 60 y 90.

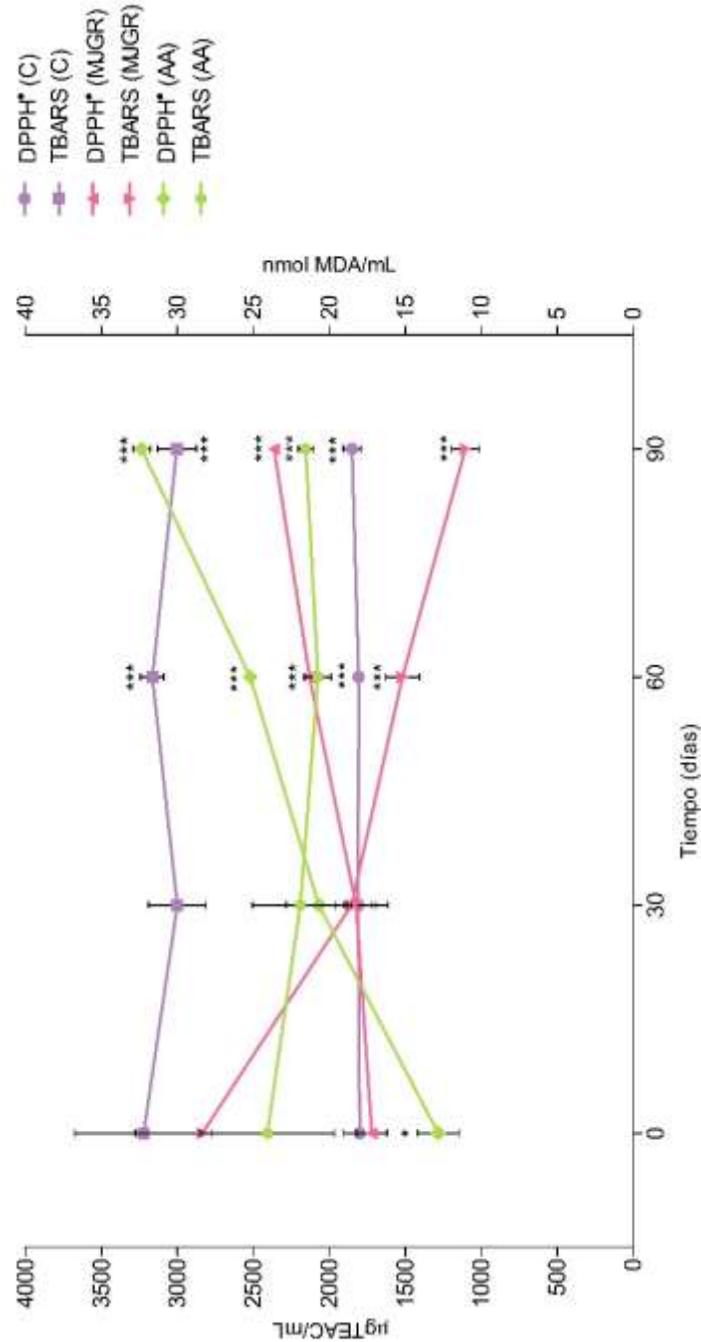


Figura 11 Correlación entre actividad antioxidante (DPPH*) y peroxidación lipídica (TBARS) en el grupo VIH+ Cada valor representa la media \pm error estándar. Las barras con diferentes caracteres son estadísticamente significativas respecto a diferentes tratamientos en el mismo tiempo. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

En la **Figura 12** se muestra la correlación entre la actividad antioxidante medida por el ensayo DPPH^{*} y la peroxidación lipídica medida por el ensayo de TBARS en los subgrupos VIH- , en el subgrupo control se muestra una correlación positiva fuerte (0.92). En los subgrupos suplementados existe correlación negativa fuerte, el MJGR con -0.97 y el subgrupo suplementado con AA -0.96.

Las diferencias significativas se muestran en el día 30 en los subgrupos suplementados con MJGR y AA, en el día 60 entre todos los grupos y en el día 90 en los subgrupos suplementados con MJGR y AA.

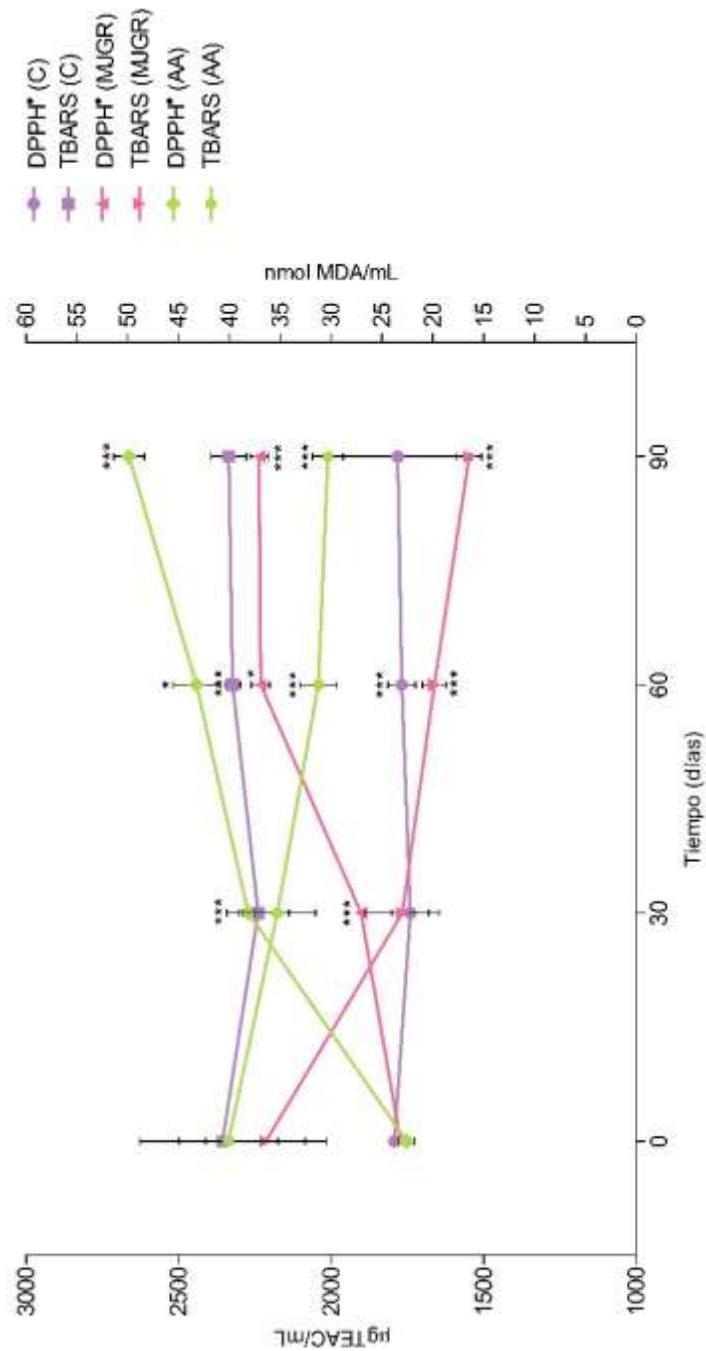


Figura 12 Correlación entre actividad antioxidante (DPPH*) y peroxidación lipídica (TBARS) en el grupo VIH- Cada valor representa la media \pm error estándar. Las barras con diferentes caracteres son estadísticamente significativas respecto a diferentes tratamientos en el mismo tiempo. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

11 Discusión

11.1 Resultados basales

La disminución de la capacidad antioxidante y el estrés oxidativo son factores de riesgo para la evolución o el desarrollo de ciertas enfermedades, en sujetos VIH+ juega un papel fundamental para la progresión de la infección (Oguntibeju *et al.*, 2009).

En la presente investigación el grupo VIH+ obtuvo una actividad antioxidante medida por ABTS⁺ 34p.p. menor en contraste con el grupo VIH- al día 0. Lo cual es lo esperado, ya que de acuerdo a una revisión realizada por Gil-Del-Valle *et al.* (2002) la concentración de glutatión y otros compuestos de carácter antioxidante así como la actividad de la glutatión peroxidasa (GPX) y la actividad antioxidante total del suero, se encuentran dramáticamente disminuidas desde el estado asintomático de la infección (Gil-Del-Valle *et al.*, 2002). Una gran variedad de estudios han reportado la reducción del estatus antioxidante en pacientes VIH+, desde reducciones ligeras como las publicadas por Mandas *et al.* (2009) y Sundaram *et al.* (2008) donde la disminución no fue significativa en comparación con sujetos aparentemente sanos y sujetos VIH negativos respectivamente. (Sundarama *et al.*, 2008; Mandas *et al.*, 2009), hasta lo reportado en el estudio de Teto *et al.* (2013) donde los sujetos VIH+ obtuvieron una actividad antioxidante total 74.6% menor en comparación con los controles VIH- (Teto *et al.*, 2013).

Algunos investigadores vinculan la disminución de la actividad antioxidante en sujetos VIH+ en comparación a los VIH- a cuatro factores que modifican el balance oxidante-antioxidante en pacientes VIH+: 1) La respuesta inmune crónica, que por la activación metabólica de varios subtipos celulares se da una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (Gil-Del-Valle *et al.*, 2002; Khaitan y Unutmaz, 2012; Deeks *et al.*, 2014), 2) El tratamiento antirretroviral de gran actividad, debido a la toxicidad que producen los antirretrovirales en varios órganos (Domingos *et al.*, 2009; Adikwu *et al.*, 2013; Sharma, 2014), 3) El ciclo de vida del VIH, la transcripción de varias proteínas víricas inducen la producción de radicales libres (Ivanov *et al.*, 2016), 4) Daño epitelial intestinal, lo que suele causar diarrea y malabsorción crónica, que afectan la absorción de nutrientes antioxidantes y puede incrementar

la presencia de radicales libres en circulación (Duggal *et al.*, 2012; Deeks *et al.*, 2014).

Existen otros factores no relacionados al VIH que disminuyen la capacidad antioxidante, que también podrían contribuir a la disminución de la actividad antioxidante en el grupo VIH+: 1) El consumo inadecuado de sustancias antioxidantes (Kampa *et al.*, 2002), 2) Edad avanzada (Fusco *et al.*, 2007), 3) Tabaquismo (Church y Pryor, 1985), 4) Consumo excesivo de alcohol (Mukherjee, 2014) y 5) Radiación ultravioleta los cuales aumentan la producción de radicales libres (D'Orazio *et al.*, 2013).

Los resultados obtenidos sobre concentración de MDA en pacientes VIH+ y VIH- no mostraron diferencia significativa en estado basal, lo que es interesante ya que a la fecha numerosas líneas de evidencia indican que la infección por VIH provoca estrés oxidativo en modelos *in vivo* e *in vitro* (Ivanov *et al.*, 2016). En un estudio llevado a cabo por Teto *et al.* (2013), la concentración de MDA en pacientes VIH+ fue el doble que la obtenida por los controles sanos. En otro estudio conducido Ngondi *et al.* (2006), la producción de MDA en sujetos VIH+ fue 4.8 veces mayor que los pacientes VIH- (Ngondi *et al.*, 2006).

Nuestros resultados podían estar acorde a dos investigaciones una conducida por Aukrust *et al.* (2003) quienes revelaron que tras la prescripción de tratamiento antirretroviral los sujetos VIH+ tienen un decremento de la concentración de MDA y un ligero aumento de los niveles plasmáticos de ácido ascórbico y la vitamina E, vitaminas antioxidantes que no alcanzaron los valores normales. La otra conducida por Stephensen *et al.* (2007), quienes plantean la posibilidad de la existencia de un sistema compensatorio antioxidante en sujetos VIH+ bajo tratamiento antirretroviral, dicha respuesta adaptativa aumentaría la actividad antioxidante mediada por enzimas y en consecuencia se minimiza el daño debido al estrés oxidativo (Stephensen *et al.*, 2007).

Sin embargo, la teoría de la compensación pudiera no aplicar para cada uno de los sujetos, existen otros dos factores que han sido directamente relacionados con el nivel de peroxidación lipídica en la infección por VIH, los cuales son: 1) Esquema de tratamiento antirretroviral, un estudio demostró que diferentes combinaciones de

antirretrovirales implican distinto nivel de peroxidación lipídica (Ngondi *et al.*, 2006).
2) Conteo de linfocitos CD4+, se ha observado una correlación negativa entre el número de células CD4 y la capacidad antioxidante total (Annam y Suresh, 2012).

Todos los sujetos VIH+ que participaron en nuestra investigación están en estadios clínicos A1, A2, B1 y B2, lo que significa que tienen conteos de CD4 mayores a 200 células por mililitro. Además de que actualmente existe mayor disponibilidad de esquemas de tratamiento menos tóxicos (Organización Mundial de la Salud, 2013), por lo que sugerimos que estos factores en combinación con el sistema compensatorio antioxidante podrían explicar el nivel normal de MDA en el grupo VIH+.

11.2 Resultados al final de la suplementación

Los resultados obtenidos tras la intervención indican que el MJGR y el ácido ascórbico lograron compensar el nivel bajo de actividad antioxidante desde el día 30 de la suplementación, para ese tiempo los subgrupos VIH+ suplementados ya no tenían diferencia significativa con el grupo VIH- al día 0.

Sin embargo, tras los 90 días de intervención los resultados demuestran que el ácido ascórbico eleva en mayor medida la actividad antioxidante en los sujetos, independientemente su estado serológico en comparación con el MJGR.

Los mecanismos por los cuales el ácido ascórbico aumenta la actividad antioxidante se relacionan a su capacidad de neutralizar radicales peroxilos, alcoxi, hidroxilo y convertirlos en agua, mediante la donación de electrones el ácido ascórbico se vuelve un radical muy estable que es regenerado a partir de NADH, además tiene la capacidad de regenerar la vitamina E y el glutatión reducido (Lü *et al.*, 2010).

Una investigación llevada a cabo por Stephensen *et al.* (2007) sugiere que los sujetos que están infectados por VIH tienen mayores necesidades de ácido ascórbico (Stephensen *et al.*, 2007). Lo que comprobaron Aukrust *et al.* en su estudio, que reveló que los pacientes VIH+ tienen niveles bajos de ácido ascórbico y vitamina E en plasma (Aukrust *et al.*, 2003).

El aumento de la actividad antioxidante en los subgrupos suplementados con MJGR se relacionan a sus componentes con propiedades antioxidantes, los polifenoles

(Zarfeshany *et al.*, 2014), cuya naturaleza química es capaz de neutralizar antioxidantes dependiendo del número de anillos fenólicos, del número y posición de los grupos hidroxilicos y de dobles enlaces presentes en la molécula (Mataix-Verdú y Battino, 2009), la punicalagina es el tanino responsable del 50% de la actividad antioxidante del jugo de granada, su estructura contiene un gran número de anillos fenólicos (Rakel, 2009). El resto de su actividad antioxidante se la dan otros taninos y antiocianinas, los cuales trabajan en conjunto ya que se ha demostrado que estos compuestos aislados son menos efectivos que el jugo (Sreekumar *et al.*, 2014).

Pero pese a que la administración de ácido ascórbico aumentó en mayor medida la actividad antioxidante, los subgrupos VIH+ y VIH- que recibieron MJGR lograron disminuir más de la mitad su producción de MDA en comparación de una disminución máxima de 24p.p. en el subgrupo VIH- que recibió ácido ascórbico.

Anteriormente ya se ha reportado que los polifenoles son más eficientes que el ácido ascórbico contra el estrés oxidativo a nivel de la membrana celular (Petti y Scully, 2009), y es que mientras que las vitaminas antioxidantes como el ácido ascórbico y la vitamina E se encuentran en concentraciones milimolares en el organismo, los polifenoles se encuentran en rangos nanomolares (Bouayed y Bohn, 2010), por lo que se cree que a estas concentraciones estos tienen una actividad farmacológica para modular funciones celulares, de hecho, ya se ha demostrado que los polifenoles pueden modular la expresión y/o la actividad la actividad de enzimas como la glutatión peroxidasa, interactúan con varias vías de señalización (Shen *et al.*, 2012). Inclusive numerosos datos experimentales demuestran que, en los sistemas celulares tratados con polifenoles se produce un aumento en la concentración de glutatión y de la actividad enzimática que se relacionan con este, en particular de la glutamilcisteína sintasa, de la glutatión peroxidasa, de la glutatión reductasa y de la glutatión S-transferasa (Mataix-Verdú y Battino, 2009). También se ha demostrado que los polifenoles retrasan la oxidación *in vitro* del urato del plasma, el cual es uno de los principales antioxidantes endógenos de bajo peso molecular (Fernández-Pachón *et al.*, 2006).

Además de su actividad antioxidante per se, los polifenoles pueden interactuar de manera integrada con antioxidantes endógenos y exógenos en los diferentes compartimientos celulares, produciéndose reacciones en cadena que terminan por disminuir la presencia de radicales libres ya sea por una disminución de su producción o por su inactivación (Eastwood, 1999).

Si bien es cierto que el estrés oxidativo contribuye a la progresión de la infección de VIH y a la aparición de otras enfermedades crónicas esto no significa automáticamente que cualquier sustancia con propiedades antioxidantes va a solucionar el problema, hasta la fecha no hay evidencia de que la suplementación de sustancias antioxidantes aisladas tengan un impacto sustancial sobre el desarrollo de enfermedades a largo plazo. El MJGR por su lado preserva todos los compuestos bioactivos del jugo de granada, la interacción de estos posiblemente potencializan los efectos antioxidantes.

Por lo tanto el efecto que causó la suplementación con MJGR sobre el nivel de peroxidación lipídica tiene un mayor impacto que la del ácido ascórbico ya que se ha observado que la disminución del estrés oxidativo en pacientes VIH positivos implica la reducción de la carga viral, el aumento de linfocitos CD4, la demora de la progresión de la enfermedad a SIDA y un menor riesgo de muerte (Allard *et al.*, 1998; Wafaie *et al.*, 2004).

12 Conclusiones

- 1.- Se encontró una disminución de la actividad antioxidante medida por ABTS^{•+} y DPPH[•] en pacientes VIH+ en comparación con VIH-.
- 2.- La suplementación de microencapsulado de jugo de granada roja y ácido ascórbico en sujetos independientemente de su estado serológico estuvo inversamente asociada con los cambios en la concentración de MDA en plasma.
- 3.- La suplementación con ácido ascórbico elevó significativamente la actividad antioxidante medida por ABTS^{•+} y DPPH[•] en comparación de la suplementación de microencapsulado de jugo de granada roja.
4. La suplementación de microencapsulado de jugo de granada roja redujo significativamente la concentración de MDA en sujetos VIH- y VIH+ en comparación con el ácido ascórbico.

13 Referencias

Adikwu, E., Brambaifa, N., Deo, O., y Oru-Bo, P. G. (2013). Antiretroviral toxicity and oxidative stress. *Am J Pharmacol Toxicol*, 8(4), 187-196.

Ailawadi, P., y Pandhi, D. (2014). Initiation of antiretroviral therapy. *Indian J Sex Transm Dis*, 35(1), 1–11.

Allard, J. P., Aghdassi, E., Chau, J., Tam, C., Kovacs, C. M., Salit, I. E., y Walmsley, S. L. (1998). Effects of vitamin E and C supplementation on oxidative stress and viral load in HIV-infected subjects. *AIDS*, 12(13), 1653-1659.

Amador-Licon, N., Díaz-Murillo, T. A., Gabriel-Ortiz, G., Pacheco-Moises, F.P., Pereyra-Nobara, T. A., Guízar-Mendoza, J. M.,... Vázquez-Valls, E. (2016). Omega 3 Fatty Acids Supplementation and Oxidative Stress in HIV-Seropositive Patients, a Clinical Trial. *PLoS One*, 11(3), e0151637.

Annam, V., y Suresh D. R. (2012). Correlation between oxidative stress indices and CD4 counts in HIV infected patients. *Infectious Diseases*, 12(Suppl 1), 71-72.

Annam, V., y Suresh, D. R. (2012). Correlation between oxidative stress indices and CD4 counts in HIV infected patients. *BMC Infect Dis*, 12(Suppl 1), 71-72.

Arango, G. J. (2010). Introducción al metabolismo secundario, compuestos derivados del ácido shikimico. Medellín, España: Universidad de Antioquia. Recuperado de <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/shikimico.pdf>

Asamblea Médica Mundial. (2015). *Declaración de Helsinki de la AMM - Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos*. Recuperado de <http://www.wma.net/es/30publications/10policies/b3/>

Asamblea Médica Mundial. (2015). *Declaración de Lisboa de la AMM sobre los Derechos del Paciente*. Recuperado de <http://www.wma.net/es/30publications/10policies/l4/>

Asamblea Médica Mundial. (2015). *Declaración de Madrid de la AMM sobre Regulación Profesional*. Recuperado de <http://www.wma.net/es/30publications/10policies/r4/>

Aukrust, P., Müller, F., Svardal, A. M., Ueland, T., Berge, R. K., y Frøland, S. S. (2003). Disturbed Glutathione Metabolism and Decreased Antioxidant Levels in Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients during Highly Active Antiretroviral Therapy—Potential Immunomodulatory Effects of Antioxidants. *J Infect Dis*, 188(2), 232-238.

Banco Mundial. (2015). *Prevalencia de VIH*. Recuperado de <http://datos.bancomundial.org/indicador/SH.DYN.AIDS.ZS>

Basu, A., y Penugonda, K. (2009). Pomegranate juice: a heart-healthy fruit. *Nutr Rev*, 67(1), 49-56.

Bazzoli, C., Jullien, V., Le-Tiec, C., Rey, E., Mentré, y F., Tabure, A. M. (2010). Intracellular pharmacokinetics of antiretroviral drugs in HIV-infected patients, and their correlation with drug action. *Clin Pharmacokinet*, 49(1), 17-45.

Benzie, I.F.F. y Strain, J.J. (2005). Diet and antioxidant defense. En B. Caballero, L. Allen y A. Prentice. (Eds.), *Encyclopedia of Human Nutrition* (pp. 117-131). Madrid, España: Elsevier.

Beristáin, G. C. (2001). Microencapsulación: el empaquetado en miniatura. *La Ciencia y el Hombre*, 14(1): 39-42.

Bouayed, J., y Bohn, T. (2010). Exogenous antioxidants—Double-edged swords in cellular redox state. *Oxid Med Cell Longev*, 3(4), 228–237.

Burgoyne, R., y Tan, D. H. S. (2008). Prolongation and quality of life for HIV-infected adults treated with highly active antiretroviral therapy (HAART). *J Antimicrob Chemother*, 61, 469-473.

Calderón, J., Muñoz, E., y Quintanar, M. (2013). Estrés oxidativo y diabetes mellitus. *Rev. educ. Bioquím*, 32(2), 53-66.

CENSIDA. (2015). *La epidemia del VIH y el sida*. Recuperado de http://www.censida.salud.gob.mx/descargas/epidemiologia/L_E_V_S.pdf

CENSIDA. (2015). *Vigilancia Epidemiológica de casos de VIH/SIDA en México: Registro Nacional de Casos de SIDA*. Recuperado de http://www.censida.salud.gob.mx/descargas/epidemiologia/RN_2do_trim_2015.pdf

Church, D. F., y Pryor, W. A. (1985). Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ Health Perspect*, 64, 111–126.

Coop, G. O. (2011). Efecto protector del jugo de granada (*Punica granatum* L.) sobre complicaciones de la diabetes. *Universidad Autónoma de Queretaro*, 1: 1-10.

D’Orazio, J., Jarrett, S., Amaro-Ortiz, A. y Scott, T. (2013). UV Radiation and the Skin. *Int J Mol Sci*, 14(6), 12222–12248.

De la Fuente, M. (2011). Los antioxidantes y la función inmunitaria. En A. Marcos. (Ed.), *Inmunonutrición en la salud y la enfermedad* (pp.254-273). Ciudad de México, México: Panamericana.

Deeks, S. G., Lewin, S. R., y Havlir, D. V. (2013). The End of AIDS: HIV Infection as a Chronic Disease. *Lancet*, 382(9903), 1525–1533.

Deeks, S. G., Tracy, R., y Douek, D. (2014). Systemic Effects of Inflammation on Health during Chronic HIV Infection. *Immunity*, 39(4), 633–645.

Domingos, H., Cunhal, R. V., Paniago, A. M., Martins, D. M., Elkhoury, E. B., y Souza, S. (2009). Metabolic effects associated to the highly active antiretroviral therapy (HAART) in AIDS patients. *Braz J Infect Dis*, 13(2), 130-136.

Du, C. T., Wang, P. L., y Francis, F. J. (1975). Anthocyanins of pomegranate, *Punica granatum*. *J Food Sci*, 40, 417-418.

Duesberg, P. H. (1989). Human immunodeficiency virus and acquired immunodeficiency syndrome: correlation but not causation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(3), 755-764.

Duggal, S., Chugh, T. D., y Duggal, A. K. (2012). HIV and Malnutrition: Effects on Immune System. *Clin Dev Immunol*, 2012, 1-8.

Eastwood, M. A. (1999). Interaction of dietary antioxidants *in vivo*: how fruit and vegetables prevent disease?. *QJM*, 92(9), 527-530.

Elejalde, J. I. (2001). Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *An. Med. Interna*, 18(6), 326-335.

Encyclopaedia Britannica. (1911). *Encyclopaedia Britannica [versión digital]*. New York, EU: Encyclopaedia Britannica Inc.

Espín, J. C., Soler-Rivas, C., Wichers, H. J., y García-Viguera, C. (2000). Anthocyanin-based natural colorants: a new source of antiradical activity for foodstuff. *J Agric Food Chem*, 48(5), 1588-1592.

Faiinboim, L., y Geffner, J. (2012). Infección por el virus de la inmunodeficiencia humana y síndrome de la inmunodeficiencia adquirida. En: L. Faiinboim. (Ed.), *Introducción a la Inmunología Humana* (pp. 477-502). Ciudad de México, México: Panamericana.

Fernández-Pachón, M. S., Villaño, D., Troncoso, A. M., y García-Parrilla, M. C. (2006). Revisión de los métodos de evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* del vino y valoración de sus efectos *in vivo*. *ALAN*, 56(2), 1-25.

Figueira, M. S., Sá, L. A., Vasconcelos, A. S., Moreira, D. R., Laurindo, P. S., Ribeiro, D. R.,... Percario, S. (2014). Nutritional supplementation with the mushroom *Agaricus sylvaticus* reduces oxidative stress in children with HIV. *Can J Infect Dis Med Microbiol*, 25(5), 257-264.

Fusco, D., Colloca, G., Monaco, M. R., y Cesari, M. (2007). Effects of antioxidant supplementation on the aging process. *Clin Interv Aging*, 2(3), 377-387.

García, B., Saldaña, A., y Saldaña, L. (2013). Oxidative stress and antioxidants in cancer prevention. *Rev haban cienc méd*, 12(2), 187-196.

Gil, M. I., Tomás-Barberán, F. A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D. M., y Kader, A. A. (2000). Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J Agric Food Chem*, 48(10), 4581-4589.

Gil-Del-Valle, L., Reyes, A. T., Sánchez, G. M., y Fernández, O. S. (2002). Terapia Antioxidante en la Infección por el Virus de la Inmunodeficiencia. *Humana. Acta Farm*, 21(4), 301-308.

Grotto, D., Valentini, J., Boeira, S., Paniz, C., Santa-María, L., Vicentini, J.,... Gonçalves, C. (2008). Evaluation of the stability of the oxidative stress plasmatic biomarker – malondialdehyde. *Quím Nova*, 31(2): 275-279.

Husain, N. E., y Ahmed, M. H. (2015). Managing dyslipidemia in HIV/AIDS patients: challenges and solutions. *HIV AIDS (Auckl)*, 7, 1–10.

InfoSIDA. (2016). *Seroconversión*. Recuperado de <https://infosida.nih.gov/education-materials/glossary/4057/seroconversion>

Isada, C., Kasten, B., Goldman, M., Gray, L., y Aberg, J. (2001) Organisms. En M. Goldman. (Ed.), *Infectious diseases handbook* (pp. 69-336). Estados Unidos de América: APha.

Itinoseki, D. J., Rondó, P. H., Luzia, L. A., Souza, J. M., Firmino, A. V., y Santos, S. S. (2014). Vitamin E concentrations in adults with HIV/AIDS on highly active antiretroviral therapy. *Nutrients*, 6(9), 3641-3652.

Ivanov, A. V., Valuev-Elliston, V. T., Ivanova, O. N., Kochetkov, S. N., Starodubova, E. S., Bartosch, B., y Isagulians, G. (2016). Oxidative Stress during HIV Infection: Mechanisms and Consequences. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 1-17. doi: 10.1155/2016/8910396

Jeeva J. S., Sunitha, J., Ananthalakshmi, R., Rajkumari, S., Ramesh, M., y Krishnan, R. (2015). Enzymatic antioxidants and its role in oral diseases. *J Pharm Bioallied Sci*, 7(Suppl 2), S331–S333.

Jurenka, J. (2008). Therapeutic Applications of Pomegranate (*Punica granatum* L.): A Review. *Alternative Medicine Review*, 13(2), 128-144.

Kaio, D. J., Rondó, P. H., Souza, J. M., Firmino, A. V., Luzia, L. A., y Segurado, A. A. (2013). Vitamin A and beta-carotene concentrations in adults with HIV/AIDS on highly active antiretroviral therapy. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 59(6), 496-502.

Kampa, M., Nistikaki, A., Tsaousis, V., Maliaraki, N., Notas, G., y Castanas, E. (2002). A new automated method for the determination of the Total Antioxidant Capacity (TAC) of human plasma, based on the crocin bleaching assay. *BMC Clin Pathol*, 2(3), doi: 10.1186/1472-6890-2-3.

Khaitan, A., y Unutmaz, D. (2012). Revisiting Immune Exhaustion During HIV Infection. *Curr HIV/AIDS Rep*, 8 (1), 4–11.

Langford, S., Ananworanich, J., y Cooper, D. (2007). Predictors of disease progression in HIV infection: a review. *AIDS Research and Therapy*, 4(11), 1-14.

Leyva, E., y Gaitán, L. (2008). Enfermedades infectocontagiosas de tipo viral. En E. Leyva, y L. Gaitán. (Eds.), *Patología general e inmunología* (pp. 317-350). México: Triilas.

Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., y Chandra N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev*, 4(8), 118–126.

Lü, J. M., Lin, P. H., Yao, Q., y Chen, C. (2010). Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *J Cell Mol Med*, 14(4), 840–860.

MAGRAMA. (2013). Granada. Recuperado de http://www.magrama.gob.es/es/ministerio/servicios/informacion/granada_tcm7-315349.pdf

Mandas, A., Iorio, E. L., Congiu, M. G., Balestrieri, C., Mereu, A., Cau, D.,... Curreli, N. (2009). Oxidative Imbalance in HIV-1 Infected Patients Treated with Antiretroviral Therapy. *J. Biomed. Biotechnol.*, 9, 1-7.

Mangili, A., Murman, D. H., Zampini, A. M., y Wanke, C. A. (2006). Nutrition and HIV infection: review of weight loss and wasting in the era of highly active antiretroviral therapy from the nutrition for healthy living cohort. *Clin Infect Dis*, 42(6), 836-842.

Mataix-Verdú, J., Battino, M. (2009). Estrés Oxidativo. En: J. Mataix-Verdú. (Ed.), *Nutrición y Alimentación Humana* (pp. 1374-1413). España: Ergon.

Mayor, R. (2010). Oxidative Stress and Antioxidant Defense System. *Rev. Inst. Med. Trop.*, 5(2), 23-29.

McKee, J. (2009). Ácidos nucleicos. En: J. McKee. (Ed.), *Bioquímica, las bases moleculares de la vida* (pp. 625-730). México: Mc Graw Hill.

Méndez, C. (2002). Enfermedades relacionadas con la inmunidad. En: C. Méndez. (Ed.), *Patología humana básica aplicada a rehabilitación* (pp. 193-207). Colombia: Centro Editorial Universidad del Rosario.

Mercado, J. M., y Castro, M. R. (2014). La carga viral como determinante en la primoinfección por VIH, presentación de un caso. *Gac Med Bol*, 37(2), 87-89.

Morales, F., y Jiménez-Pérez, S. (2001). Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence. *Food Chemistry*, 72,119-125.

Mukherjee, S. (2014). Alcohol metabolism and generation of free radicals: A deep insight. *OA Alcohol*, 2(1),10.

Neurath, A. R., Strick, N., Li, Y.Y., y Debnath, A. K. (2004). Punica granatum (Pomegranate) juice provides an HIV-1 entry inhibitor and candidate topical microbicide. *BMC Infect Dis*, 4(4), 1-12.

Ngondi, J., Oben, J., Forkah, D., Etame, L., y Mbanya, D. (2006). The effect of different combination therapies on oxidative stress markers in HIV infected patients in Cameroon. *AIDS Research and Therapy*, 3(19), 1-7.

Ngondi, J., Oben, J., Musoro, D., Honore, E., y Mbanya, D. (2006). The effect of different combination therapies on oxidative stress markers in HIV infected patients in Cameroon. *AIDS Res Ther*, 3(19), 1-17.

Oguntibeju, O. O., Esterhuyse, A. J., y Truter, E. J. (2009). Possible benefits of micronutrient supplementation in the treatment and management of HIV infection and AIDS. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 3(9), 404-412.

Organización Mundial de la Salud. (2013). *Tratamiento Antirretroviral*. Recuperado de http://www.who.int/hiv/pub/guidelines/arv2013/art/arv2013_chapter07_es.pdf

Organización Mundial de la Salud. (2015). *Preguntas y respuestas sobre el VIH/SIDA*. Recuperado de <http://www.who.int/features/qa/71/es/>

Organización Mundial de la Salud. (2015). *Resumen mundial sobre la epidemia de sida*. Recuperado de http://www.censida.salud.gob.mx/descargas/cifras_mundo/UNAIDS_SIDA_en_cifras_2014_es.pdf

Organización Mundial de la Salud. (2015). *VIH/SIDA, Datos y cifras*. Recuperado de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs360/es/>

Organización Mundial de la Salud. (2016). *VIH/SIDA*. Recuperado de: http://www.who.int/topics/hiv_aids/es/

Parra, H. R. (2010). Revisión: Microencapsulación de Alimentos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 63(2), 5669-5684

Percival, M. (1996). Antioxidants. *Clinical Nutrition Insights*, 1, 1-4.

Petti, S., y Scully, C. (2009). Polyphenols, oral health and disease: A review. *J Dent*, 37, 413-423.

Rahman, T., Hosen, I., Islam, M. M. T., y Shekhar, H. U. (2012). Oxidative stress and human health. *Adv Biosci Biotechnol*, 3, 997-1019.

Rakel, D. (2009). Pomegranate Juice. *Clinical Men's Health*, 22, 419-431

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., y Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS⁺ radical cation decolorization assay. *Free radical biology & medicine*, 26, 1231-1237.

Regueiro, J.R. (2010). Defectos de la inmunidad: Inmunodeficiencias. En: J. R. Regueiro. (Ed.), *Inmunología, biología y patología del sistema inmunitario* (pp. 165-174). España: Panamericana.

Reyskens, K. M., y Essop, M. F. (2014). HIV protease inhibitors and onset of cardiovascular diseases: a central role for oxidative stress and dysregulation of the ubiquitin-proteasome system. *Biochim Biophys Acta*, 1842(2), 256-68.

Rivas, P., Holguín, A., Ramírez, E., Muñoz-Almagro, C., Delgado, R., Ortiz, R., y Soriano, V. (2006). Tratamiento antirretroviral según tipos y subtipos del virus de la inmunodeficiencia humana. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 24(Supl.2), 29-33.

Roca, B. (2003). Trastornos metabólicos relacionados con el VIH y el tratamiento antirretroviral. *Anales de Medicina Interna*, 20(11), 585-593.

Sánchez, F. (2009). Granada: Perspectivas y Oportunidades de un Negocio Emergente: Alternativas agroindustriales del granado. *Fundación Chile*.

Secretaría de Salud. (2012). *Prevención, diagnóstico y tratamiento de la exposición laboral al VIH en trabajadores de la salud*. Recuperado de www.cenetec.salud.gob.mx/...Exposicionlaboral/GER_ExposicionLaboral-1.pdf

Sharma, B. (2014). Oxidative stress in HIV patients receiving antiretroviral therapy. *Curr HIV Res*, 12(1), 13-21.

Shebis, Y., Iluz, D., Kinel-Tahan, Y., Dubinsky, Z., y Yehoshua, Y. (2013). Natural Antioxidants: Function and Sources. *Food and Nutrition Sciences*, 4, 643-649.

Shen, C. L., Cao, J. J., Dagda, R. Y., Chanjaplammoetil, S., Lu, C., Chyu, M. C.,... Yeh, J. K. (2012). Green tea polyphenols benefits body composition and improves bone quality in long-term high-fat diet-induced obese rats. *Nutr Res*, 32(6), 448-457.

Shevitz, A., y Knox, T. (2011). Nutrition in the Era of Highly Active Antiretroviral Therapy. *Clin Infect Dis*, 32(12), 1769-1775.

Soto, L. (2004). Mecanismos patogénicos de la infección por VIH. *Rev invest clín*, 56(2), 143-152.

Sreekumar, S., Sithul, H., Muraleedharan, P., Azeez, J. M., y Sreeharshan, S. (2014). Pomegranate Fruit as a Rich Source of Biologically Active Compounds. *Biomed Res Int*, 2014, doi: 10.1155/2014/686921

Stephensen, C. B., Marquis, G.S., Douglas, S.D., Kruzich, L. A., y Wilson, C. M. (2007). Glutathione, glutathione peroxidase, and selenium status in HIV-positive and HIV-negative adolescents and young adults. *Am J Clin Nutr*, 85,173– 81

Sundarama, M., Saghayama, S., Priyaa, B., Venkateshb, K. K., Balakrishnana, P., Shankara, E. M.,... Kumarasamy, N. (2008). Changes in antioxidant profile among HIV-infected individuals on generic highly active antiretroviral therapy in southern India. *Int J Infect Dis*, 12(6), e61-e66.

Teto, G., Kanmogne, G., Torimiro, J., y Alemnjin, G. (2013). Lipid Peroxidation and Total Cholesterol in HAART-Naïve Patients Infected with Circulating Recombinant Forms of Human Immunodeficiency Virus Type-1 in Cameroon. *PLoS One*, 8(6), e65126.

Thaker, H. K., y Snow, M. H. (2003). HIV viral suppression in the era of antiretroviral therapy. *Postgrad Med J*, 79, 36–42.

UNAIDS. (2016). *Global AIDS Update 2016*. Ginebra, Suiza: Joint United Nations. Recuperado de http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/global-AIDS-update-2016_en.pdf

United States Department of Agriculture. (2017). Basic Report: 09286, Pomegranates, raw. Recuperado de <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/2359?manu=&fgcd=>

Universitas Miguel Hernández de Elche. (2010). *I Jornadas Nacionales sobre el granado*. Recuperado de: <http://dpvm.umh.es/docs/publicaciones/i%20jornadas%20nacionales%20sobre%20el%20granado.pdf>

Vidal, C. C. (2008). Alientos Funcionales Algunas reflexiones en torno a su necesidad, seguridad y eficacia y cómo declarar sus efectos sobre la salud. *HUMANITAS Humanidades Médicas*, 24, 1-27.

Viladomiu, M., Hontecillas, R., Lu, P., y Bassaganya-Riera, J. (2013). Preventive and prophylactic mechanisms of action of pomegranate bioactive constituents. *Evid Based Complement Alternat Med*, 20, 764-789.

Viuda-Martos, M., Fernandez-Lopez, J., y Perez-Alvarez, J. A. (2010). Pomegranate and its Many Functional Components as Related to Human Health: A Review. *Compr Rev Food Sci F*, 9(6), 635-654.

Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernandez-Lopez, J., Sendra, E., Sayas-Barbera, E., y Perez-Alvarez, J. A. (2011). Antioxidant properties of pomegranate (*Punica granatum L.*) bagasses obtained as co-product in the juice extraction. *Food Res Int*, 44(5), 1217–1223.

Wafaie, W., Fawzi, M. B., Gernard, I., Msamanga, M. D., Spiegelman, D., Ruilan, W.,...Hunter, J. (2004). A Randomized Trial of Multivitamin Supplements and HIV Disease Progression and Mortality. *N Engl J Med*, 351, 23-32.

White, D., y Fenner, F. (1994). Retroviridae. En D. White y F. Fenner. (Eds.), *Medical Virology* (pp. 531-563). Estados Unidos de América: Academic Press.

Yábar, C. (2003). Eventos moleculares, genéticos e inmunológicos durante la interacción VIH-Hombre. *Rev Perú med exp salud pública*, 20(2), 107-115.

Yáñez, F. J., Salazar, M. J., Chaires, M. L., Jiménez, H. J., Márquez, R. M., y Ramos, R. E. (2006). Aplicaciones Biotecnológicas de la Microencapsulación. *Industria Alimenticia*, 21(28), 10-16.

Zarfeshany, A., Asgary, S., y Javanmard, S. H. (2014). Potent health effects of pomegranate. *Adv Biomed Res*, 3, 100.

Zou, K. H., Tuncali, K., y Silverman, S. G. (2003). Correlation and Simple Linear Regression. *Radiology*, 227(3), 617- 622.

14 Anexos

14.1 Cartas de aprobación de los comités de SS



**SERVICIOS DE SALUD DE HIDALGO
COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN DE LOS SERVICIOS
DE SALUD DEL ESTADO DE HIDALGO**

DICTAMEN DE PROTOCOLO

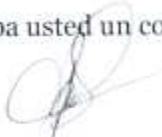
Pachuca de Soto, Hidalgo a 04 de Octubre de 2016

**MARÍA FERNANDA RESÉNDIZ OTERO
RODRIGO RONCES ARRIETA
INVESTIGADORES
P R E S E N T E**

Por este medio el Comité de Ética en Investigación de los Servicios de Salud de Hidalgo le informa que el protocolo de investigación titulado: **“Evaluación de la complementación de un microencapsulado de jugo de granada roja sobre la capacidad antioxidante y estrés oxidativo en pacientes VIH+”**, con número de registro **FSSA2016051**, ha sido revisado y de acuerdo a las recomendaciones de los miembros del Comité, y con fundamento en el artículo 109 del Reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación para la salud y 9.2.8 y 9.2.9 de la Norma Oficial Mexicana NOM-012-SSA3-2012, que establece los criterios para la ejecución de proyectos de investigación para la salud en seres humanos, le comunicamos que el dictamen al que se llegó fue:

APROBADO

Sin más por el momento, reciba usted un cordial saludo



ATENTAMENTE

**DRA. LOURDES CRISTINA CARRILLO ALARCÓN
PRESIDENTA DEL COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN
DE LOS SERVICIOS DE SALUD DE HIDALGO**



SERVICIOS DE SALUD DEL ESTADO DE HIDALGO
COMITÉ DE INVESTIGACIÓN EN SALUD DE LOS SSH

Pachuca Hgo., a 04 de octubre del 2016

ASUNTO: Dictamen de protocolo

DR. GABRIEL BETANZOS CABRERA
INVESTIGADOR PRINCIPAL
PRESENTE:

Comunico a usted que una vez realizada la segunda valoración del protocolo con número de folio: **FSSA2016051**, titulado: **"Evaluación de la suplementación de un microencapsulado de jugo de granada roja sobre la capacidad antioxidante y estrés oxidativo en pacientes VIH+"**, el Comité de Investigación en Salud de los SSH, emite el siguiente dictamen:

APROBADO

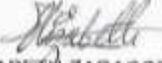
De acuerdo a lo establecido en el Procedimiento Normalizado de Operación correspondiente al Ingreso de Protocolos. No omito informar a usted que cualquier cambio al citado protocolo deberá solicitar autorización mediante enmienda, así mismo, le notifico que deberá presentar informe a este Comité, de los avances del proyecto según cronograma

Reciba mis respetos

ATENTAMENTE

DRA. LOURDES CRISTINA CARRILLO ALARCÓN
Presidenta del Comité de Investigación en Salud
Servicios de Salud de Hidalgo

14.2 Carta de autorización del CAPASITS

			
<p>En tus manos esta prevenir la hepatitis ¡Lávatelas!</p>			
<table border="1" style="width: 100%;"><tr><td style="font-size: small;">Dependencia: Subdirección General de Prestación de Servicios U. Administrativa: Dirección de UNEMES Área generadora: UNEME CAPASITS No. de Oficio: 00689</td></tr></table>			Dependencia: Subdirección General de Prestación de Servicios U. Administrativa: Dirección de UNEMES Área generadora: UNEME CAPASITS No. de Oficio: 00689
Dependencia: Subdirección General de Prestación de Servicios U. Administrativa: Dirección de UNEMES Área generadora: UNEME CAPASITS No. de Oficio: 00689			
<p>Asunto: Respuesta a solicitud</p>			
<p>Pachuca de Soto, Hgo., a 26 de julio de 2016</p>			
<p>C. MARIA FERNANDA RESENDIZ OTERO C. RODRIGO RONCES ARRIETA P R E S E N T E</p>			
<p>Por medio de la presente y en seguimiento a la solicitud verbal de realizar en este centro de atención el estudio de investigación para llevar a cabo la tesis "Evaluación de la suplementación de un microencapsulado de jugo de granada roja sobre la capacidad antioxidante y estrés oxidativo en pacientes VIH" para la Licenciatura en nutrición, me permito informar que este centro no tiene inconveniente en que se realice siempre y cuando se cumplan con los siguientes puntos:</p>			
<ol style="list-style-type: none">1. Aprobación por el Comité de Investigación de la Secretaría de Salud.2. Firma de carta de confidencialidad y Respeto a los Derechos Humanos de las Personas que Viven con VIH/SIDA.3. Mencionar específicamente el sustento científico en donde la suplementación de antioxidantes en las personas VIH positivas mejora la calidad de vida4. Revisar que las referencias citadas en el marco teórico coincidan con la bibliografía.5. Definir en los criterios de inclusión lo siguiente:<ol style="list-style-type: none">a. si la clasificación A1, A2, B1, B2 se hará en el momento en que se realice la investigación o se tomará en cuenta el momento en que el usuario ingresó al servicio,b. Definir si solo ingresaran al estudio usuarios de residencia en Pachuca, esto con la finalidad de facilitar el estudio6. Definir cómo se citará al usuario mensualmente para la toma de la muestra, ya que este centro no asegura que puedan acudir de manera mensual.7. De qué manera la investigación que se pretende realizar tendrá beneficios para la atención de nuestros usuarios8. Cómo se medirá la probable mejoría en nuestros usuarios9. Cuándo se le informará a este centro los resultados de los indicadores planteados en el proyecto.			
<p>ATENTAMENTE DIRECTORA DE LA UNEME CAPASITS</p>			
			
<p>DRA. ELIZABETH ZARAGOZA ZAPATA</p>			
<table border="1" style="width: 100%;"><tr><td style="text-align: center;">S.S.H. SERVICIO DE SALUD DE HIDALGO ALTA DIRECCIÓN DE UNEMES JUL 26 2016 ESTAFETA CORREO ELECTRONICO Soto de Guzman, Hidalgo</td></tr></table>			S.S.H. SERVICIO DE SALUD DE HIDALGO ALTA DIRECCIÓN DE UNEMES JUL 26 2016 ESTAFETA CORREO ELECTRONICO Soto de Guzman, Hidalgo
S.S.H. SERVICIO DE SALUD DE HIDALGO ALTA DIRECCIÓN DE UNEMES JUL 26 2016 ESTAFETA CORREO ELECTRONICO Soto de Guzman, Hidalgo			
<p><small>www.hidalgo.gob.mx Fraccionamiento Luis Donaldo Colosio, Fracción B Sra. Estela S/n, Fracción "A", Pachuca de Soto, Hgo. Tel (771) 71 50511, (771) 879374 FAX TEL 018005578344 capasits@hidalgo.gob.mx</small></p>			

14.3 Consentimiento informado



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICION



Proyecto: Evaluación de la suplementación de un microencapsulado de jugo de granada roja sobre la capacidad antioxidante y estrés oxidativo en pacientes VIH+

Consentimiento informado para participar en un estudio de investigación clínica

Director de proyecto	Dr. Gabriel Betanzos Cabrera
Responsables técnicos	María Fernanda Resendiz Otero Rodrigo Ronces Arrieta
Laboratorio de Nutrigenómica del Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo	
Introducción	Con este documento se le invita a participar en este estudio; Usted deberá conocer y comprender todas y cada una de las secciones siguientes, también podrá preguntar sobre cualquier duda que tenga con toda la libertad posible.
Justificación	La enfermedad por VIH daña el sistema inmune, disminuyendo la capacidad de defensa contra otras enfermedades. La granada roja es una fruta, se ha descubierto que contiene sustancias que ayudan al sistema inmune. Y aunque es difícil consumirla con frecuencia ya que es una fruta de temporada. Se ha creado un polvo elaborado con su jugo que conserva las propiedades de la fruta y que se puede consumir todo el año. El cual se ha probado que no daña la salud e inofensivo con la salud. Por lo cual queremos probar que su consumo ayuda a los sujetos con VIH.
Objetivo	Evaluar el efecto del polvo de granada sobre la salud y su capacidad de eliminar sustancias dañinas durante 90 días.

Se crearan tres grupos al azar. Así que le puede tocar estar en cualquier grupo.

Asignándole un tratamiento diferente a cada uno.

GRUPO 1: No se le dará nada

GRUPO 2: Polvo de granada 1 gramo por día diluido en agua en ayunas; por 90 días.

GRUPO 3: Vitamina C, 1 gramo por día diluido en agua durante el desayuno; por 90 días.

A todos los grupos sin importar si tiene o no tratamiento, se les dará una cita mensual para la toma de sangre.

Para los exámenes de laboratorio los cuales medirán los cambios en su capacidad e eliminar sustancias dañinas se tomara una muestra de sangre al inicio y cada mes durante tres meses. Para los sujetos VIH+ se le dará una cita para la toma de sangre en el CAPASITS asignándoles un día a cada grupo dentro del horario de 9:00 a 13:00 horas a conveniencia del sujeto, la cita durara entre 10 y 15 min. Mientras que los sujetos VIH- la toma se realizarán en el laboratorio de Nutrigenómica en el Instituto de Ciencias de la Salud, asignándoles un día a cada grupo dentro del horario de 14:00 a 18:00 horas a conveniencia del sujeto y la cita durara entre 10 y 15 min.

Procedimiento

El tratamiento ya sea granada o vitamina C será entregado a preferencia del sujeto de tres formas:

- **Semanal o Mensual: Se entregara el polvo y la vitamina C empacado en la cantidad diaria que tendrá que disolver y se les explicara como tomarlas.**

Se le entregara un calendario mensual donde diariamente marcara si se tomó o no el tratamiento así como sus antiretrovirales. Este calendario lo tendrán que regresar en su cita mensual, para control de su tratamiento.

Beneficios	<ul style="list-style-type: none"> -Conocer su capacidad antioxidante (capacidad del cuerpo de eliminar sustancias dañinas), no importa el grupo al que pertenezca, todos los estudios se le realizaran, cabe mencionar que esos estudios son costosos y difícilmente se realizan en los laboratorios. Los resultados se le entregaran personalmente, además de su explicación. -Al final del estudio recibirá un asesoramiento dietético de alimentos en base a los resultados del estudio, para que por medio de los alimentos pueda mejorar su calidad de vida. -Los exámenes de laboratorio, la toma de sangre, el tratamiento, la asesoría y la explicación de los resultados será de forma totalmente gratuita. -Sus datos se mantendrán de una manera discreta y confidencial, seguros por del secreto profesional y por una carta firmada de confidencialidad. -Es importante mencionar que aunque le toque estar en el grupo que no recibirá ningún tratamiento recibirá los benéficos adicionales los cuales son: <ul style="list-style-type: none"> o Estudios gratuitos con interpretación personal o Platica nutricional al final del estudio o Al terminar el estudio, se explicaran los resultados del estudio y como puede influir en su tratamiento y su calidad de vida
Riesgos	<ul style="list-style-type: none"> -El polvo de granada ha sido probado en animales de laboratorio y humanos sin presentar efectos negativos, al igual que la vitamina C. Pero en caso de molestias se recomienda dejar el polvo o la vitamina y avisar a los responsables. -Después de la toma de sangre podrá presentar un ligero mareo o nauseas.

Aclaraciones

- La suplementación será entregada en el CAPASITS así como la toma de muestra sanguínea en el caso de sujetos VIH+ y en ICSa para sujetos VIH-
- El tratamiento es para consumo personal, no se debe compartir.
- La participación en el estudio no implica gasto económico alguno para usted, todos los materiales serán proporcionados por los responsables.
- Los resultados del estudio serán manipulados de manera ética, confidencial y con fines de difusión y divulgación científica. Los cuales no incluirán datos personales.
- La participación en el estudio es voluntaria
- No existe ninguna consecuencia si usted decide no participar en el estudio
- Usted podrá retirarse del estudio en el momento que desee
- No recibirá ningún pago o gratificación por su participación
- Podrá solicitar toda la información que desea acerca del estudio durante y al finalizar el estudio
- Se le entregara una copia de este documento

Yo he leído detenida y detalladamente la información de este documento, mis dudas han sido respondidas de una manera clara y adecuada; por lo cual acepto las responsabilidades y obligaciones que implica ser parte del proyecto.

Firma del sujeto de investigación

Firma del responsable técnico del proyecto
Dr. Gabriel Betanzos Cabrera

Firma del responsable técnico
Rodrigo Ronces Arrieta

Firma del responsable técnico
Maria Fernanda Resendiz Otero

Nombre y firma del testigo 1

Dirección:

Parentesco con sujeto:

Nombre y firma del testigo 2

Dirección:

Parentesco con sujeto:

Fecha: ___ / ___ / 2016

Folio de identificación: _____

Datos de contacto

Rodrigo Ronces Arrieta
rodrigoronarr@gmail.com

Maria Fernanda Resendiz Otero
mafernanda.resendiz@gmail.com

Laboratorio de Nutrigenómica, 4ta etapa, ICSa, UAEH, Carr. Actopan-Tilcuautla s/n. Ex hacienda La Concepción.
San Agustín Tlaxiaca, Pachuca, Hidalgo, México C.P. 42160.

14.4 Certificado de calidad del microencapsulado de granada roja



Granding International SA CV

Exuberancia # 10 Col. Esmeralda, Jiutepec, Mor. MEXICO 62555
Tel / Fax (777) 319-7747. e-mail: granding1@prodigy.net.mx

Laboratorio de Control de Calidad CERTIFICADO DE CALIDAD

Nombre: GRANADA
Cliente: Dr. Gabriel Betanzos
Nombre científico: *Punica granatum*
Forma farmacéutica: Extracto seco
Lote: ESG013021014
Fecha de producción: 06 de Octubre de 2014
Fecha de caducidad: 3 años a partir de la fecha de producción, siguiendo las condiciones de almacenamiento señaladas.
País fabricante: México
Material vegetal usado: Fruto de la granada
Solvente de extracción: Mezclas hidro-alcohólicas
Excipientes: Maltodextrina
Conservadores: Ninguno

Propiedades organolépticas:

* Apariencia: Polvo
* Color: Lila
* Olor: Herbáceo característico
* Prueba del Tamiz: 99.01 % pasa por malla 40

Propiedades fisicoquímicas:

** pH relativo (10% en agua): 3.99
** Densidad de peso: 0.3678 g/mL
** Pérdida por secado: 3.77 %

Pruebas de solubilidad del Principio Activo:

* Diluciones al 1% (p/v)

En alcohol etílico al 96 %	En alcohol etílico al 70%	En agua desmineralizada
Poco favorable	No favorable	Favorable

Informe microbiológico:

Determinación	Resultado (UFC/g)	*** Límites (UFC/g)	Método utilizado en el análisis
Bacterias aerobias	<10	10 ³	NOM-092-SSA1-1994
Hongos y Levaduras	<10	10 ³	NOM-111-SSA1-1994
<i>Escherichia coli</i>	<10	10	NOM-113-SSA1-1994
<i>Salmonella spp.</i>	Ausente	Ninguna	NOM-114-SSA1-1994

* Referencia: Conforme a estándar interno.

** Referencia: Métodos utilizados conforme a la FEUM, 7ª Edición.

*** Referencia: Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos, 2001.

Condiciones de almacenamiento: Manténgase en lugar fresco y seco, libre de humedad a temperatura ambiente y bien cerrado.

Nota: Los resultados aquí presentados son del extracto seco a granel.
No deben copiarse o reproducirse sin previa autorización escrita.

ATENTAMENTE

L. F. Dalia González Maldonado
CEDULA 5967536 UAEM
Responsable Control de Calidad

14.5 Solicitud de registro de patente

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO**
Coordinación de la División de Investigación y Progreso
Office of Research and Graduate Studies
Dirección de Mercadeo de la Ciencia
Science Marketing Office

DIP/DMC/51/2016

Asunto: Solicitud de documentación y pendientes de posible resultado susceptible a protección GI.T.

DR. GABRIEL BETANZOS CABRERA
INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
P R E S E N T E

En seguimiento a la Gestión Inicial Documenta de la Protección de la Propiedad Intelectual del posible resultado susceptible a protección, con título provisional es "Microencapsulado de jugo de granada (*Punica granatum* L) para preparar bebidas u otros productos alimentarios con propiedades antioxidantes, hipertensivas, antiaterogénicas, antimicrobianas y de control en el síndrome metabólico", y número asignado 120_Betanzos_UAeH_DIP_DMC_GIDPPI_2016, del cual usted es el investigador responsable, tengo a bien solicitar la siguiente documentación faltante del paquete informativo de la Gestión Inicial Técnica:

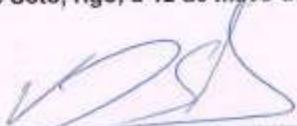
1. Anexos 2.2 (A,B,C o D) de cada uno de los participantes.
2. Firma del participante Javier Isaias Alanís Ortega en el documento 3.1 Anexo Declaración de investigación previa (GIT_GIDPPI_DMC_DIP_UAeH_2016).
3. Identificación oficial del participante Javier Isaias Alanís Ortega.
4. CD con paquete informativo (documentación firmada y escaneada en formato PDF).

Agradezco de antemano el envío de dicha documentación a la brevedad posible, con el fin de dar inicio a la Gestión Inicial Legal.

En caso de existir alguna duda, puede dirigirse con el responsable del Departamento de la Gestión Inicial Técnica: L.Q.A. Víctor Jesús Sánchez Ávila, con previa cita, la cual puede solicitar por vía telefónica 7172000 ext. 2911, o por vía electrónica a la dirección dmc_dip@uaeh.edu.mx:

Sin más por el momento, esperando su apreciable apoyo quedo a sus órdenes.

ATENTAMENTE
"Amor, Orden y Progreso"
Pachuca de Soto, Hgo; a 12 de mayo de 2016


L.Q.A. Víctor Jesús Sánchez Ávila
Responsable de la Gestión Inicial Técnica


V.B. L.A.E. Laura Carrasco Martínez
Sub Directora de Mercadeo de la Ciencia

C.c.p. Expediente DGI.T./DMC./DIP./DMC.
APPL/vjsa

Centro de Rectoría y Física
Carretera Pachuca-Atlaxcoatlán, Km. 4.5
Col. Camino de Tierra
Pachuca de Soto, Hidalgo, México, C.P. 42030
Teléfono: 55 (771) 71 720 00 Ext. 2911
dip@uaeh.edu.mx


www.uaeh.edu.mx

14.6 Profilaxis Post-Exposición

Tabla 10. Recomendación de Profilaxis Post-Exposición (PPE) al VIH de acuerdo con el tipo de lesión y el estado de infección de la fuente de exposición

Tipo de exposición	VIH positivo Clase 1*	VIH positivo Clase 2**	Fuente con estado desconocido para VIH•	Fuente desconocida••	VIH negativo
Gravedad mayor¹	PPE con dos ARV	PPE con 3 ARV	Generalmente no se indica PPE. Considerar PPE con 2 ARV si la fuente tiene factores de riesgo para VIH.♦	Generalmente no se indica PPE. Considerar PPE con 2 ARV en situaciones en que sea factible la exposición a pacientes VIH+.♦	PPE no justificada
			Generalmente no se indica PPE. Considerar PPE con 2 ARV si la fuente tiene factores de riesgo para VIH.♦	Generalmente no se indica PPE. Considerar PPE con 2 ARV en situaciones en que sea factible la exposición a pacientes VIH+.♦	
Gravedad menor²	PPE con tres ARV	PPE con 3 ARV	Generalmente no se indica PPE. Considerar PPE con 2 ARV si la fuente tiene factores de riesgo para VIH.♦	Generalmente no se indica PPE. Considerar PPE con 2 ARV en situaciones en que sea factible la exposición a pacientes VIH+.♦	PPE no justificada

*Infección por VIH asintomática o carga viral baja conocida (<1500copias/ml)

**Infección por VIH sintomática, SIDA, seroconversión aguda o carga viral elevada o desconocida.

•Por ejemplo: cadáver sin posibilidades de obtener muestras para serología de VIH.

••Por ejemplo: aguja de un contenedor de objetos punzocortantes.

1. Por ejemplo: pinchadura superficial con aguja sólida o herida superficial.

2. Por ejemplo: pinchadura profunda de aguja hueca amplia, punción profunda, sangre visible en el objeto usada en una arteria o vena del paciente.

•Si se ofrece y se administra la PPE y se determina después que la fuente es VIH-, la PPE deberá ser suspendida.

14.7 Carta de confidencialidad



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICION



Carta de confidencialidad y no divulgación de información

De un lado, los responsables técnicos **Maria Fernanda Resendiz Otero y Rodrigo Ronces Arrieta**, en nombre y representación de **Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo** y el **Instituto de Ciencias de la Salud**, con domicilio en Carr. Actopan-Tilcuautla s/n. Ex hacienda La Concepción. San Agustín Tlaxiaca, Pachuca, Hidalgo, México C.P. 42160, en adelante "LOS TÉCNICOS".

Y el otro, _____ (nombre del sujeto de investigación) con domicilio, _____

Por todo lo cual, las partes suscriben el presente Acuerdo,

CONDICIONES

PRIMERA.- OBJETO DEL ACUERDO

El objeto del presente Acuerdo es fijar los términos y condiciones bajo las cuales las partes mantendrán la confidencialidad de la información suministrada y creada entre ellas, así como fijar el tratamiento de los resultados que surjan fruto de la participación en la investigación: **Evaluación de la suplementación de un microencapsulado de jugo de granada roja sobre la capacidad antioxidante y estrés oxidativo en pacientes VIH+.**

SEGUNDA.- DURACIÓN

Este Acuerdo entrará en vigor en el momento en que el inicien los trabajos de investigación y finalizará una vez terminen los compromisos entre las partes, excepto la

obligación de confidencialidad que subsistirá por el tiempo que se determina en la cláusula tercera.

TERCERA.- CONFIDENCIALIDAD

1. Cualquier información intercambiada entre las partes será mantenida confidencial salvo que la parte que la proporcione de permiso para revelarla.
2. Si como consecuencia de los trabajos desarrollados por LOS TÉCNICOS se generasen resultados y LOS TÉCNICOS quisiese utilizarlos para su publicación, lectura en una tesis, o cualquier otra forma de difusión, el mismo deberá solicitar EL consentimiento expreso y por escrito para la utilización de los mismos.
3. Tras la participación de LOS TÉCNICOS en las actividades de investigación mencionadas, la confidencialidad referida se mantendrá.

CUARTA.- DERECHOS PREVIOS SOBRE LA INFORMACIÓN

Toda información puesta en común entre las partes es de propiedad exclusiva de la parte de donde proceda, y no es precisa la concesión de licencia para dicho intercambio. Ninguna de las partes utilizará información previa de la otra parte para su propio uso, salvo que se autorice lo contrario.

QUINTA.- ATRIBUCIÓN DE DERECHOS

LOS TÉCNICOS tienen todos los derechos sobre los resultados de la investigación que se generen como consecuencia de su actividad. LOS TÉCNICOS podrán publicar, divulgar o proteger dichos resultados mediante títulos de propiedad intelectual o bien mantenerlos en secreto.

SEXTA.- MODIFICACIÓN

Este acuerdo solo podrá ser modificado con el consentimiento expreso de ambas partes en documento escrito y mencionando la voluntad de las partes de modificar el presente acuerdo.

SÉPTIMA.- JURISDICCIÓN

Las partes se comprometen a resolver de manera amistosa cualquier desacuerdo que pueda surgir en el desarrollo del presente contrato.

Nombre y firma del paciente

Firma del responsable técnico
Rodrigo Ronces Arrieta

Firma del responsable técnico
Maria Fernanda Resendiz Otero

Fecha: / / 2016

Datos de contacto

L.N. Rodrigo Ronces Arrieta
rodrigoronarr@gmail.com

L.N. Maria Fernanda Resendiz Otero
mafernanda.resendiz@gmail.com

Laboratorio de Nutrigenómica, 4ta etapa, ICSa, UAEH, Carr. Actopan-Tilcuautla s/n. Ex hacienda La Concepción.
San Agustín Tlaxiaca, Pachuca, Hidalgo, México C.P. 42160.

14.8 Carta de declaración de no conflicto de interés



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICION



Carta de declaración de no conflicto de interés

Los abajo firmantes, autores del proyecto **Evaluación de la suplementación de un microencapsulado de jugo de granada roja sobre la capacidad antioxidante y estrés oxidativo en pacientes VIH+**, el investigador responsable y creador del producto con patente en proceso declaramos no tener ningún tipo de conflicto de interés, ninguna relación económica, personal, política, interés financiero que pueda influir en nuestro juicio. Declaramos, además, no haber recibido ningún tipo de beneficio económico con fines de lucro para la ejecución del proyecto.

Responsable Técnico del proyecto y creador del
producto con patente proceso
Dr. Gabriel Betanzos Cabrera

Firma del responsable técnico
Rodrigo Ronces Arrieta

Firma del responsable técnico
María Fernanda Resendiz Otero

Fecha: 02 / 08 / 2016

Datos de contacto

Rodrigo Ronces Arrieta
rodrigoronarr@gmail.com

María Fernanda Resendiz Otero
mafernanda.resendiz@gmail.com

Laboratorio de Nutrigenómica, 4ta etapa, ICSa, UAEH, Carr. Actopan-Tilcuautla s/n. Ex hacienda La Concepción.
San Agustín Tlaxiaca, Pachuca, Hidalgo, México C.P. 42160.