

**Universidad Autónoma de Baja California
Facultad de Medicina Mexicali**



“Marcadores de estrés oxidativo y su relación con las complicaciones microvasculares en pacientes con diabetes mellitus tipo 2”

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN
CIENCIAS DE LA SALUD**

PRESENTA

JAVIER DE JESÚS VASCONCELOS ULLOA

DIRECTOR DE TESIS

DR. EN C. RAÚL DÍAZ MOLINA

MEXICALI, B.C.

ABRIL DE 2018

Universidad Autónoma de Baja California

Facultad de Medicina Mexicali

“Marcadores de estrés oxidativo y su relación con las complicaciones microvasculares en pacientes con diabetes mellitus tipo 2”

Autor de la tesis

Ing. en Biotecnología Javier de Jesús Vasconcelos Ulloa

Universidad Autónoma de Baja California
Mexicali, Baja California

Tutor y Director de Tesis

Dr. en C. Raúl Díaz Molina

Coordinador de Posgrado e Investigación
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Baja California
Mexicali, Baja California

Asesor

Dra. Josefina Ruiz Esparza Cisneros

Facultad de Medicina Mexicali
Universidad Autónoma de Baja California
Mexicali, Baja California

Asesor

Médico Julio Alberto Robledo Vázquez

Clínica de Medicina Familiar, ISSSTE
Mesa de Otay, Tijuana, Baja California

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE MEDICINA MEXICALI

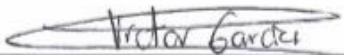
Mexicali, Baja California, a 20 de Abril de 2018.

Los abajo firmantes, miembros del Jurado Dictaminador del documento escrito denominado: ***Marcadores de estrés oxidativo y su relación con las complicaciones microvasculares en pacientes con diabetes mellitus tipo 2***, que para obtener el GRADO de MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD presenta ***Javier de Jesús Vasconcelos Ulloa***.

Realizada la evaluación resolvimos: Aprobar el documento



Dr. Raul Díaz Molina
Presidente



Dr. Victor Guadalupe García González
Secretario



Dr. José Gustavo Vázquez Jiménez
Sinodal



Dr. Iván Córdova Guerrero
Sinodal

Índice

Dedicatoria	7
Agradecimientos	8
Abreviaturas	10
Lista de tablas y figuras	13
Resumen	15
1. Introducción	16
2. Marco teórico	19
2.1 Diabetes mellitus tipo 2	19
2.1.1 Definición	19
2.1.2 Prevalencia	20
2.1.3 Diagnóstico	22
2.1.4 Factores de riesgo	22
2.2 Complicaciones microvasculares	23
2.2.1 Retinopatía diabética	23
2.2.2 Neuropatía diabética	24
2.2.3 Nefropatía diabética	26
2.3 Estrés oxidativo	29
2.3.1 Defensa antioxidante	30
2.3.2 Radicales libres	31
2.4 Marcadores de estrés oxidativo	32
2.4.1 Malondialdehído (MDA)	32

2.4.2	Productos avanzados de oxidación de proteínas (PAOP)	33
2.4.3	Óxido nítrico (NO)	35
2.4.4	Capacidad antioxidante total (CAT)	36
2.4.5	Capacidad oxidante total (COT)	37
2.4.6	Índice de estrés oxidativo (IEO)	38
3.	Antecedentes	39
4.	Planteamiento del problema	43
4.1	Pregunta de investigación	45
5.	Justificación	46
6.	Objetivos	48
6.1	Objetivo general	48
6.2	Objetivos específicos	48
7.	Hipótesis	49
7.1	Hipótesis de investigación	49
7.1.1	Hipótesis nula	49
8.	Metodología	50
8.1	Tipo de estudio	50
8.1.1	Universo de estudio	50
8.2	Criterios de selección	50
8.2.1	Criterios de inclusión	50
8.2.2	Criterios de exclusión	51
8.2.3	Criterios de eliminación	51
8.3	Cálculo del tamaño de muestra	51

8.4 Formación de grupos de estudio	52
8.4.1 Grupo control	52
8.4.2 Grupos de pacientes con diabetes mellitus tipo 2	52
8.5 Variables	53
8.5.1 Variables independientes	53
8.5.2 Variables dependientes	54
8.6 Identificación de las complicaciones microvasculares	57
8.7 Medición de parámetros antropométricos	57
8.8 Obtención de muestras de suero y plasma sanguíneo	58
8.9 Cuantificación de parámetros bioquímicos	59
8.10 Cuantificación de marcadores de estrés oxidativo	59
8.11 Análisis estadístico	60
9. Aspectos éticos, normativos y de seguridad	61
10. Resultados	62
11. Discusión	70
12. Conclusiones	75
Referencias bibliográficas	76
Anexos	85
Anexo 1 Carta de Consentimiento informado	86
Anexo 2 Hoja de datos del voluntario	90

DEDICATORIA

A las personas que apoyaron esta etapa de mi vida, aquellos que me dieron la fuerza para seguir adelante mediante sus consejos y enseñanzas.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres que han estado siempre en mi camino, siendo un apoyo incondicional, admiro el sacrificio y trabajo que han desempeñado en mi formación.

A mis hermanos por compartir experiencias y buenos momentos a su lado, su compañía me ha permitido valorar lo que tengo en mi vida.

A Ana Aramburo por a verme apoyado durante toda esta etapa, en los momentos buenos y malos, por todas las acciones y palabras de aliento que recibí en favor de que realizara mis objetivos, fuiste un impulso que siempre me mantuvo concentrado y motivado a cumplir mis metas.

A mi tutor el Dr. Raúl Díaz Molina por ser un excelente guía, siendo un ejemplo de conocimiento y humildad, su paciencia y enseñanzas han logrado motivarme y conducir mis propósitos de una manera más clara, le agradezco enormemente todo su tiempo, atenciones y confianza.

A mi Tío Oscar por sus consejos, enseñanzas, además de su gran y única calidad humana que me ha orientado en muchos momentos.

A mi Tíos Gloria y Ramón por su ayuda y comprensión, fue en un punto determinante y me permitió continuar con mis planes, siempre les estaré agradecido.

A mi tío Antonio por su manera enérgica y jovial de apoyar este proceso, haciéndolo que fuera más sencillo, brindando apoyo de cualquier manera.

A Dr. Julio Robledo su ayuda fue un factor esencial para la culminación de esta investigación, sus ganas de contribuir a la investigación y gran carisma son sellos que formaran parte del presente trabajo.

A la Dra. Josefina Ruíz por su apoyo en mi proyecto desde el comienzo, además de su gran ayuda durante el análisis estadístico.

A Dr. Víctor García por mostrar amabilidad y ser servicial en cualquier requerimiento que se presentara, su conocimiento me permitió ver más aspectos de mi investigación.

A Dr. Gustavo Vásquez por su gran disposición a aportar y enriquecer mi trabajo, motivándome a continuar con la investigación.

A Dr. Iván Córdoba por siempre mostrar disponibilidad y sus valiosas observaciones durante el desarrollo del trabajo.

A Q.F.B Alonso Paredes por su ayuda durante la etapa experimental del proyecto, además de su gran compañerismo, logrando crear un buen equipo de trabajo.

Al médico pasante Ariel Rangel por su ayuda durante el reclutamiento de pacientes, su disposición y cortesía me ayudaron mucho durante esta etapa.

A M.C Martha García por ser la persona que es, su amabilidad, apoyo y comprensión fueron puntos muy positivos que formaron parte de esta experiencia.

A M.C Ángel Pulido por a ver sido un excelente compañero durante la maestría, sus consejos de trabajo, además de siempre mostrar una buena disposición para ayudar.

A mis compañeras médicas pasantes Marisela del Rayo y Lizeth Gutiérrez por formar parte de esta etapa siempre mostrando apoyo y buenos deseos para lograr mi objetivo.

A mis amigos por amenizar mis días, motivándome con su calidez a seguir con mis proyectos hasta el final.

A La Universidad Autónoma de Baja California (UABC) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por a verme dado las facilidades y apoyo para poder desempeñar mis estudios.

ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
8-OhdG	8-hidroxi-2-desoxiguanosina
ADA	American Dietetic Association
ADN	Ácido desoxirribonucleico
CAT	Capacidad antioxidante total
COT	Capacidad oxidante total
DCCT	Diabetes Control and Complication Trial
DG	Diabetes gestacional
DGA	Diacylglicerol
DM	Diabetes mellitus
DMT1	Diabetes mellitus tipo 1
DMT2	Diabetes mellitus tipo 2
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
EROS	Especies reactivas de oxígeno
FID	Federación Internacional de Diabetes
GFTA	Glutamina-fructosa-6-fosfato-amidotransferasa
GLU	Glucosa
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
Gpx	Glutación peroxidasa
HbA1c	Hemoglobina glucosilada

IEO	Índice de estrés oxidativo
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de masa corporal
iNOS	Inducible óxido nítrico sintasa
LDL-C	Lipoproteína de baja densidad
MDA	Malondialdehído
Mg	Miligramos
MNSI	Michigan Neuropathy Screening Instrument
MPO	Mieloperoxidasa
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
ND	Nefropatía diabética
NGSP	National Glicohemoglobin Standarized Program
Nm	Nanómetros
NOS	Óxido nítrico sintasa
PAOP	Productos avanzados de oxidación de proteínas
PCO	Proteínas carboniladas
PGA	Productos de glicación avanzada
pH	Potencial de hidrógeno
PKC	Proeinas kinasa C
PON1	Paraoxonasa 1
RDNP	Retinopatía diabética no proliferativa
RDP	Retinopatía diabética proliferativa
SNP	Polimorfismo de nucleótido simple

SOD	Superóxido dismutasa
TA	Tensión arterial
TFG	Tasa de filtración glomerular
TG	Triglicéridos
T-SH	Tioles
UDP	Uridina difosfato

LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS	Página
Tabla 1. Los diez países con mayor número de adultos diabéticos.....	21
Tabla 2. Países con mayor proyección de personas diabéticas para el año 2040.....	21
Tabla 3. Interpretación de los resultados del método de velocidad de filtrado glomerular.....	28
Tabla 4. Datos demográficos y bioquímicos de pacientes y controles.....	62
Tabla 5. Parámetros de estrés oxidativo en pacientes y controles.....	63
Tabla 6. Datos demográficos y bioquímicos en pacientes diabéticos agrupados por número de complicaciones microvasculares.....	64
Tabla 7. Parámetros de estrés oxidativo en pacientes diabéticos agrupados por número de complicaciones microvasculares.....	66
Tabla 8. Comparación de los datos de estrés oxidativo entre pacientes diabéticos agrupados por número de complicaciones microvasculares.	67
Tabla 9. Prueba de correlación de Pearson en pacientes diabéticos agrupados por número de complicaciones microvasculares.....	68
Tabla 10. Distribución de los pacientes diabéticos con base en el tratamiento farmacológico y número de complicaciones microvasculares.....	69

FIGURAS

Página

Figura 1. Aspectos fisiológicos de la secreción de insulina entre un sujeto sano y uno con resistencia a la insulina (RI).....	19
Figura 2. Complejo formado por el MDA con dos moléculas de 1-metil-2-fenilindol	33
Figura 3. Entrecruzamiento de ditirosinas en los productos avanzados de la oxidación de proteínas	34
Figura 4. Método de Greiss para la determinación sérica de óxido nítrico (NO) ..	35
Figura 5. Reacciones de oxidación y reducción en la molécula de ABTS	37
Figura 6. Perfil lipídico en pacientes diabéticos y grupo control	65
Figura 7. Concentración de glucosa y hemoglobina glucosilada en pacientes diabéticos y grupo control	65

RESUMEN

Introducción: La diabetes mellitus (DM) se define como una alteración metabólica que deriva en un estado de hiperglucemia crónica. Existen antecedentes sólidos que describen la relación existente entre la hiperglucemia y el estrés oxidativo, el cual se define como un desbalance generado a partir de un incremento en la producción de radicales libres y una disminución en la defensa antioxidante en el organismo. **Objetivo:** Comparar las concentraciones séricas de marcadores de estrés oxidativo en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) con y sin complicaciones microvasculares. **Metodología:** Ensayo clínico, transversal, comparativo y correlacional. Se incluyeron 42 pacientes con DMT2 y 14 sujetos aparentemente sanos (grupo control). Los sujetos diabéticos fueron agrupados con base en el número de complicaciones microvasculares que presentaron. A todos se les realizaron determinaciones antropométricas y cuantificación sérica de parámetros bioquímicos y de estrés oxidativo. Para la búsqueda de diferencias entre grupos se compararon los datos a través de una ANOVA de un factor y prueba de Tukey para datos con distribución normal; y se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney o Kruskal Wallis para datos con distribución no normal. Se realizó un análisis de correlación con el método de Pearson. **Resultados:** Los datos antropométricos y los parámetros bioquímicos de los pacientes diabéticos y controles mostraron diferencia significativa en el índice de masa corporal (IMC), glucosa, triglicéridos, LDL-Colesterol, VLDL-Colesterol y hemoglobina glucosilada; mientras que en relación con los parámetros de estrés oxidativo se encontró diferencia significativa en malondialdehído (MDA), productos avanzados de la oxidación de proteínas (PAOP), óxido nítrico (NO), capacidad antioxidante total (CAT) e índice de estrés oxidativo (IEO). La comparación entre los pacientes diabéticos agrupados por número de complicaciones microvasculares mostró diferencia significativa en el IMC, glucosa, triglicéridos, VLDL-Colesterol y hemoglobina glucosilada. Al comparar los pacientes diabéticos sin complicaciones contra los pacientes con una o dos complicaciones microvasculares se encontró diferencia significativa en la variable CAT. La prueba de correlación de Pearson arrojó una correlación positiva entre MDA y PAOP, entre NO con las variables de glucosa, triglicéridos y CAT; mientras que CAT mostró una correlación negativa con el HDL-Colesterol. **Conclusiones:** El MDA y PAOP pueden ser marcadores útiles para el seguimiento del estado oxidante de nuestros pacientes diabéticos. Por otro lado, ninguno de los marcadores incluidos en el estudio resulta útil para monitorear la progresión en el número de complicaciones microvasculares en estos pacientes.

1. INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) es un desorden metabólico con una etiología múltiple que deriva en una hiperglucemia crónica, generando problemas en el metabolismo de los carbohidratos, proteínas y lípidos; afectando la secreción de insulina y/o su mecanismo de acción. Los efectos de dicha enfermedad pueden traer consigo a largo plazo, complicaciones que derivan en disfunciones o fallas en diversos órganos [1].

La diabetes se clasifica con base en el mecanismo que provoca el estado de hiperglicemia en el paciente. La diabetes mellitus tipo 1 (DMT1), es ocasionada por una destrucción autoinmunitaria de las células β del páncreas, lo que generalmente desencadena una pérdida absoluta de la capacidad de generar insulina, su prevalencia es de 5-10% en la población mundial de diabéticos. Por otro lado, la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), con una prevalencia en el contexto mundial del 90-95% en la población diabética, está asociada a una pérdida progresiva en la capacidad para producir insulina o a un incremento en la resistencia a ésta. La diabetes gestacional (DG) es aquella que es diagnosticada en el segundo o tercer trimestre del embarazo, en pacientes que no eran diabéticas antes de la gestación. Por último tenemos distintos tipos de diabetes asociados a otras causas como síndromes de diabetes monogénica, enfermedades del páncreas exocrino y diabetes inducida por medicamentos (por ejemplo glucocorticoides, antiretrovirales) [2,3].

La fisiopatología de la diabetes describe cómo intervienen diversos tejidos del organismo, entre ellos el páncreas, hígado, músculo esquelético, tejido adiposo y el sistema nervioso, en la generación de alteraciones en el metabolismo de la glucosa, lo que termina por desarrollar la DMT2. El síndrome metabólico y la obesidad son dos factores altamente vinculados al desarrollo de la DMT2, debido a que el almacenamiento de grasa intra-abdominal se ha asociado con diversos efectos tóxicos en tejido pancreático, hepático y muscular; asimismo, la secreción de algunas adipocinas tiene relación con la disminución de la acción y secreción de la insulina [4].

La insulina es una hormona que participa en la regulación de los niveles de glucosa en sangre, además de controlar el almacenamiento y liberación de energía en el organismo. Es secretada por las células β en los islotes de Langerhans, y participa de manera importante en la regulación del metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas [5].

El estilo de vida es un factor importante en el desarrollo de la DMT2, estudios como el reportado por Tuomilehto et al. muestran que con un control de la alimentación a través de la reducción de la ingesta de lípidos, el incremento de la ingesta de fibra, así como el desarrollo de actividad física de manera moderada, disminuye el riesgo de padecer DMT2 [6].

La Federación Internacional de Diabetes (FID) en 2015 presentó una prevalencia mundial de 415 millones de personas con este padecimiento, afirmando que 1 de cada 11 adultos en el mundo poseen dicha enfermedad, pronosticando para el año 2040 un incremento a 642 millones [7]. En nuestro país en el año 2015 se estimó que esta enfermedad presenta una de las mayores prevalencias con un 12.6% [8].

Una de las mayores problemáticas de esta enfermedad es que condiciona al paciente a desarrollar complicaciones crónicas, las cuales se clasifican en microvasculares (retinopatía, nefropatía y neuropatía) y macrovasculares (cardiopatía isquémica, insuficiencia cardíaca, enfermedad vascular cerebral, insuficiencia arterial periférica, amputaciones de miembros inferiores, ceguera e insuficiencia renal), las cuales representan serios problemas y afectan de manera importante la calidad de vida del paciente diabético [9,10].

El estado hiperglucémico característico del paciente diabético muestra una directa relación con el estrés oxidativo, lo cual ha sido evidenciado a través de diversos estudios en los que se demuestra un incremento de especies reactivas de oxígeno (EROS) en el paciente diabético, lo que propicia un fallo a nivel celular en diversos tejidos [11].

El estrés oxidativo se define como un desbalance en el organismo generado a partir de un incremento en la producción de EROs y una disminución en la defensa

antioxidante, dando como resultado daño a biomoléculas esenciales tales como proteínas, lípidos y ADN. Las EROs incluyen moléculas que son generadas como parte del mismo metabolismo celular, tal como la respiración celular o el sistema de defensa inmunitario. Algunos ejemplos de EROs son el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo ($\cdot OH$), el óxido nítrico (NO) y el peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$) [12]. Estas moléculas se caracterizan por poseer electrones desapareados en su último nivel energético, lo que les confiere una alta inestabilidad y reactividad frente a biomoléculas generando daños que condicionan el desarrollo de diversas patologías o la generación de complicaciones en éstas [13, 14]. Tal es el caso de la diabetes mellitus tipo 2 en donde se ha demostrado una asociación entre el estado hiperglicémico y el estrés oxidativo.

Por otro lado, los antioxidantes son sustancias que tienen la capacidad de reaccionar con las EROs inactivándolas y evitando así que se genere un desbalance oxidativo, protegiendo de una potencial oxidación a biomoléculas como las proteínas, lípidos de membrana y ADN. Los antioxidantes se clasifican en enzimáticos y no enzimáticos. Ejemplos de antioxidantes enzimáticos son la superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa (GPx); por otro lado, entre los antioxidantes no enzimáticos podemos mencionar el α -tocoferol (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), β -caroteno, ácido lipoico, glutatión y bilirrubina entre otros [15,16].

En el presente estudio se compararon las concentraciones séricas de marcadores de estrés oxidativo en pacientes con DMT2 con y sin complicaciones microvasculares, con la finalidad de identificar aquellos marcadores que permitan un mejor seguimiento de los pacientes con esta patología.

2. MARCO TEORICO

2.1 Diabetes mellitus tipo 2

2.1.1 Definición

La diabetes mellitus (DM) es un desorden metabólico con una etiología múltiple que deriva en una hiperglucemia crónica, generando problemas en el metabolismo de los carbohidratos, proteínas y lípidos [1].

Esta enfermedad es derivada de la combinación de la resistencia a la acción de la insulina como se observa en la Figura 1 y una respuesta inadecuada a la acción secretora de la misma, este padecimiento genera un grado de hiperglucemia suficiente para causar cambios patológicos y funcionales en varios tejidos diana [17].

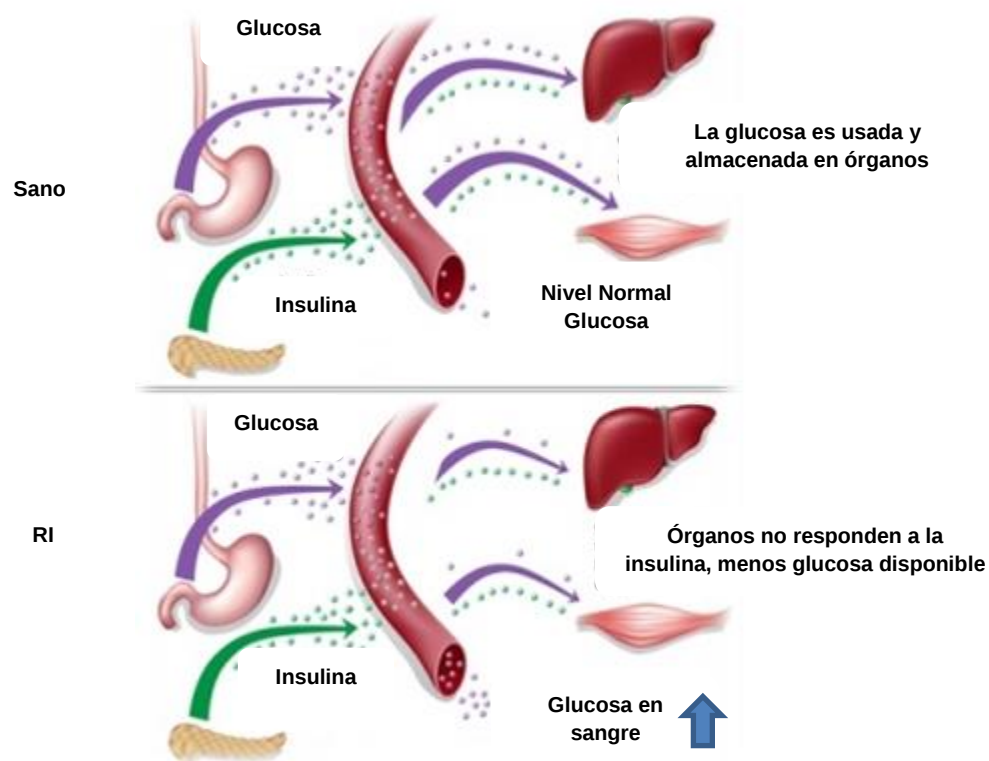


Figura 1. Aspectos fisiológicos de la secreción de insulina entre un sujeto sano y uno con resistencia a la insulina (RI) [18].

En virtud de que la diabetes mellitus tipo 2 es una patología que inicia y se desarrolla de manera gradual y sin síntomas importantes en etapas tempranas de la enfermedad, ésta suele diagnosticarse en etapas avanzadas. El paciente con DMT2 desarrolla una secreción deficiente de insulina, que sumado a la resistencia a la insulina representada en la Figura1, genera un estado de hiperglucemia.

La resistencia a la insulina puede mejorar con la modificación del estilo de vida del individuo, incluyendo principalmente una modificación en la dieta y actividad física, así como con un tratamiento farmacológico para la hiperglicemia [3].

2.1.2 Prevalencia

Según la FID la diabetes tuvo una prevalencia de 415 millones en el año 2015, esperando que dicha cifra se incremente hasta los 642 millones a nivel mundial en el 2040.

En el 2015 la distribución de la enfermedad por género fue de 215.2 millones de hombres y 199.5 millones de mujeres; estimándose que para el 2040 esta distribución será de 328.4 millones de hombres y 313.3 millones de mujeres.

En la región de Norte América y el Caribe, de la población total de adultos, se tiene un 12.9% de sujetos con diabetes, lo que representa uno de los mayores niveles de afectación con respecto a las otras regiones en el mundo, con 44.3 millones de pacientes diabéticos entre la edad de 20-79 años, estimándose para el 2040 un incremento a 14.7% en la prevalencia de esta enfermedad, pudiendo llegar a 60.5 millones de personas con diabetes en dicha región [7].

Por otro lado, nuestro país ocupa el sexto lugar a nivel mundial de adultos con diabetes como se observa en la Tabla 1, estimándose un total de 11.5 millones de personas con la enfermedad.

Tabla 1. Los diez países con mayor número de adultos diabéticos [7].

Posición	País	Millones de habitantes
1	China	109.6
2	India	69.2
3	EUA	29.3
4	Brasil	14.3
5	Rusia	12.1
6	México	11.5
7	Indonesia	10
8	Egipto	7.8
9	Japón	7.2
10	Bangladesh	7.1

En la Tabla 2 se muestra una estimación de personas diabéticas para el año 2040, donde México se coloca en el quinto lugar de población con diabetes en el mundo con un total de 20.6 millones de habitantes aproximadamente con la enfermedad [7].

Tabla 2. Países con mayor proyección de personas diabéticas para el año 2040 [7].

Posición	País	Millones de habitantes
1	China	150.7
2	India	123.5
3	EUA	35.1
4	Brasil	23.3
5	México	20.6
6	Indonesia	16.2
7	Egipto	15.1
8	Pakistán	14.4
9	Bangladesh	13.6
10	Rusia	12.4

2.1.3 Diagnóstico

Según los criterios de la ADA 2018, el diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2 se establece con cualquiera de las siguientes condiciones:

- Glucemia plasmática en ayunas ≥ 126 mg/dL. Confirmado mediante una segunda determinación preferentemente con la misma prueba y en días diferentes.
- Glucemia plasmática a las dos horas después de la prueba de tolerancia oral a la glucosa (con 75 g de glucosa) ≥ 200 mg/dL. Confirmado mediante una segunda determinación preferentemente con la misma prueba y en días diferentes.
- Glucemia plasmática ≥ 200 mg/dL en pacientes con síntomas clásicos de hiperglucemia o crisis de hiperglucemia.
- Hemoglobina glucosilada ≥ 6.5 %. La prueba debe realizarse en un laboratorio que use un método certificado por el National Glicohemoglobin Standardized Program (NGSP) y estandarizado según el ensayo Diabetes Control and Complication Trial (DCCT) [7].

2.1.4 Factores de riesgo para desarrollar DMT2

Algunos factores que son considerados como riesgo para el desarrollo de la DMT2 son la edad, dieta, obesidad y falta de actividad física [19]. La nutrición es un aspecto esencial para prevenir el desarrollo de DMT2, es importante tener un control adecuado sobre la ingesta calórica y optar por formas que permitan mejorar el estado nutricional y el estilo de vida del individuo. [20].

La actividad física de intensidad moderada ha mostrado tener efectos beneficiosos en pacientes prediabéticos, mejorando su sensibilidad a la insulina y favoreciendo la disminución de grasa abdominal, lo que implica una disminución en el riesgo de desarrollar DMT2. En este sentido, se recomienda un plan de actividad física moderado (150 minutos semanales) para lograr efectos benéficos [7].

En relación con el uso de medicamentos se sabe que algunos fármacos como los glucocorticoides, diuréticos tiazídicos y antipsicóticos atípicos, son considerados como de riesgo para el desarrollo de la enfermedad [7].

Los factores genéticos también son un importante punto a considerar como factor de riesgo. Se ha encontrado que el polimorfismo de nucleótido simple (SNP) Thr130Ile del gen HNF4A se asocia al desarrollo de la DMT2 y DG en la población Mexicana. Este gen codifica para un receptor de hormonas esteroideas expresado en hígado, páncreas, riñón, intestino y otros tejidos. La expresión del gen HNF4A en las células hepáticas y β -pancreáticas es de particular interés debido a que en el hígado codifica para un receptor de glucocorticoides los cuales estimulan la gluconeogénesis hepática, mientras que en las células β -pancreáticas regula la expresión de genes que codifican para proteínas implicadas en el transporte y metabolismo de la glucosa [21].

2.2 Complicaciones microvasculares de la DMT2

2.2.1 Retinopatía diabética

La retinopatía diabética es una enfermedad crónica progresiva, que pone en riesgo la microvasculatura retiniana siendo una de las más comunes complicaciones microvasculares de la diabetes mellitus 2. Esta se encuentra relacionada con la duración y severidad del estado de hiperglicemia, así como con la presencia de hipertensión [10]. El daño de los vasos sanguíneos de la retina puede tener como resultado que éstos sufran una fuga de fluido o sangre. Si la enfermedad avanza se forman nuevos vasos sanguíneos y prolifera el tejido fibroso en la retina, lo que tiene como consecuencia que la visión se deteriore.

Existen dos tipos de retinopatía diabética:

De fondo o retinopatía diabética no proliferativa (RDNP). Este tipo de afectación es la etapa más temprana de la retinopatía diabética. Cuando se presenta esta condición, los vasos sanguíneos deteriorados permiten un escape de fluidos de sangre dentro del ojo.

Retinopatía diabética proliferativa (RDP). Este tipo de retinopatía sucede principalmente cuando muchos de los vasos sanguíneos de la retina se tapan, impidiendo un flujo suficiente de la sangre. En un intento de suministrar sangre a la zona donde los vasos originales se han tapado, la retina responde creando nuevos vasos sanguíneos. Este proceso se llama neovascularización. Sin embargo, los nuevos vasos sanguíneos también son anormales y no proporcionan a la retina el flujo sanguíneo adecuado [22].

El edema macular y la retinopatía diabética se detectan al hacerse un examen de la vista. Los parámetros que se buscan en la retina como señales de la enfermedad son [23]:

- Vasos sanguíneos que gotean.
- Inflamación de la retina (edema macular).
- Depósitos pálidos y grasosos en la retina, que son señales de que los vasos sanguíneos están goteando.
- Tejido del nervio dañado.

La actividad de la enzima aldosa reductasa es uno de los factores que pueden contribuir al desarrollo de la retinopatía diabética, debido a que al activar la vía de poliol se propicia la formación de sorbitol debido a la gran cantidad de glucosa presente, lo cual deriva en una acumulación de sorbitol y con ello una contribución al estrés osmótico en la células que conllevan a un daño a nivel microvascular [24].

2.2.2 Neuropatía diabética

La neuropatía diabética se define como la presencia de síntomas y/o signos de disfunción del nervio periférico en personas diabéticas, una vez excluidos otros casos asociados. El riesgo de desarrollo de neuropatía diabética es directamente proporcional tanto a la duración como a la magnitud de la hiperglucemia. Además, algunas personas también pueden poseer factores genéticos que influyen en su predisposición a desarrollar tales complicaciones [25]. Los problemas de los

nervios pueden presentarse en cualquier sistema de órganos, incluidos el tracto digestivo, el corazón y los órganos sexuales.

La neuropatía diabética se clasifica en periférica, autónoma, proximal o focal. Cada una afecta de varias maneras a diferentes partes del organismo.

- La neuropatía periférica, el tipo más común de neuropatía diabética, causa dolor o pérdida de sensación en los dedos del pie, en los pies, las piernas, las manos y los brazos.
- La neuropatía autónoma causa cambios en funciones digestivas, intestinales y vesicales, en la respuesta sexual y en la transpiración. También puede afectar los nervios asociados con el corazón y aquellos que controlan la presión arterial, así como los nervios en los pulmones y los ojos.
- La neuropatía proximal causa dolor en los muslos, caderas o glúteos y produce debilidad en las piernas.
- La neuropatía focal ocasiona el debilitamiento repentino de un nervio o un grupo de nervios, causando debilidad muscular o dolor. Cualquier nervio en el cuerpo puede verse afectado [26].

La neuropatía se diagnostica con base en los síntomas y el examen físico. Durante este examen, el médico puede medir la presión arterial, el ritmo cardíaco, la fuerza muscular, los reflejos y la sensibilidad a los cambios de postura, la vibración, la temperatura o el tacto leve.

Existen herramientas como el Instrumento para la Detección de Neuropatía de Michigan (MNSI), el cual es utilizado para diagnosticar la neuropatía periférica simétrica distal en pacientes con diabetes. El MNSI consiste en un cuestionario de 15 preguntas que se califica sumando respuestas anormales, y un examen de las extremidades inferiores que incluye la inspección y evaluación de la sensibilidad vibratoria y los reflejos del tobillo, asignándose puntos por hallazgos anormales [27].

En el estudio llevado a cabo por Qian et al., cuyo su objetivo fue evaluar la eficacia de distintas pruebas para el diagnóstico de la neuropatía diabética, encontró que la prueba de MNSI obtuvo los valores más elevados de sensibilidad (70.2%), especificidad (98.7%) y precisión (80.2%). Con base en esto, dicho instrumento se considera una prueba simple, no invasiva y válida para el diagnóstico de la neuropatía diabética periférica [28]. El estándar de oro para la determinación de la neuropatía diabética es el estudio de conducción nerviosa o electromiografía, el cual permite determinar el tipo y la gravedad del daño nervioso. Los estudios de conducción nerviosa verifican la transmisión de señales eléctricas a través de un nervio. La electromiografía determina qué tan bien responden los músculos a las señales eléctricas transmitidas por los nervios cercanos.

Los expertos recomiendan que las personas con diabetes se hagan un examen cuidadoso de los pies todos los años para descartar neuropatía periférica, y que las personas con un diagnóstico positivo para este tipo de neuropatía deben examinarse los pies con más frecuencia para evaluar la evolución de la enfermedad [26].

2.2.3 Nefropatía diabética

La nefropatía diabética (ND) se caracteriza por un aumento en la excreción urinaria de albúmina en ausencia de otras enfermedades renales. Es la principal complicación microvascular que puede conducir a una falla renal tanto en la diabetes mellitus tipo 1 como en la tipo 2 (DM 2), afectando a aproximadamente el 30 a 40% de los pacientes adultos portadores de esta enfermedad [10].

A pesar de que se reconoce que la hiperglucemia es una condición necesaria para el desarrollo de la ND, continuamos sin conocer completamente los mecanismos por los cuales la hiperglucemia conduce a la lesión renal, sin embargo, se sabe con certeza de la participación de diversos procesos que influyen para iniciar los cambios funcionales y estructurales a nivel renal que van a conducir a una modificación de la hemodinámica corpuscular y a la estimulación de procesos de proliferación e hipertrofia celulares.

Las manifestaciones clínicas de la ND que incluyen los niveles incrementados de excreción urinaria de albúmina, aumento en los niveles de presión arterial y la caída de la tasa de filtración glomerular están estrechamente asociadas con las anomalías estructurales de la ND [29].

En la clínica los parámetros que nos permiten identificar la presencia de la ND son principalmente la fuga de albúmina medida como micro o macroalbuminuria, de esta manera, el diagnóstico de nefropatía incipiente se realiza si hay 2 de 3 determinaciones positivas en el transcurso de 3 a 6 meses. Datos más importantes para confirmar esta complicación microvascular es la persistencia de la albuminuria. En los últimos años se ha dado mayor importancia a la relación albúmina/creatinina, cuya medición puede realizarse en muestras de la primera orina de la mañana, o de 12 horas nocturnas o diurnas. Otros parámetros que permiten evaluar la intensidad del daño es la estimación de la tasa de filtración glomerular con alguna de las fórmulas ideadas para tal fin como el método de Cockcroft-Gault que toma en cuenta el peso, edad en años, género y creatinina sérica. Otra clasificación de etapas de insuficiencia renal en base al deterioro de la tasa de filtración glomerular, la Tabla 3 proporciona la interpretación de los resultados. La fórmula varía según el género del paciente si se aplica en el género masculino, sería desarrollada de la siguiente manera: $\text{Hombre } (140 \text{ Edad}) \times \text{peso (Kg)} / (72 \times \text{creatinina sérica})$. En el caso femenino la manera es la siguiente: Multiplicar el resultado calculado usando la fórmula para hombres $\times 0.85$ [30].

Tabla 3. Interpretación de los resultados del método de velocidad de filtrado glomerular. Para diagnóstico del paciente con nefropatía diabética.

Etapa	Alteración	TFG mL/min por 1.73 m ²
1	Daño renal (DR) con función normal	> 95
2	DR con disminución leve de función	60-89
3	DR con disminución moderada de función	30-59
4	DR con disminución severa de función	15-20
5	Insuficiencia renal	< 15 (o diálisis)

Como se ha mencionado anteriormente el daño llevado a cabo en los diferentes tejidos (retina, riñón y nervios) del individuo afectado por el estado de hiperglicemia del paciente con DMT2 se explica por la activación de diversas vías metabólicas que traen consigo el desarrollo de las complicaciones microvasculares, como es el caso de la vía del poliol, la vía de las hexosaminasas, vía de las proteínas kinasas C (PKC) y la formación de los productos de glicosilación avanzada.

La vía del poliol se activa cuando hay una concentración elevada de glucosa. En este caso la glucosa se transforma en sorbitol por la enzima aldosa reductasa, el cual finalmente es oxidado a fructosa por la enzima sorbitol deshidrogenasa. Uno de los puntos principales por los cuales este proceso genera daño es debido a que la aldosa reductasa requiere el uso de NADPH, depletando los niveles de esta coenzima, lo que implica que algunas enzimas antioxidantes que requieren de NADPH también se vean disminuidas en su actividad, como la glutatión reductasa, con la consecuente falta de regeneración del glutatión reducido, originando como consecuencia un desbalance antioxidante en el organismo, lo cual conduce a un mayor estado de estrés oxidativo en el paciente [31].

Otro de los problemas asociados a la elevación de la glucosa intracelular es la activación de la vías de las hexosaminasas, la cual inicia una vez que se genera un exceso de fructosa 6 fosfato, esta molécula se convierte en sustrato de la enzima GFTA (glutamina-fructosa-6-fosfato amidotransferasa) formando

glucosamina-6-fosfato y finalmente a UDP (uridin-difosfato) N-acetil-glucosamina. La problemática se desencadena una vez que la N-acetil glucosamina toma los residuos serina y treonina de algunas proteínas citoplasmáticas y nucleares generando modificaciones postraduccionales lo cual deriva en cambios en ciertos factores de transcripción, resultando en cambios patológicos en la expresión genética [32].

La activación de la vía de las proteínas kinasas C (PKC) se debe al aumento de glucosa dentro de la célula, incrementando la síntesis de diacilglicerol (DAG), este factor es un activador de las distintas isoformas de las PKCs, esto resulta en diferentes expresiones génicas. Inhibiendo moléculas como la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) y promoviendo el vasoconstrictor endotelina-1 (ET1) [33].

Otro punto de importancia entre los mecanismo de daño por un estado hiperglicémico son los productos de glicosilación avanzada (PGA), los cuales son identificados como un grupo de moléculas formadas por la unión de azúcares reductores a ciertos residuos de proteínas, aminoácidos y algunas bases nitrogenadas de ácidos nucleicos. Los PGA son el resultado de la reacción de proteínas con glucosa cuando ésta se encuentra en concentraciones elevadas, proceso que se denomina glicosilación de proteínas. Tras la interacción de la glucosa con los grupos amino libres de las proteínas, se produce una base de Schiff y posteriormente un rearrreglo molecular que lleva a moléculas más estables denominadas productos de Amadori, que no son otra cosa más que proteínas glicosiladas [34].

2.3 Estrés oxidativo

Los procesos de oxidación dentro del organismo ocurren de manera natural, la producción de radicales libres y antioxidantes ocurre en balance, sin embargo, cuando se excede la producción de radicales libres, y rebasa la capacidad antioxidante del organismo, se genera un desbalance y con esto se implanta un estado denominado estrés oxidativo, con capacidad de inducir daños a nivel celular.

El estrés oxidativo se relaciona con la etiología de diversas enfermedades degenerativas, con problemas cardiovasculares, cáncer y diabetes entre otros padecimientos. Por otro lado, en muchos casos el estrés oxidativo es la consecuencia de la enfermedad más que su etiología [35].

2.3.1 Defensa antioxidante

Los antioxidantes son moléculas encargadas de proteger al organismo de los ataques de moléculas inestables como los radicales libres, son las moléculas capaces de evitar el proceso de oxidación de otras moléculas.

El fenómeno de oxidación se describe como una reacción que genera el desplazamiento de un electrón de cierta sustancia a un agente oxidante creando metabolitos que pueden ser tóxicos junto con radicales libres que dañan los tejidos o células por medio de reacciones en cadena. Los antioxidantes tienen capacidad para poner fin a estas reacciones en cadena a través de la eliminación de radicales libres e impidiendo otras reacciones de oxidación al oxidarse ellos mismos.

Clasificación de antioxidantes

- **Vitaminas.** Las vitaminas son sustancias esenciales para las actividades metabólicas, ejemplos de éstas con capacidad antioxidante son el ácido ascórbico (vitamina C) y el alfa-tocoferol (vitamina E).
- **Minerales.** Algunos minerales actúan como cofactores de enzimas antioxidantes y juegan un rol dinámico en el metabolismo de varias macromoléculas, por ejemplo, carbohidratos, ácidos nucleicos, etc. Algunos ejemplos son el selenio, cobre, hierro y zinc.
- **Fitoquímicos.** Entre éstos se encuentran los flavonoides que son compuestos de tipo fenólico que dan color a los vegetales, frutas, granos, semillas, hojas, flores y corteza. Un ejemplo lo constituyen las catequinas, unos de los principales antioxidantes bioactivos que se encuentran en el té verde y negro, además de otros compuestos como los carotenoides [36].

- Los antioxidantes de origen enzimáticos se encuentran presentes en el organismo y protegen frente a las EROS producidos durante el metabolismo. Dentro de éstas hay 3 importantes: la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPX).
- La SOD cataliza la dismutación del anión superóxido, originando peróxido de hidrógeno. Existen distintas formas de la enzima, dependiendo del metal del centro catalítico: Zn, Cu-SOD citosólica y la Mn-SOD mitocondrial.
- La CAT es una enzima que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua. Está presente en la mayoría de las células eucariotas, localizándose a nivel de los peroxisomas.
- La GPX también contribuye a la eliminación del peróxido de hidrógeno pero trabaja utilizando glutatión reducido, a diferencia de la CAT que utiliza peróxido de hidrógeno como dador de electrones [37].

Pruebas en ratas diabéticas mostraron que el uso de vitamina E ayuda al metabolismo lipídico, logrando con ello una reducción de la peroxidación lipídica.

La estimación o cuantificación de antioxidantes en el organismo es un factor que podría ser importante para tener un control sobre el avance del estrés oxidativo en el paciente [38].

2.3.2 Radicales libres

Los radicales libres son aquellas moléculas con uno o más electrones no apareados, característica que los hace moléculas completamente inestables y con alto grado de reactividad.

Es importante tener en consideración que los radicales libres se generan de manera endógena por reacciones bioquímicas en el organismo como parte del metabolismo normal (por ejemplo, la cadena de transporte de electrones), además de las fuentes exógenas de radicales libres como la contaminación y radiación entre otros factores [39].

Ejemplos de radicales libres son el anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y el radical hidroxilo ($\bullet OH$).

Anión superóxido (O_2^-). La adición de un electrón al oxígeno molecular origina la formación de esta molécula. Es una especie que no se considera muy reactiva, su acción dependerá del sitio de generación en la célula

El O_2^- se da de manera natural en los procesos que se llevan a cabo en la cadena de transporte de electrones mitocondrial y las enzimas nicotinamida adenina dinucleótido/nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADH/NADPH) oxidasa, xantina oxidasa y sintasa endotelial de NO (eNOS) [40].

Peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Se genera cuando una molécula de oxígeno molecular se ve reducida en dos electrones o cuando una molécula de anión superóxido (O_2^-) se reduce en un electrón, el H_2O_2 puede ser derivado de la dismutación del O_2^- por la superóxido dismutasa (SOD) [41].

Radical hidroxilo ($\bullet OH$). Se ve formado cuando ocurre una interacción entre el O_2^- y H_2O_2 .

Además el H_2O_2 también reacciona en presencia de Fe^{+2} libre (metales de transición Cu, Fe y Co) produciendo este radical OH.y Fe^{+3} siendo esta interacción conocida como reacción de Fenton. Se considera como uno de los radiales con mayor grado de reactividad, siendo asociado con daño a lípidos y proteínas, DNA y carbohidratos [42].

2.4 Marcadores de estrés oxidativo

2.4.1 Malondialdehído (MDA)

El malondialdehído (MDA) es una sustancia que resulta de la peroxidación lipídica. La medición de este aldehído se propone como un método para identificar el daño a lípidos por estrés oxidativo. Existen diferentes métodos para la cuantificación sérica de esta molécula, siendo uno de los más utilizados el desarrollado por Gérard-Monnier et al., el cual se basa en la reacción del MDA con dos moléculas

de 1-metil-2-fenilindol en medio ácido. El método detecta el producto que se observa en la Figura 2, cuantificado por una técnica de espectrofotometría a una longitud de onda de 586 nm, y utiliza como estándar al 1,1,3,3 tetrametoxipropano [43].

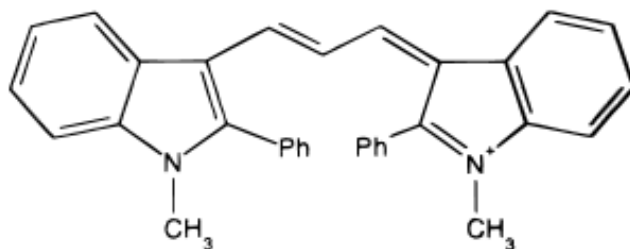


Figura 2. Complejo formado por el MDA con dos moléculas de 1-metil-2-fenilindol. Se detecta por espectrofotometría con una longitud de onda de 586 nm [43].

2.4.2 Productos avanzados de oxidación de proteínas (PAOP)

Las proteínas celulares están sujetas a estrés oxidativo en presencia de una variedad de especies reactivas de oxígeno (ROS). Dependiendo del ROS, el daño resultante a la proteína puede tomar la forma de nitración o la oxidación de diversos residuos de aminoácidos.

El daño a proteínas por estrés oxidativo, no ha sido estudiado con tanta profundidad como en el caso de la peroxidación lipídica, sin embargo, se han realizado algunos hallazgos en relación con la acción de los radicales libres y cómo éstos reaccionan con aminoácidos, péptidos y proteínas. Específicamente tenemos que la oxidación de ciertos residuos de aminoácidos facilita el entrecruzamiento y fragmentación de proteínas [44].

En un estado de estrés oxidativo, las especies reactivas de oxígeno, además de los oxidantes cloraminados, principalmente el ácido hipocloroso (HOCl), ocasionan daño oxidativo en las proteínas plasmáticas, causando entrecruzamiento ditirosínico y dando origen a los productos avanzados de oxidación proteica (PAOP). Dado que la formación de PAOPs es óptima con los oxidantes clorados,

es interesante especular que su formación *in vivo* podría ser el resultado de la actividad enzimática de la mieloperoxidasa (MPO) de fagocitos [45,46].

Cuando se habla de PAOP se hace referencia a la presencia de productos de ditirosinas, la formación de este compuesto conduce a la pérdida de solubilidad, induce fluorescencia y ocasionalmente formación de soluciones de gel de proteínas. Esta reacción se lleva a cabo debido a un acoplamiento fenólico oxidativo de dos residuos de tirosina, como se muestra en la Figura 3 [47].

La determinación de PAOPs cobra relevancia ya que algunos estudios han encontrado que la concentración de estos productos son moderadamente elevados en pacientes adultos con diabetes tipo 1 y más marcadamente elevados en aquellos con diabetes tipo 2, cuya concentración se correlaciona con la resistencia a la insulina o la presencia y/o gravedad de las complicaciones microvasculares de la diabéticas, como la retinopatía o nefropatía.

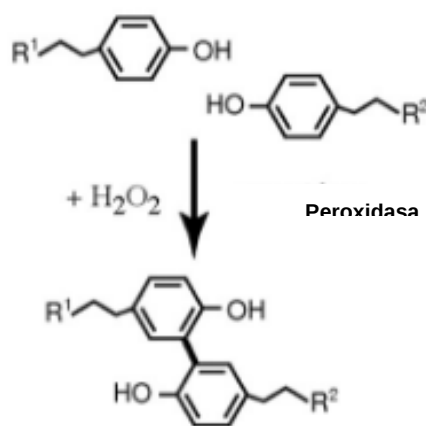


Figura 3. Entrecruzamiento de ditirosinas en los productos avanzados de la oxidación de proteínas [48].

La cuantificación de PAOPs consiste en analizar la capacidad de las muestras de plasma para oxidar iones yodo (I^-) a yodo diatómico (I_2) en medio ácido, usando técnicas espectrofotométricas a una longitud de onda de 340 nm, y empleando un estándar de cloramina T [44].

2.4.3 Óxido nítrico (NO)

El óxido nítrico es un mediador endógeno en numerosos procesos fisiológicos, importante en la respuesta cardiovascular y procesos de neurotransmisión. Su vida corta y poca concentración *in vivo* dificulta su cuantificación sérica, por lo que resulta más factible evaluar el anión nitrito, un producto estable de la oxidación del óxido nítrico [49].

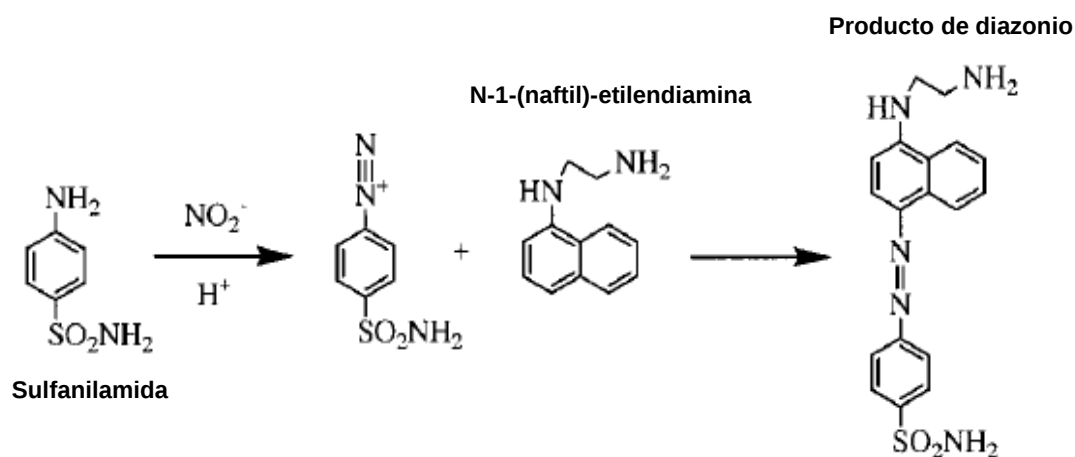


Figura 4. Método de Greiss para la determinación sérica de óxido nítrico (NO). El nitrito que participa en la primera reacción proviene del óxido nítrico [49].

El NO se forma a partir de la L-arginina siendo catalizado por una familia de isoenzimas de la óxido nítrico sintasa (NOS).

En ciertos estados de enfermedad el sistema inmune induce la expresión de la NOS (iNOS), lo que incrementa la producción de NO, y se ha visto asociado como un factor de gravedad en diversas enfermedades como cáncer, diabetes y sepsis [49].

Los principales productos finales de la oxidación de NO *in vivo* son nitrito (NO_2^-) y nitrato (NO_3^-). La vida media del NO en plasma y otros fluidos corporales es muy corta, por lo tanto, el mejor índice de producción total de NO es la suma de nitritos y nitratos [50].

La reacción de Griess es un método ampliamente utilizado para medir la concentración de nitritos como un índice de la cantidad de NO en un medio ácido [51].

El método de Greiss describe la formación de un cromóforo estable, las reacciones se esquematizan en la Figura 4. Inicialmente se desproteiniza el plasma con ZnSO_4 , y luego se convierte el nitrato en nitrito usando perlas de cadmio, esto debido a que el nitrito específicamente reacciona en condiciones ácidas con la sulfanilamida por medio de un proceso de diazotización, para formar un catión de diazonio, seguido de un acoplamiento con aminas bicíclicas como la N-1-(naftil)-etilendiamina, para ser detectado mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 560 nm y utilizando nitrito de sodio como estándar [49].

2.4.4 Capacidad antioxidante total (CAT)

La medición de la capacidad antioxidante total es un parámetro importante debido a que determina el efecto antioxidante total, que puede encontrarse en una muestra biológica, midiendo el cúmulo de sustancias antioxidantes, ya que de otra manera resulta impráctico el hecho de evaluar cada una de estas sustancias (antioxidantes) en un paciente [52].

El método descrito por Erel et al. utiliza ABTS en estado reducido el cual es oxidado mediante peróxido de hidrógeno en medio ácido a una molécula de ABTS oxidada, esta reacción genera una coloración verde oscura en el reactivo, que tras interaccionar con la muestra a evaluar genera una aclaración del reactivo decolorándolo a un color blanquecino, esto debido a que las sustancias antioxidantes devuelven el estado de reducción al ABTS, todo esto era determinado mediante técnicas espectrofotométricas a una longitud de onda de 660 nm usando como referencia el trolox, un análogo de la vitamina E como patrón para generar una curva estándar, en la Figura 5 se ejemplifica las reacciones de oxidación y reducción de la molécula de ABTS [53].

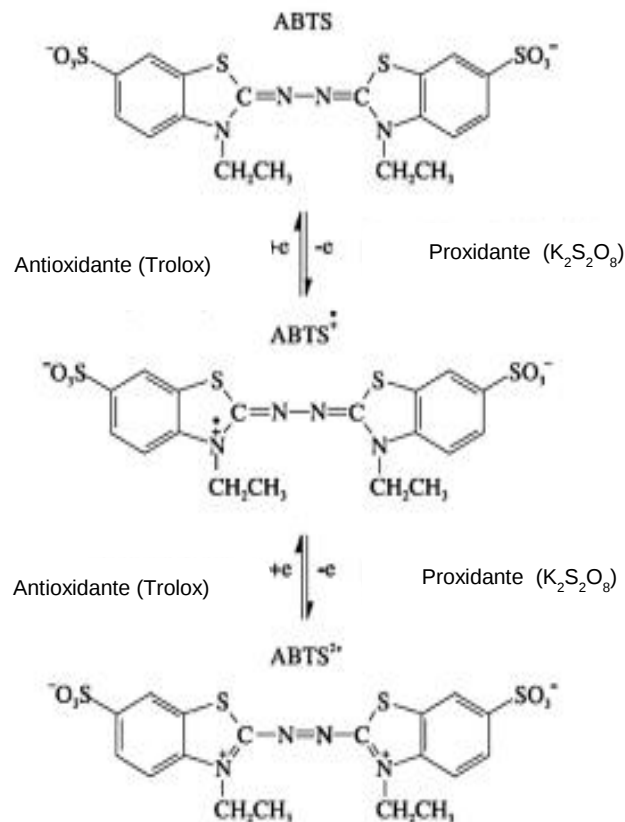


Figura 5. Reacciones de oxidación y reducción en la molécula de ABTS [54].

2.4.5 Capacidad oxidante total (COT)

La capacidad oxidante total se define como la determinación de la cantidad total de sustancias oxidantes presentes en una determinada muestra biológica, estas sustancias, por su enorme diversidad, no pueden cuantificarse de manera independiente debido a que implicaría un elevado costo en tiempo y dinero. El principio de la prueba con base en el acuerdo a Erel et al., describe la oxidación del ion ferroso a ion férrico mediante la cantidad de sustancias oxidantes presentes en la muestra a evaluar, para que finalmente el ion férrico interaccione con la molécula de xilenol naranja generando un compuesto púrpura cuantificable mediante métodos espectrofotométricos a una longitud de onda 560 nm [55].

2.4.6 Índice de estrés oxidativo (IEO)

El índice de estrés oxidativo se calcula mediante el cociente COT/CAT. Esto permite tener un valor indicativo del nivel de estrés oxidativo. La unidad de CAT se cambia a mmol/L, y el valor del IEO se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula [56]:

$$[\text{COT (mmol Eq a H}_2\text{O}_2\text{/L)} / \text{CAT (mmol Eq a Trolox/L)}] * 100 = \text{IEO}$$

3. ANTECEDENTES

Entre los trabajos previos en los que se asocian las complicaciones de la diabetes con el estrés oxidativo podemos citar a Komosinska-Vassev et al. quienes estudiaron la relación de las complicaciones vasculares de la DMT2 y el control glucémico con el estrés oxidativo. Sus grupos de estudio fueron divididos con base en el control de la glucosa sanguínea y con base en la presencia de complicaciones vasculares, demostrando cambios importantes en la actividad de diversas enzimas involucradas en el sistema de defensa antioxidante del organismo. El análisis arrojó una correlación positiva entre los valores incrementados de la actividad de la superóxido dismutasa (SOD) y HbA1c, así como una correlación negativa en los niveles de catalasa y glutatión peroxidasa (GPx) con la capacidad antioxidante total, lo que implica que la patología vascular y el pobre control de la glucosa pueden afectar la producción de radicales libres, así como afectar la actividad de las enzimas antioxidantes. Se trató de un estudio que incluyó 48 pacientes de origen polaco divididos en 4 grupos de 12 sujetos cada uno, los grupos estaban formados en función de un buen o mal control glucémico y la presencia de complicaciones vasculares, así como un grupo control de 25 personas. Además, fueron incluidos pacientes con diferentes esquemas de tratamiento incluyendo el uso de insulina [57].

Por otro lado, Saxena et al. en 2005, reportaron que los niveles séricos de triglicéridos postprandiales se correlacionan con las complicaciones macrovasculares de los pacientes con diabetes mellitus tipo 2. Los valores alcanzados por los pacientes diabéticos fueron mayores significativamente en relación con el grupo de pacientes diabéticos sin complicaciones y el grupo control; además, los niveles séricos de MDA correlacionaron positivamente con la trigliceridemia postprandial en el grupo de diabéticos con complicaciones. Sin embargo, SOD y GPx fueron más bajos en el grupo de diabéticos con y sin complicaciones en relación con los controles. El estudio se desarrolló con 26 pacientes con DMT2 de la India: 13 con complicaciones macrovasculares y 13 sin complicaciones; así como 13 sujetos aparentemente sanos que conformaron el grupo control. Resulta interesante que en este estudio fueron excluidos pacientes

con hipercolesterolemia (> 250 mg/dL), así como aquellos que se encontraban bajo tratamiento hipolipemiante, con antioxidantes, insulina y suplementos vitamínicos. En este trabajo los investigadores concluyen que la hipertrigliceridemia postprandial parece ser el principal determinante del estrés oxidativo en DMT2, lo cual en conjunto con un estado antioxidante comprometido pudiera conducir a una disfunción endotelial y a las complicaciones macrovasculares [58].

En otro estudio, Tabak et al. estudiaron el efecto de las complicaciones vasculares en DMT2 sobre la oxidación de proteínas, lípidos y ADN. Incluyeron 69 pacientes con DMT2 de Turquía de los cuales 20 no presentaron complicación alguna, 37 tuvieron complicaciones microvasculares, 4 pacientes presentaron complicaciones macrovasculares y 8 tuvieron una mezcla de macrovasculares y microvasculares. El grupo control estuvo conformado por 20 individuos aparentemente sanos. Se incluyeron pacientes bajo tratamiento con hipoglucemiantes orales o insulina, o ambas. No se incluyeron pacientes que estuvieran bajo algún tipo de tratamiento adicional incluyendo estatinas, minerales o suplementos vitamínicos. Encontraron que los niveles séricos de los productos avanzados de oxidación de proteínas y el 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) fueron significativamente más elevados en el grupo de diabéticos con complicaciones en relación con los pacientes sin complicaciones y el grupo control. Concluyen que el incremento en la formación de radicales libres y la generación de estrés oxidativo bajo condiciones de hiperglicemia, es una de las probables causas de evolución de las complicaciones en la DMT2 [59].

El trabajo reportado por Bansal et al. en 2012 muestra la relación de las complicaciones macro y microvasculares (sólo nefropatía y retinopatía) de la diabetes mellitus tipo 2 con el estrés oxidativo. Investigaron la formación de productos finales de glicosilación avanzada (PGA) y algunos parámetros de estrés oxidativo como los productos avanzados de oxidación de proteínas (PAOP), malondialdehído (MDA), tioles totales (T-SH), formación de carbonilos en proteínas (PCO) y la actividad de la enzima paraoxonasa 1 (PON1). Incluyeron

157 pacientes con DMT2 de la India que fueron divididos en tres grupos: 53 con complicaciones microvasculares, 47 con complicaciones macrovasculares y 57 sin complicaciones. El grupo control fue conformado por 40 individuos con glucosa en ayuno normal y con una distribución de género y edad similar a la de los pacientes diabéticos. De los 157 pacientes diabéticos incluidos 40% se encontraban recibiendo terapia con insulina y más del 75% tomaba algún tipo de hipoglucemiante oral o una combinación de ellos. Algunos pacientes tomaban antihipertensivos y/o hipolipemiantes como atorvastatina y rosuvastatina; y la mayoría se encontraba bajo tratamiento con vitaminas del complejo B con zinc. Como parte de sus resultados, encontraron un incremento en la formación de PGAs en los pacientes diabéticos con complicaciones micro y macrovasculares, en relación con los sujetos del grupo control y los pacientes diabéticos sin complicaciones. Por otro lado, los niveles séricos de PAOP y MDA fueron significativamente más elevados y la actividad de PON1 significativamente disminuida en los pacientes diabéticos con complicaciones. Los niveles de AGES mostraron una correlación positiva con HbA1c, MDA y PAOP, así como una correlación negativa con PON1 y T-SH. Concluyen que altos niveles séricos de PGA y baja actividad de PON1 puede considerarse como un factor de riesgo adicional para el desarrollo de complicaciones vasculares en DMT2, y que los PGA juegan un papel significativo en la inducción de estrés oxidativo en la diabetes [60].

En 2013, Jakuš et al. reportaron los resultados de un estudio en el que evaluaron si el monitoreo de los niveles plasmáticos de PGA, PAOP, lipoperóxidos e IL-6 podría contribuir a la predicción del desarrollo de las complicaciones de la diabetes. Incluyeron 81 pacientes con DMT2 de la República de Eslovaquia, de los cuales 26 no presentaron complicaciones y 55 presentaron complicaciones macrovasculares o microvasculares (nefropatía, retinopatía y/o neuropatía). Los pacientes incluidos en el estudio se encontraban bajo diversos esquemas de tratamiento para su diabetes, que incluían dieta, fármacos antidiabéticos o insulina, o una combinación de estos; así como medicamentos antihipertensivos. El grupo control se constituyó con 20 voluntarios aparentemente sanos. Los

resultados obtenidos muestran un aumento significativo de los PGA en ambos grupos de pacientes diabéticos, particularmente en el grupo con complicaciones vasculares, en relación con los controles. En cuanto a los PAOP se encontraron significativamente elevados en los pacientes diabéticos en relación con los controles, sin embargo, entre los grupos con y sin complicaciones no se encontró diferencia significativa. Por otro lado, no se encontró correlación entre los niveles de IL-6 y los parámetros clínicos y bioquímicos estudiados. Los investigadores sugieren que la medición no sólo de HbA1c, sino también de PGA, pudiera ser útil para predecir el riesgo de desarrollo de complicaciones de la diabetes [61].

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El principal factor que conduce a las alteraciones fisiopatológicas en la vasculatura diabética es la exposición crónica a altos niveles sanguíneos de glucosa. Bajo condiciones de hiperglucemia, la glucosa y otros carbohidratos reductores reaccionan de manera no enzimática con grupos amino libres de las proteínas conduciendo a la formación acelerada de productos finales de glucosilación avanzada (PGA). El papel de los PGA en el desarrollo de las complicaciones en la DMT2 permanece por ser elucidado, sin embargo, existe evidencia en el sentido de que la interacción de los PGA con sus receptores, resulta en la activación de diversas señales de transducción, incluyendo la generación de especies reactivas de oxígeno. La exposición crónica de biomoléculas como lípidos, proteínas y ADN a altos niveles de EROS puede conducir a reacciones de peroxidación y glucoxidación que resultan en la formación de carbonilos en proteínas, oxidación de grupos tiol, productos avanzados de oxidación de proteínas y peroxidación de lípidos. Por lo anterior es claro que existe una interrelación entre glucosilación avanzada, estrés oxidativo, inflamación y la progresión de las complicaciones vasculares en la diabetes, que no ha sido totalmente entendida.

En la DMT2 la formación de productos avanzados de oxidación de proteínas, un marcador de estrés oxidativo y mediador inflamatorio, se favorece por los procesos de glucoxidación, el desbalance oxidantes-antioxidantes y la inflamación coexistente. Los datos sugieren que la acumulación crónica de PAOP en plasma puede promover la inflamación renal en pacientes con DMT2, así como un incremento en la susceptibilidad al desarrollo de retinopatía.

Otro marcador de estrés oxidativo son los productos de la lipoperoxidación, los cuales se generan por la oxidación de ácidos graso poliinsaturados y representan el producto final primario de la lipoperoxidación. Este proceso es una cascada de eventos que resulta de la acción de las EROS sobre los ácidos grasos poliinsaturados presentes en las membranas celulares. Se ha encontrado que los niveles circulantes de lipoperóxidos se encuentran significativamente elevados en asociación con isquemia del miocardio y los factores de riesgo cardiovasculares.

La lipoperoxidación se encuentra incrementada en pacientes con DMT2 y pudiera estar relacionada con la modulación de la respuesta inflamatoria [62].

Dentro de los distintos productos generados por la peroxidación lipídica tenemos que los hidroperóxidos lipídicos son los productos principales, existen diferentes aldehídos secundarios derivados de la peroxidación lipídica, entre los cuales está el malondialdehído (MDA), propanal, hexanal y 4-hidroxinonenal [63].

Ciertos ensayos de diagnóstico están disponibles comercialmente para la cuantificación de productos finales de la peroxidación lipídica, específicamente para la cuantificación sérica de MDA, un producto final de la peroxidación de los ácidos grasos y un marcador de la actividad de los radicales libres.

Otro fenómeno relacionado con el desarrollo de las complicaciones en la diabetes, es la disfunción endotelial, debido a que los radicales libres activan diversas vías que conllevan a esta disfunción, vinculando así a este fenómeno con el estrés oxidativo. En este sentido, cuando ocurre un incremento en los niveles de glucosa se promueve la formación del anión superóxido (O_2^-) a través del trabajo mitocondrial, este incremento favorece la interacción con NO, desencadenando la formación de peroxinitrito ($ONOO^-$), una importante molécula reactiva causante de daño celular, además de presentar un efecto inhibitorio sobre la óxido nítrico sintasa endotelial [64].

Por otro lado, la importancia de evaluar los PAOP radica en que se han descrito como moléculas formadas durante la internación de ciertas proteínas plasmáticas (albumina) con algunos agentes clorados, estos derivados en respuesta a situaciones de estrés o defensa del organismo, considerándolos como un marcador importante de daño a proteínas por estrés oxidativo [65].

No existen reportes en la literatura en los que se evalúe si existen diferencias significativas en los niveles séricos de marcadores de estrés oxidativo en pacientes mexicanos diagnosticados con DMT2, con y sin complicaciones microvasculares. Este tipo de estudios nos permitirá caracterizar a nuestra población en cuanto al comportamiento de los marcadores de estrés oxidativo en

esta enfermedad y establecer la posibilidad de utilizar uno o más de dichos marcadores para dar seguimiento al desarrollo de complicaciones microvasculares; así mismo, permitirá sentar las bases para estudios futuros de intervención con antioxidantes con la finalidad de reducir los niveles de estrés oxidativo con la expectativa de disminuir las complicaciones microvasculares y proporcionar al paciente diabético una mejor calidad de vida.

4.1 Pregunta de Investigación

¿Existe diferencia significativa en la concentración sérica de marcadores de estrés oxidativo en un grupo de pacientes mexicanos con DMT2 con y sin complicaciones microvasculares?

5. JUSTIFICACIÓN

Se define como diabetes a la enfermedad crónica que no permite al paciente generar insulina o en su defecto no usarla de manera adecuada en su organismo. La importancia de la insulina radica, entre otras cosas, por su capacidad para favorecer el ingreso de la glucosa en diferentes tejidos, y ser utilizada como fuente de energía. El paciente diabético al no poder incorporar la glucosa a los tejidos insulino-dependientes, condiciona un estado de hiperglucemia debido a la acumulación de glucosa en el torrente sanguíneo, predisponiendo al desarrollo de estrés oxidativo y a la generación de complicaciones a largo plazo, tanto microvasculares como macrovasculares.

Según datos de la Federación Internacional de Diabetes (FID) se estima que en 2015 había alrededor de 415 millones de personas padeciendo diabetes, esperándose que para el 2040 dicha cifra se incremente a 642 millones de enfermos. Por otro lado, y en este mismo año, la DMT2 costó aproximadamente \$673,000 millones de dólares en gastos de salud a nivel mundial, particularmente por el tratamiento de las complicaciones de esta enfermedad. Tan solo en el 2015 la DMT2 fue responsable de la muerte de 5 millones de personas a nivel mundial, lo que equivale a que cada seis segundos una persona muere por diabetes; además de ser una de las principales causas de enfermedad cardiovascular, ceguera, insuficiencia renal y amputación de miembros inferiores. México no ha estado excluido del impacto de esta enfermedad, ya que ocupó el sexto lugar a nivel mundial de pacientes afectados con esta enfermedad con edades entre los 20 y 79 años. [7].

La diabetes mellitus tipo 2 está asociada a una hiperglicemia crónica, así como a la resistencia a la insulina, esto a su vez condiciona la generación de desórdenes en el metabolismo de la glucosa, como lo es la activación de la vía del poliol, la generación de productos de glicosilación avanzados (PGA), la activación de diversas proteínas por acción de la proteínasa C e incremento en la vía de las hexosaminas. Estos procesos tienden a generar un incremento en las especies

reactivas de oxígeno (EROs), y con ello conducir al paciente a un estado de estrés oxidativo [32,66].

El presente trabajo permitirá identificar marcadores de estrés oxidativo potencialmente útiles para el seguimiento de la eficacia del tratamiento en pacientes diabéticos mexicanos, así como plantear el uso de antioxidantes en estos pacientes, enfocado a la disminución del daño por estrés oxidativo, lo que podría contribuir a una disminución en la aparición o severidad de las complicaciones características de esta enfermedad. Por otro lado, los métodos que se utilizarán en el presente trabajo, si bien en la actualidad no son de uso rutinario, son relativamente de bajo costo, utilizan cantidades pequeñas de suero sanguíneo, y presentan suficiente precisión para su posible implementación como parte de los servicios de un laboratorio clínico. Asimismo, los resultados de este trabajo podrían sentar las bases para realizar estudios de valores de referencia para marcadores de estrés oxidativo.

6. OBJETIVOS

6.1 General

Comparar las concentraciones séricas de marcadores de estrés oxidativo (MDA, PAOP, COT, CAT, NO, IEO) en pacientes con DMT2 con y sin complicaciones microvasculares.

6.1.1 Específicos

- Estandarizar los procedimientos de laboratorio (pruebas bioquímicas y cuantificación de marcadores de estrés oxidativo).
- Seleccionar a los pacientes con base en los criterios de selección.
- Conformar los grupos de estudio acorde con el número de complicaciones microvasculares que presente cada paciente, además de conformar un grupo control de sujetos aparentemente sanos.
- Realizar las determinaciones bioquímicas y la cuantificación de los marcadores de estrés oxidativo en los pacientes incluidos en el estudio.
- Realizar el análisis estadístico de los resultados de las pruebas bioquímicas y de los marcadores de estrés oxidativo en busca de diferencias entre los grupos de estudio.

7. HIPÓTESIS

7.1 Hipótesis de investigación

Los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 con complicaciones microvasculares mostrarán una diferencia significativa en la concentración sérica de al menos uno de los marcadores de estrés oxidativo (MDA, PAOP, CAT, COT, NO e IEO), en relación con los pacientes diabéticos tipo 2 sin complicaciones microvasculares y los sujetos aparentemente sanos.

7.1.1 Hipótesis nula

Los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 con complicaciones microvasculares no mostrarán una diferencia significativa en la concentración sérica de los marcadores de estrés oxidativo (MDA, PAOP, CAT, COT, NO e IEO), en relación con los pacientes diabéticos tipo 2 sin complicaciones microvasculares y los sujetos aparentemente sanos.

8. METODOLOGÍA

8.1 Tipo de estudio

Ensayo clínico, comparativo, correlacional, con una sola intervención en los diferentes grupos de estudio.

8.1.1 Universo de estudio

Pacientes con DMT2 diagnosticados bajo los criterios de la ADA (American Diabetes Association), que acudan para su seguimiento y control a la consulta del programa “MIDE” de la Clínica de Medicina Familiar ISSSTE de Olaya de Banderilla, localizado en la ciudad de Tijuana, Baja California, México. Se realizó una preselección de pacientes diabéticos tipo 2 que contaran con un historial clínico en la base de datos del hospital, con el fin de revisar si cumplían con los criterios de inclusión y exclusión, para que en su próxima cita de seguimiento fuesen invitados a participar en el estudio.

8.2 Criterios de selección

8.2.1 Criterios de inclusión

- Pacientes de 18 a 75 años.
- Género indistinto.
- Con diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2 independientemente del tiempo transcurrido desde su diagnóstico, con base en los criterios de la ADA.
- Pacientes con y sin complicaciones microvasculares propias de la DMT2 (retinopatía, nefropatía, y neuropatía).
- No ingesta de suplementos o tratamientos antioxidantes en los últimos 3 meses.
- Sin comorbilidades asociadas. Podrán incluirse hipertensos y/o dislipidémicos controlados (TA <140/90 mmHg, colesterol total <200 mg/dL, triglicéridos <150 mg/dL, colesterol-HDL >50 mg/dL para mujeres, colesterol-HDL > 40 mg/dL para hombres, colesterol-LDL <100 mg/dL).

- Sin tratamiento adicional al utilizado para el manejo de la diabetes. Podrán incluirse pacientes tratados con antihipertensivos y/o lipolipemiantes.

8.2.2 Criterios de exclusión

- Pacientes embarazadas.
- Pacientes lactando.
- Tabaquismo
- Diabetes secundaria.
- Uso de terapia de remplazo hormonal.
- Pacientes con DMT2 con complicaciones macrovasculares.
- Pacientes con IMC ≥ 30 .

8.2.3 Criterios de eliminación

- Retiro del consentimiento informado.
- Pacientes en quienes no se obtenga una muestra adecuada.

8.3 Cálculo del tamaño de muestra

El cálculo para el tamaño de muestra (n) se realizó mediante la ecuación para comparación de medias, identificando el estudio como una prueba de hipótesis bilateral [67].

Se tomó como referencia los valores de medias (μ) y desviaciones estándar (σ) del estudio realizado por Heredia *et al.*, debido a la similitud de la técnica empleada para la cuantificación del marcador de estrés oxidativo MDA [68].

La fórmula se expresa de la siguiente manera:

$$n = \frac{K(\sigma_1^2 + \sigma_2^2)}{(\mu_1 - \mu_2)^2}$$

El valor de K viene dado por la siguiente fórmula $K=(Z\alpha + Z\beta)^2$, donde el valor $Z\alpha$ se fijó con base en un nivel de confianza estadístico del 95% ($\alpha=0.05$) denominado como el error tipo 1, mientras que la potencia estadística ($Z\beta$) se fijó en un valor de 95%, con lo que se estableció un valor del 5% para el error tipo 2.

$$n = \frac{13(2.35^2 + 0.44^2)}{(4.376 - 1.168)^2}$$

Se obtuvo un tamaño de muestra por grupo de 8 pacientes como mínimo, pero considerando un factor de pérdida, se consideró un tamaño muestral de al menos 12 pacientes por grupo, incluyendo el grupo control.

8.4 Formación de los grupos de estudio

8.4.1 Grupo control

El grupo control fue conformado por sujetos aparentemente sanos, sin historia familiar o personal de diabetes, que por invitación acudan al Centro de Diagnóstico de la Facultad de Medicina Mexicali para su valoración. La determinación de su inclusión en el grupo control fue con base en los resultados de la entrevista médica, medidas antropométricas (peso, talla e IMC). Los pacientes seleccionados se citaron para la colección de una muestra sanguínea para la cuantificación de los parámetros bioquímicos y de estrés oxidativo. Se buscó una distribución similar en cuanto a edad y género en relación con el grupo de pacientes diabéticos.

8.4.2 Grupos de pacientes con diabetes mellitus tipo 2

Se conformaron 3 grupos de estudio con un mínimo de 12 pacientes por grupo. En uno de ellos se incluyó a los pacientes diagnosticados con diabetes mellitus tipo 2 sin complicaciones microvasculares. En el segundo grupo se incluyó pacientes diabéticos con una sola complicación microvascular de cualquier tipo. El tercer grupo fue conformado con pacientes que presentaron 2 complicaciones microvasculares. Los pacientes que conformaron los grupos de estudio contaron

con su expediente clínico de la Clínica de Medicina Familiar ISSSTE Otay, de donde se obtuvieron los datos antropométricos y clínicos necesarios.

8.5 Variables

8.5.1 Variables Independientes

Variable: **Nefropatía**

Definición Conceptual: Es una la alteración en el riñón por las lesiones de los vasos sanguíneos pequeños de este órgano, se produce en personas con diabetes cuando su control glucémico y otros factores asociados no han sido adecuados. Forma parte de las complicaciones crónicas de la diabetes mellitus.

Definición Operacional: Historia Clínica - Exámenes Bioquímicos - Examen especial clínico para complicación microvascular (nefropatía).

Tipo de Variable: Cualitativa.

Escala de Medición: Prueba de estimación de tasa de filtración glomerular (TFG).

Grado de Medición: Continua.

Reactivos-Indicador: Estudio histológico (biopsia tejido renal).

Instrumentos: Historia clínica, pruebas bioquímicas (glucosa, colesterol total, HDL-C, triglicéridos, hemoglobina glucosilada, creatinina sérica). El examen para diagnóstico de nefropatía, prueba de estimación de tasa de filtración glomerular (TFG).

Variable: **Retinopatía**

Definición Conceptual: Es un daño de los vasos sanguíneos de la capa posterior del ojo, la retina, lo que ocasiona una pérdida progresiva de la vista, siendo causa importante de ceguera, siendo esto provocado por la enfermedad diabetes mellitus.

Definición Operacional: Historia clínica - Exámenes bioquímicas - Examen especial clínico para complicación microvascular (retinopatía).

Tipo de Variable: Cualitativa.

Escala de Medición: Examen diagnóstico basado en la auscultación por médico oftalmólogo.

Grado de Medición: Continua.

Reactivos-Indicador: Fotografía estereoscópica a 30 grados en siete campos estándar en una película a color (>80% Sensibilidad).

Instrumentos: Historia clínica, pruebas bioquímicas (glucosa, colesterol total, HDL-C, triglicéridos, hemoglobina glucosilada). El examen para diagnóstico de retinopatía debe ser realizado con una lámpara de hendidura, con lupa y la pupila dilatada.

Variable: **Neuropatía**

Definición Conceptual: Son lesiones de los nervios periféricos por distintos mecanismos, como el daño directo por la hiperglucemia y la disminución del flujo sanguíneo que llega a células nerviosas como resultado del daño de los pequeños vasos.

Definición Operacional: Historia clínica - Exámenes bioquímicos - Examen especial clínico para complicación microvascular (neuropatía)

Tipo de Variable: Cualitativa.

Escala de Medición: Michigan neuropathy screening instrument-MNSI

Grado de Medición: Continua.

Reactivos-Indicador: Estudio de conducción nerviosa.

Instrumentos: Historia clínica, pruebas bioquímicas (glucosa, colesterol total, HDL-C, triglicéridos, hemoglobina glucosilada). El examen para diagnóstico de neuropatía (Michigan neuropathy screening instrument-MNSI).

8.5.2 Variables Dependientes

Variable: **Malondialdehído (MDA)**

Definición Conceptual: Es uno de los productos finales de la peroxidación lipídica por acción de especies reactivas de oxígeno.

Definición Operacional: Cuantificación de malondialdehído (MDA) a través de métodos espectrofotométricos.

Tipo de Variable: Cuantitativa.

Escala de Medición: Colorimétrica.

Grado de Medición: Continua.

Reactivos-Indicador: Malondialdehído.

Instrumentos: Protocolo de laboratorio.

Variable: **Productos Avanzados de la Oxidación de Proteínas (PAOP)**

Definición Conceptual: Los productos avanzados de la oxidación de proteínas comprenden proteínas oxidadas, principalmente albúmina y fibrinógeno, que son comúnmente utilizados como biomarcadores de daño por estrés oxidativo.

Definición Operacional: Cuantificación de productos avanzados de la oxidación de proteínas (PAOP) a través de métodos espectrofotométricos.

Tipo de Variable: Cuantitativa.

Escala de Medición: Colorimétrica.

Grado de Medición: Continua.

Reactivos-Indicador: Productos avanzados de la oxidación de proteínas.

Instrumentos: Protocolo de laboratorio.

Variable: **Óxido Nítrico (NO)**

Definición Conceptual: El óxido nítrico (NO), producido endógenamente a partir de la L-Arginina por las óxido-nítrico-sintasas, juega un papel importante en varios procesos fisiológicos.

Definición Operacional: El óxido nítrico se une al oxígeno para dar lugar principalmente a dos productos, nitritos (NO^{2-}) y nitratos (NO^{3-}), que son determinados espectrofotométricamente.

Tipo de Variable: Cuantitativa.

Escala de Medición: Colorimétrica.

Grado de Medición: Continua.

Reactivos-Indicador: Óxido nítrico.

Instrumentos: Protocolo de laboratorio.

Variable: **Capacidad Antioxidante Total (CAT)**

Definición Conceptual: Capacidad acumulada de los suplementos alimenticio y sustancias endógenas, tanto micro como macromoleculares, que contribuyen a contrarrestar el efecto de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.

Definición Operacional: Determinación de la capacidad antioxidante total (CAT) a través de un método espectrofotométrico que involucra la participación del radical ABTS^{•+}.

Tipo de Variable: Cuantitativa.

Escala de Medición: Colorimétrica.

Grado de Medición: Continua.

Reactivos-Indicador: Capacidad antioxidante total.

Instrumentos: Protocolo de laboratorio.

Variable: **Capacidad Oxidante Total (COT)**

Definición Conceptual: Capacidad acumulada de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno generadas en los procesos fisiológicos y metabólicos, que contribuyen a generar estrés oxidativo.

Definición Operacional: Determinación de la capacidad oxidante total (COT) a través del método espectrofotométrico de la o-dianisidina.

Tipo de Variable: Cuantitativa.

Escala de Medición: Colorimétrica.

Grado de Medición: Continua.

Reactivos-Indicador: Capacidad oxidante total.

Instrumentos: Protocolo de laboratorio.

Variable: **Índice de Estrés Oxidativo (IEO)**

Definición Conceptual: Indicador del nivel de estrés oxidativo en una muestra biológica.

Definición Operacional: El índice de estrés oxidativo se obtiene a través del cociente COT/CAT multiplicado por 100.

Tipo de Variable: Cuantitativa.

Escala de Medición: Colorimétrica.

Grado de Medición: Continua.

Reactivos-Indicador: Índice de estrés oxidativo.

Instrumentos: Protocolo de laboratorio.

8.6 Identificación de las complicaciones microvasculares

Las complicaciones microvasculares que se tomaron en cuenta para el estudio fueron: retinopatía, neuropatía y nefropatía.

La retinopatía fue diagnosticada con base en la historia clínica y el examen de fondo de ojo en busca de micro-aneurismas, puntos o manchas hemorrágicas, o cambios en la retina como edema y engrosamiento.

La nefropatía se diagnosticó con base en la historia clínica y la cuantificación de la tasa de filtrado glomerular [69].

La neuropatía se diagnosticó con base en la historia clínica y evaluación mediante el uso del cuestionario Michigan Neuropathy Screening Instrument (MNSI), donde el valor máximo a obtener es de 8 puntos y el criterio para el diagnóstico de neuropatía es un valor ≥ 2 [28].

8.7 Medición de parámetros antropométricos

Los datos antropométricos que fueron evaluados son peso, talla e índice de masa corporal (IMC), el valor del peso fue medido mediante una báscula BAME 140 K, para una correcta medición, el sujeto se colocó en posición erecta y relajada, de

frente a la báscula, con la vista fija en un plano horizontal. Las palmas de las manos extendidas y descansando lateralmente en los muslos; con los talones ligeramente separados, los pies formando una uve (V) ligera y sin hacer movimiento alguno. La talla se midió mediante un estadímetro integrado a la báscula BAME 140 K, se colocó al sujeto de manera que su cabeza, hombros, caderas y talones estuvieran juntos bajo la línea de la cinta del estadímetro, los brazos colgando de manera libre y naturalmente a los costados del cuerpo, se manteniendo la cabeza de la persona en línea horizontal imaginaria que sale del orificio del oído a la órbita del ojo [70]. Por último el índice de masa corporal (IMC) se calculó dividiendo en base a los valores previamente obtenidos los kilogramos de peso por el cuadrado de la estatura en metros ($IMC = \text{peso (kg)} / \text{estatura}^2 \text{ (m}^2\text{)}$) [71].

8.8 Obtención de muestra de suero y plasma sanguíneo

Se seleccionaron a aquellos pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión, informándoles del proceso de estudio y obteniendo su consentimiento informado. La toma de muestra sanguínea para las pruebas bioquímicas y de estrés oxidativo se realizó en la clínica de Medicina Familiar ISSSTE Otoy, donde se habilitó un espacio físico para realizar la toma de muestras. Los pacientes que aceptaron ingresar al estudio se les citó con ayuno de 12 horas para la extracción sanguínea, ésta se realizó mediante punción de la vena antecubital. La muestra se depositó en un tubo sin anticoagulante (7 mL) y en un tubo con EDTA como anticoagulante (para la determinación de hemoglobina glucosilada y creatinina). Para la obtención de suero sanguíneo se permitió la coagulación por 30 minutos, posteriormente se centrifugó a 4,500 rpm durante 10 minutos. El suero se distribuyó en tubos para microcentrífuga. Las pruebas bioquímicas se realizaron el mismo día en que fueron colectadas. Las determinaciones de los marcadores de estrés oxidativo se realizaron en un máximo de una semana manteniendo las muestras a -70 °C hasta su procesamiento.

8.9 Cuantificación de parámetros bioquímicos

Las pruebas bioquímicas que se realizaron tanto a los pacientes del grupo control como a los de los grupos de estudio fueron las siguientes: glucosa, colesterol total, HDL-colesterol, triglicéridos, hemoglobina glucosilada (HbA1c), creatinina sérica. Con estos datos se calcularon LDL-C y VLDL-C.

La cuantificación de las concentraciones séricas de glucosa, triglicéridos, colesterol total, HDL-colesterol y creatinina se realizaron mediante pruebas comerciales de química líquida (SPINREACT, S.A., España) a través de un analizador de química clínica (Erba Diagnostics Mannheim GmbH, Alemania) y de acuerdo con las indicaciones del fabricante. El VLDL-C se calculó con la fórmula $\text{triglicéridos}/5$, mientras que el LDL-C se estimó mediante la fórmula de Friedewald ($\text{LDL-C} = \text{CT} - \text{HDL-C} - \text{VLDL-C}$). La hemoglobina glucosilada se determinó mediante un método comercial basado en una resina de intercambio iónico (Stanbio Laboratory, TX, USA.)

8.10 Cuantificación de marcadores de estrés oxidativo

Se realizaron las cuantificaciones séricas de los siguientes marcadores de estrés oxidativo: MDA, PAOP, CAT, NO, COT e IEO; las cuales se procesaron en el Laboratorio de Análisis Clínicos de la Facultad de Medicina Mexicali, UABC. La cuantificación de estos marcadores se realizó mediante técnicas manuales y espectrofotométricas de acuerdo con los siguientes métodos:

- Determinación de malondialdehído (MDA) por el método del N-metil-2-fenil-indol [43].
- Determinación de la capacidad oxidante total (COT) mediante el método de la o-dianisidina (3,3'-dimetoxibenzidina) [55].
- Determinación de productos avanzados de oxidación de proteínas (PAOP) mediante el método de la cloramina-T [46].
- Determinación de la capacidad antioxidante total (CAT) por el método del radical catión ABTS⁺ [53].

- Cálculo del índice de estrés oxidativo (IEO). Se determinará a través del cociente COT/CAT [56].
- Determinación de óxido nítrico (NO) por el método de Greiss [49].

8.11 Análisis estadístico

Los datos fueron expresados como la media $\pm$ la desviación estándar cuando presentaron distribución normal, en caso de una distribución no normal se utilizó la mediana y los rangos intercuartílicos. Se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk para determinar normalidad. Para la búsqueda de diferencias entre grupos se utilizó un valor de significancia (α) de $P < 0.05$. Se compararon las medias a través de una ANOVA de un factor y prueba de Tukey para datos con distribución normal; para la comparación de datos con distribución no normal se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney o Kruskal Wallis según la cantidad de grupos comparados. El análisis de correlación se realizó mediante el método de Pearson. Se utilizó el paquete estadístico IBM SPSS Statistics versión 22 [67].

9. ASPECTOS ÉTICOS, NORMATIVOS Y DE SEGURIDAD

El presente estudio se desarrolló en apego a las disposiciones legales de la Ley General de Salud de los Estados Unidos Mexicanos, 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; a la legislación aplicable en materia de protección al ambiente como la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

Se explicó a cada participante la naturaleza del estudio, su objetivo, procedimientos involucrados, duración esperada, riesgos potenciales y beneficios derivados, así como cualquier molestia que se pudiera ocasionar. A cada participante se le informó que su inclusión en el estudio sería voluntaria, por lo que no se realizaría pago alguno como compensación por su participación en la investigación, que podría abandonarlo en cualquier momento y que el retiro del consentimiento no tendría repercusión alguna.

Con base en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación, se obtuvo el consentimiento bajo información por escrito de cada participante en el estudio. Para tal efecto, el documento mencionado fue firmado por el participante y por el investigador asociado responsable de la investigación.

10. RESULTADOS

Fueron incluidos un total de 40 pacientes diabéticos, de los cuales 20 fueron de género masculino y 20 de género femenino; la edad promedio de estos pacientes fue de 58.4 ± 7.1 años, presentaron un peso promedio de 74.6 ± 13.1 kg, una talla promedio de 160.5 ± 10.5 cm y un IMC de 28.81 ± 3.5 kg/m² (Tabla 4). De los 40 pacientes diabéticos, 16 no presentaron complicaciones microvasculares al momento de su inclusión en el estudio; el grupo de pacientes que presentaron una complicación microvascular tuvieron la siguiente distribución: 11 con neuropatía y uno con nefropatía; mientras que el grupo de pacientes con dos complicaciones microvasculares mostraron la siguiente distribución: 9 con retinopatía/neuropatía y 3 con nefropatía/neuropatía. Por otro lado, el grupo control fue conformado por 14 sujetos, 7 de género masculino y 7 de género femenino, con una edad promedio de 54.1 ± 6.6 años, peso promedio de 70.1 ± 15.4 kg, talla promedio de 166.6 ± 10.1 cm e IMC promedio de 25 ± 3.3 kg/m².

Tabla 4. Datos demográficos y bioquímicos de pacientes y controles.

Parámetros	Controles (N=14)	Pacientes Diabéticos (N=40)	Valor P
Edad (años)	54.07 $\pm$ 6.59	58.40 $\pm$ 7.07	0.050**
Género	M=7 F=7	M=20 F=20	
Peso (Kg)	70.10 $\pm$ 15.43	74.75 (23.13)*	.256*
Talla (cm)	166.57 $\pm$ 10.16	160.52 $\pm$ 10.46	.067**
IMC (kg/m ²)	24.99 $\pm$ 3.34	28.81 $\pm$ 3.48	.001**
Glucosa (mg/dL)	91.50 $\pm$ 6.86	121.17 $\pm$ 34.93	.000**
Triglicéridos (mg/dL)	68.28 $\pm$ 22.34	132.75 $\pm$ 43.15	.000**
Colesterol total (mg/dL)	176.42 $\pm$ 25.37	152.5 (45.50)*	.065*
HDL-Colesterol (mg/dL)	52.42 $\pm$ 10.46	50 (15.75)*	.471*
LDL-Colesterol (mg/dL)	109.67 $\pm$ 28.00	84.90 $\pm$ 27.73	.006**
VLDL-Colesterol (mg/dL)	13.62 $\pm$ 4.43	26.55 $\pm$ 8.63	.000**
HbA1c (%)	5.73 $\pm$ 0.64	7.41 $\pm$ 1.05	.000**

Nota. M=Masculino F=Femenino. Se presentan los promedios $\pm$ desviación estándar, excepto en los casos indicados con un (*) los cuales corresponden a la mediana y el rango intercuartílico. Para el cálculo del valor de P se utilizó la prueba U de Mann-Whitney (*) y la Prueba t de Student (**), de acuerdo con el tipo de distribución que presentaron los resultados de cada paciente (normal o no normal).

Los datos antropométricos y los parámetros bioquímicos de los pacientes diabéticos y controles se muestran en la Tabla 4, en la que se puede observar que no hay diferencia significativa en la edad, peso, talla, colesterol total y HDL-Colesterol. Por otro lado se puede observar que entre ambos grupos existen diferencias significativas en las variables IMC ($P=0.001$), glucosa ($P=0.000$), triglicéridos ($P=0.000$), LDL-Colesterol ($P=0.006$), VLDL-Colesterol ($P=0.000$), y hemoglobina glucosilada ($P=0.000$).

Los resultados de la cuantificación sérica de los marcadores de estrés oxidativo se muestran en la Tabla 5, en la que se aprecia que existe diferencia significativa entre el grupo control y los pacientes diabéticos en los marcadores de MDA ($P=0.000$), PAOP ($P=0.002$), NO ($P=0.000$), CAT ($P=0.000$) e IEO ($P=0.004$).

Tabla 5. Parámetros de estrés oxidativo en pacientes y controles.

Parámetros	Controles (N=14)	Pacientes Diabéticos (N=40)	Valor P
MDA ($\mu\text{mol/L}$)	1.35 (1.53) ⁺	4.39 $\pm$ 1.41	.000
PAOP ($\mu\text{mol/L}$)	6.9 (1.34) ⁺	9.14 $\pm$ 2.67	.002
NO ($\mu\text{mol/L}$)	20.36 $\pm$ 11.96	42.9 (14.65) ⁺	.000
CAT (mmol Eq Trolox/L)	0.83 (0.32) ⁺	1.62 $\pm$ 0.39	.000
COT ($\mu\text{mol Eq H}_2\text{O}_2/\text{L}$)	9.34 $\pm$ 3.30	10.55 (9.28) ⁺	.465
IEO (Unidad Arbitraria)	1.01 $\pm$ 0.28	0.63 (0.37) ⁺	.004

Nota. Se presentan los promedios $\pm$ desviación estándar, excepto en los casos indicados con un (*) los cuales corresponden a la mediana y el rango intercuartílico. Para el cálculo del valor de P se utilizó la prueba U de Mann-Whitney.

La Tabla 6 muestra los datos demográficos y bioquímicos correspondientes a los pacientes diabéticos tipo 2 agrupados con base en el número de complicaciones microvasculares que presentaron al momento de su inclusión en el estudio.

Tabla 6. Datos demográficos y bioquímicos en pacientes diabéticos agrupados por número de complicaciones microvasculares.

Parámetros	GRUPO 1 0 Com (N=16)	GRUPO 2 1 Com (N=12)	GRUPO 3 2 Com (N=12)	Valor P
Edad (años)	55.95 ±7.05	59.67 ± 5.36	60.41 ±8.10	0.195*
Género	M=6 F=10	M=5 F=7	M=9 F=3	
Peso (kg)	77.28 ±12.60	68.98 ±13.17	76.62 ±13.15	0.212*
Talla (cm)	162.87 ±10.32	156.75 ±12.35	161.16 ±8.15	0.307*
IMC (kg/m ²)	29.15 ±4.01	27.93 ±3.09	29.25 ±3.21	0.588*
Glucosa mg/dL	117.5 (30.25) ⁺	98 (65.50) ⁺	120.5 ±34.79	0.765**
Triglicéridos mg/dL	110.50 (40.25) ⁺	137.08 ±36.09	132.5 (66.50) ⁺	0.723**
Colesterol total mg/dL	155.25 ±30.82	169.16 ±23.68	141.5 (66.50) ⁺	0.272**
HDL-Colesterol mg/dL	54.93 ±12.78	50.16 ±11.66	42 (12.0) ⁺	0.147**
LDL-Colesterol mg/dL	79.38 ±26.51	91.58 ±18.64	85.58 ±36.43	0.525*
VLDL-Colesterol mg/dL	22.10 (8.05) ⁺	22.41 ±7.21	26.5 (13.30) ⁺	0.723**
HbA1c (%)	7.06 ±1.22	7.9 ±1.04	7.36 ±0.61	0.103*

Nota. M=Masculino, F=Femenino, Com=Complicaciones microvasculares. Se presentan los promedios ± desviación estándar, excepto en los casos indicados con un (+) los cuales corresponden a la mediana y el rango intercuartílico. Para el cálculo del valor de P se utilizó la prueba ANOVA de un factor (*) y la prueba de Kruskal Wallis (**), de acuerdo con el tipo de distribución que presentaron los resultados de cada paciente (normal o no normal).

La Figura 6 muestra los resultados del perfil lipídico practicado a los sujetos aparentemente sanos y a los diabéticos agrupados según su número de complicaciones microvasculares. Se observa que prácticamente todos los valores caen dentro de los rangos de referencia respectivos.

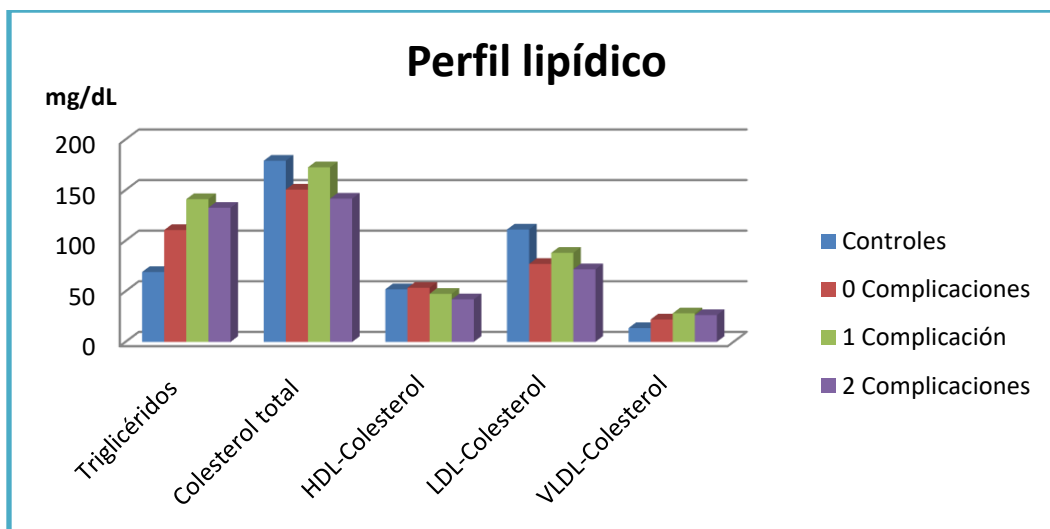


Figura 6. Perfil lipídico en pacientes diabéticos y grupo control. Se presentan los pacientes con DMT2 agrupados por el número de complicaciones microvasculares y contrastado con el grupo control. Los datos corresponden a las medianas.

En la Figura 7 se presentan los resultados de las cuantificaciones sanguíneas de glucosa y hemoglobina glucosilada. Ambas mediciones están expresadas en términos de la mediana.

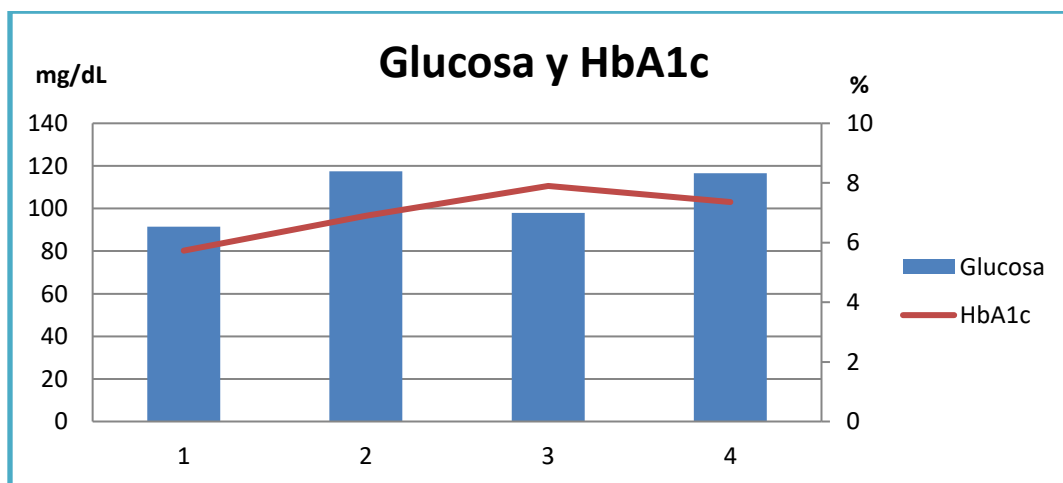


Figura 7. Concentración de glucosa y hemoglobina glucosilada en pacientes diabéticos y grupo control. 1. Grupo control, 2. Pacientes con DMT2 sin complicaciones microvasculares, 3. Pacientes con DMT2 y una complicación 4. Pacientes con DMT2 y dos complicaciones.

En la Tabla 7 se muestran los niveles séricos de los marcadores de estrés oxidativo en los pacientes diabéticos agrupados de acuerdo con la cantidad de complicaciones microvasculares que presentaron. La comparación de los valores entre los pacientes diabéticos sin complicaciones contra los grupos de pacientes que presentan una o dos complicaciones microvasculares muestra una diferencia significativa en la variable CAT ($P=0.002$).

Tabla 7. Parámetros de estrés oxidativo en pacientes diabéticos agrupados por número de complicaciones microvasculares.

Parámetros	GRUPO 1 0 Com (N=16)	GRUPO 2 1 Com (N=12)	GRUPO 3 2 Com (N=12)	Valor P
MDA ($\mu\text{mol/L}$)	4.48 $\pm$ 1.15	4.75 $\pm$ 1.55	3.91 $\pm$ 1.57	0.341*
PAOP ($\mu\text{mol/L}$)	9.08 $\pm$ 2.29	9.25 $\pm$ 3.02	9.13 $\pm$ 3.00	0.986*
NO ($\mu\text{mol/L}$)	40.3 $\pm$ 8.71	47.35 (13.84)*	43.03 (20.40)*	0.235**
CAT (mmol Eq Trolox/L)	1.37 $\pm$ 1.91	1.81 $\pm$ 0.38	1.77 $\pm$ 0.43	0.002*
COT ($\mu\text{mol Eq H}_2\text{O}_2/\text{L}$)	7.97 (8.68)*	15.49 $\pm$ 8.31	10.55 $\pm$ 5.48	0.167**
IEO (Unidad Arbitraria)	0.66 (.43)*	0.85 $\pm$ 0.44	0.59 $\pm$ 0.23	0.341**

Nota. Com=Complicaciones microvasculares. Se presentan los promedios $\pm$ desviación estándar, excepto en los casos indicados con un (*) los cuales corresponden a la mediana y el rango intercuartílico. Para el cálculo del valor de P se utilizó la prueba ANOVA de un factor (*) y la prueba de Kruskal Wallis (**), de acuerdo con el tipo de distribución que presentaron los resultados de cada paciente (normal o no normal).

En relación con la cuantificación de los marcadores de estrés oxidativo, la Tabla 8 presenta el valor de P para cada una de las comparaciones que se indican en la misma tabla. Se indica en color rojo los valores de $P<0.05$ y que por lo tanto indican una diferencia significativa. Al comparar el grupo control con los pacientes diabéticos con 0, 1 y 2 complicaciones microvasculares, se observa el mayor número de valores de $P<0.05$. Sin embargo, la comparación entre grupos de diabéticos con 0, 1 y 2 complicaciones solo mostró diferencia significativa en la capacidad antioxidante total (CAT).

Tabla 8. Comparación de los datos de estrés oxidativo entre pacientes diabéticos agrupados por número de complicaciones microvasculares.

Grupos de comparación	MDA	PAOP	NO	CAT	COT	IEO
Controles vs 0 Comp	0.000*	0.004*	0.175**	0.000*	0.934*	0.034*
Controles vs 1 Comp	0.000*	0.021*	0.000*	0.000*	0.004**	0.220**
Controles vs 2 Comp	0.000*	0.045*	0.000*	0.000*	0.086**	0.465**
0 Comp vs 1 Comp	0.171**	0.364**	0.086*	0.020**	0.104*	0.430*
0 Comp vs 2 Comp	0.451**	0.581**	0.353*	0.000**	0.853*	0.486*
1 Comp vs 2 Comp	0.712**	0.811**	0.564*	0.259**	0.145**	0.093**

Nota. Comp=Complicaciones microvasculares. *Prueba U de Mann-Whitney, **Prueba t de Student.

Se realizaron pruebas de correlación entre los parámetros bioquímicos y marcadores de estrés oxidativo. Se utilizó la prueba de correlación de Pearson. En la Tabla 9 se muestran únicamente los coeficientes de correlación que presentaron una $P < 0.05$. Como se puede observar, se obtuvieron valores de correlación positivas en las variables de MDA con PAOP con un $r = 0.357$ ($P = 0.024$), por otro lado también se encontró correlación del NO con las variables de glucosa, triglicéridos, VLDL-C y CAT, mostrando los siguientes valores respectivamente $r = 0.484$ ($P = 0.002$), $r = 0.571$ ($P = 0.000$), $r = 0.571$ ($P = 0.000$), $r = 0.382$ ($P = 0.015$); así mismo, CAT mostró una correlación negativa con respecto a la variable HDL-C con una $r = -0.330$ ($P = 0.037$).

Tabla 9. Prueba de correlación de Pearson en pacientes diabéticos agrupados por número de complicaciones microvasculares. Se presentan únicamente los resultados con $p < 0.05$ al correlacionar los marcadores de estrés oxidativo y parámetros bioquímicos en pacientes con DMT2 ($n=40$).

Parámetros correlacionados	r	Valor de P
PAOP – Malondialdehído	0.357	0.024
NO – Glucosa	0.484	0.002
NO – Triglicéridos	0.571	0.000
NO - CAT	0.382	0.015
NO - VLDL-C	0.571	0.000
CAT - HDL-C	-0.330	0.037

Nota. r=coeficiente de correlación, NO=óxido nítrico, PAOP=productos avanzados de oxidación de proteínas, CAT=capacidad antioxidante total.

La Tabla 10 muestra la distribución de tratamientos farmacológicos a los que estaban sometidos los pacientes con DMT2 al momento de su inclusión en el estudio. Se puede apreciar que los pacientes del grupo con 0 complicaciones microvasculares son los que estaban sometidos a un mayor número de combinaciones de fármacos hipoglucemientes y antihipertensivos. De manera general encontramos que la metformina fue el fármaco más utilizado, encontrando que 35 pacientes (88%) estaban siendo tratados con este fármaco, seguido por linagliptina en 19 pacientes (48%) y sitagliptina en 10 pacientes (25%).

Tabla 10. Distribución de los pacientes diabéticos con base en el tratamiento farmacológico y número de complicaciones microvasculares.

Tratamiento Farmacológico	Metformina	Linagliptina	Sitagliptina	Combinación (M-L o M-S)	IECA-ARA II
Grupo 0 Complicaciones N=16	15	9	4	12	9
Grupo 1 Complicación N=12	9	8	1	6	4
Grupo 2 Complicaciones N=12	11	2	5	6	2

Nota. M= Metformina, L= Linagliptina, S= Sitagliptina, IECA= Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, ARA II= Antagonista de los receptores de angiotensina II

11. DISCUSIÓN

En patologías como la diabetes mellitus, se ha encontrado incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno que se relacionan con el desbalance del sistema oxidante-antioxidante lo cual se ha identificado como un punto de partida para el desarrollo de complicaciones micro y macrovasculares en pacientes diabéticos [57].

En relación con la concentración sérica de productos avanzados de la oxidación de proteínas (PAOP), en el presente estudio se encontró una diferencia significativa al comparar dichas concentraciones entre diabéticos y sujetos aparentemente sanos (Tabla 5 y Tabla 8). Este hallazgo concuerda con lo reportado por Tabak et al. y Bansal et al. quienes demostraron una diferencia significativa en los valores de PAOP en un grupo de diabéticos con y sin complicaciones en comparación con un grupo control [59, 60]. Por su parte, Pan et al. también encontraron diferencia significativa tanto en los niveles de PAOP como de proteínas carboniladas entre pacientes diabéticos y sujetos sanos [72].

En nuestro estudio, los niveles séricos de PAOP también fueron comparados entre diabéticos con cero, una y dos complicaciones microvasculares sin evidenciar alguna diferencia significativa (Tabla 7, $P=0.986$). Esto concuerda con lo reportado por Kalousava et al. quienes tampoco encontraron diferencia significativa en las concentraciones de PAOPs entre grupos de pacientes diabéticos con diferentes complicaciones [73]. Cabe destacar que Gradinaru et al. propusieron que los PAOP podría ser un marcador que vincula a la diabetes mellitus tipo 2 con el desarrollo de aterosclerosis, una complicación frecuente en los pacientes diabéticos [74].

Por otro lado y con respecto a la lipoperoxidación, nuestros resultados muestran una diferencia significativa en los valores de MDA entre controles y pacientes diabéticos, lo cual coincide con el estudio realizado por Bansal et al. quienes encontraron diferencia en la concentración sérica de este marcador de peroxidación lipídica en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 frente a un grupo

control [60]. El malondialdehído y otras moléculas producto de la oxidación de lípidos, se han implicado como agentes causales en procesos citotóxicos iniciados por la exposición de los sistemas biológicos a agentes oxidantes. Es importante mencionar que estas sustancias son relativamente estables y se pueden difundir a sitios distantes de la célula lo que implica atacar diferentes objetivos, exhibiendo una alta reactividad con biomoléculas tales como proteínas y fosfolípidos. Además, también se ha reportado que el MDA a altas concentraciones es considerado mutagénico y carcinogénico debido a su capacidad para generar aductos en el ADN [75].

Existen estudios como el realizado por Cakatay et al. donde reportan que la proteínas carboniladas (PCO), MDA y PAOP en pacientes diabéticos con un mal control metabólico podría ser un condicionante para desarrollar complicaciones microvasculares [76].

Savu et al. encontraron que pacientes con DMT2 mostraron un incremento en los marcadores de daño por estrés oxidativo, entre ellos el MDA, así como un incremento significativo en la capacidad antioxidante total en relación con el grupo control. Este resultado aparentemente contradictorio es concordante con los resultados del presente trabajo (Tablas 5 y 8). Savu et al señalan que este hallazgo pudiera estar relacionado con el metabolismo del cobre ya que encontraron niveles séricos elevados de este elemento así como de ceruloplasmina en los pacientes diabéticos, aunque se desconoce el mecanismo mediante el cual pudieran estar influyendo en la capacidad antioxidante total [77]. Por otro lado, es bien sabido que el ácido úrico es una molécula antioxidante y muy probablemente también contribuye a la capacidad antioxidante total en el organismo.

Como dato de importancia tenemos que en la Tabla 4 los pacientes diabéticos muestran valores menores en LDL-Colesterol (84.90 ± 27.73), con respecto a los pacientes del grupo control (109.67 ± 28.00), esto puede deberse al hecho de que en su mayoría los pacientes diabéticos tomaban medicamentos para controlar su metabolismo lipídico, siendo las estatinas el fármaco más frecuentemente

utilizado, reconocido por su capacidad para disminuir los niveles de LDL-Colesterol de manera significativa.

En un trabajo publicado por Kharroubi et al. reportan que un grupo de pacientes diabéticos presentan un incremento de hasta un 18.5% en su CAT respecto a los controles [78], lo cual fue confirmado Srivatsan et al. quienes también demostraron un incremento en la CAT en pacientes con DMT2. En este último estudio, además del incremento en la CAT, los pacientes también mostraron un aumento en el MDA y NO [79]. Estos datos concuerdan con lo encontrado en el presente trabajo, donde se demuestra que existe diferencia significativa en la CAT entre los pacientes diabéticos y el grupo control (Tabla 5, $P=0.000$), así como entre pacientes diabéticos sin complicaciones microvasculares comparados con pacientes con una complicación (Tabla 8, $P=0.02$) y dos complicaciones (Tabla 8, $P=0.000$). Estos hallazgos pudieran explicarse en función de las enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, catalasa), cuya actividad se incrementa en respuesta a un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, como un mecanismo de defensa o una respuesta adaptativa al estrés oxidativo [57,80,81,82].

Por otro lado, este incremento en la CAT con aumento de marcadores de estrés oxidativo como el MDA y PAOP en pacientes diabéticos, también pudiera explicarse con base en lo reportado por Gómez et al. quienes demuestran que metformina y rosuvastatina reducen la inflamación y el estrés oxidativo, en este último caso, a través de un incremento en los niveles de la SOD, lo que sin duda contribuye a incrementar la CAT, la cual no fue determinada en el trabajo realizado por Gómez et al. [83]. Asimismo, y con respecto a otros tipos de fármacos hipoglucemiantes y antihipertensivos, se ha reportado que los inhibidores de la dipeptidilpeptidas tipo 4 (DPP-4) como la linagliptina y sitagliptina; y algunos antihipertensivos como losartan y enalapril, provocan una reducción significativa en el estrés oxidativo, y en el caso de los antihipertensivos mencionados, se reporta una disminución en los niveles de MDA [84,85]. En nuestro estudio y de acuerdo con los datos de la Tabla 10, el 88% de los pacientes diabéticos estaban

siendo tratados con metformina; el 60% recibían una terapia combinada de metformina con linagliptina o sitagliptina, mientras que casi un 50% se encontraba tratado con inhibidores de la ECA y metformina con linagliptina o sitagliptina.

Otro de los marcadores de estrés oxidativo que resultó incrementado en los pacientes diabéticos fue el óxido nítrico (NO). La diferencia significativa la encontramos al comparar el grupo control con los diabéticos que presentaron una y dos complicaciones microvasculares ($P=0.000$ en ambos casos), no así al comparar el grupo control con diabéticos sin complicaciones ($P=0.175$), lo cual concuerda con lo reportado por Carrizales et al. y Nuñez et al. [86,87].

Por otro lado, Aydin et al. demostraron un incremento de NO en pacientes diabéticos tipo 2 con respecto a sus controles [88]. Esto se puede explicar debido a que el anión superóxido (O_2^-) se encuentra en mayores cantidades de manera circulante debido al estado hiperglicémico de estos pacientes. El NO tiene una elevada interacción con el O_2^- , ya que la cinética y termodinámica de la reacción favorece la formación de peroxinitrito, lo cual ocurre a una velocidad similar a la de la reacción entre la SOD y el O_2^- , afectando así la protección que confiere la SOD al dismutar el O_2^- en oxígeno y H_2O_2 . Este consumo de NO como consecuencia de su transformación en peroxinitrito provoca una disminución en la interacción del NO con su receptor de membrana en el músculo liso, el cual se caracteriza por ser un receptor de tipo guanilil-ciclase, generando una disminución en la producción de GMPc y alterando con esto la capacidad de vasodilatación y contracción de dicho tejido muscular. Como consecuencia de lo anterior, el organismo se ve forzando a entrar en un estado de sobreproducción de NO [75, 89].

Se realizaron pruebas de correlación entre los parámetros bioquímicos y los marcadores de estrés oxidativo. La Tabla 9 muestra los resultados de aquellas correlaciones que presentaron una $P<0.05$, sin embargo en ningún caso el coeficiente de correlación alcanza un valor 0.7, que nos indica una muy buena correlación. A pesar de esto, es conveniente resaltar que MDA y PAOP

correlacionan positivamente, y que ambos marcadores presentaron diferencias significativas entre el grupo control y los pacientes diabéticos independientemente del número de complicaciones microrvasculares que presenten, por lo que pudieran ser muy útiles en el seguimiento del estado oxidantes de los pacientes diabéticos; así como en el seguimiento de intervenciones con antioxidantes.

Finalmente y con base en los datos que se muestran en la Tabla 8, donde podemos observar que al comparar las concentraciones de los marcadores de estrés oxidativo entre pacientes con cero, una y dos complicaciones, no encontramos diferencias significativas en la gran mayoría de los marcadores (excepto para CAT), por lo que podemos establecer que ninguno de los marcadores incluidos en el estudio resulta útil para monitorear la progresión en el número de las complicaciones microvasculares en pacientes diabéticos.

12. CONCLUSIONES

Las concentraciones séricas de MDA y PAOP mostraron diferencias significativas al comparar el grupo control con los pacientes diabéticos con y sin complicaciones microvasculares, por lo que se proponen como marcadores para el seguimiento del estado oxidante de pacientes diabéticos.

No se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de los marcadores de estrés oxidativo al comparar pacientes diabéticos sin complicaciones con pacientes diabéticos con una y dos complicaciones microvasculares, por lo que ninguno de los marcadores incluidos en el estudio resulta útil para monitorear la progresión en el número de complicaciones en estos pacientes.

El óxido nítrico mostró una diferencia significativa entre el grupo control y los pacientes diabéticos con al menos una complicación, sin embargo, este parámetro no está relacionado con el número de complicaciones microvasculares.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med*. 1998; 15(7): 539-53.
2. Jay D, Hitomi H, Griendling KK. Oxidative stress and diabetic cardiovascular complications. *Free Radic Biol Med*. 2006; 40(2): 183-92.
3. American Diabetes Association (ADA). Standards of medical care in diabetes 2018. *Diabetes care*. 2018; 40(1): 13-27.
4. Scheen AJ. Pathophysiology of type 2 diabetes. *Acta Clin Belg*. 2003; 58(6): 335-41.
5. Reyes JAO, Plancarte AA. Bases moleculares de las acciones de la insulina. *Rev Educ Bioq*. 2008; 27(1): 9-18.
6. Tuomilehto J, Lindström J, Eriksson JG, Valle TT, Hämäläinen H, Ilanne-Parikka P, Keinänen-Kiukaanniemi S, Laakso M, Louheranta A, Rastas M, Salminen V, Uusitupa M. Finnish Diabetes Prevention Study Group. Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Engl J Med*. 2001; 344(18): 1343-50.
7. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 7th ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2015. <http://www.diabetesatlas.org/> Fecha de consulta: 23 Enero 2017.
8. Seuring T, Archangelidi O, Suhrcke M. The economic costs of type 2 diabetes: a global systematic review. *Pharmacoeconomics*. 2015; 33(8): 811-31.
9. Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología, AC. Complicaciones macrovasculares en la diabetes mellitus tipo 2. *Rev Endocrinol Nutr*. 2004; 12(2): 23-30.
10. Fowler MJ. Microvascular and macrovascular complications of diabetes. *Clin Diabetes*. 2011; 29: 116–22.
11. Bandeira S de M, da Fonseca LJS, Guedes G da S, Rabelo LA, Goulart MOF, Vasconcelos SML. Oxidative Stress as an Underlying Contributor in the Development of Chronic Complications in Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci*. 2013; 14(2): 3265-84.

12. Lakshmi SV, Padmaja G, Kuppusamy P, Kutala VK. Oxidative Stress in Cardiovascular Disease. *IJBB*. 2009; 46(6): 421-40.
13. Rösen P, Nawroth PP, King G, Möller W, Tritschler HJ, Packer L. The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. *Diabetes Metab Res Rev*. 2001; 17(3): 189-212.
14. Maynard S, Schurman SH, Harboe C, De Souza-Pinto NC, Bohr VA. Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging. *Carcinogenesis*. 2009; 30(1): 2-10.
15. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ J*. 2012; 5(1): 9-19. Khawaja R, Sarwar M, Bloach MH, Ahmad I, Munir TA. Type 2 diabetes mellitus; homocysteine, total anti-oxidant levels and vitamins in patients of different duration. *Professional Med J* 2016; 23(9):1084-1091.
16. Khawaja R, Sarwar M, Bloach MH, Ahmad I, Munir TA. Type 2 diabetes mellitus; homocysteine, total anti-oxidant levels and vitamins in patients of different duration. *Professional Med J* 2016; 23(9):1084-1091.
17. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2014; 37(1): 81-90.
18. Alila Medical Media. Diabetes type 1 and type 2. (2013). Recuperado de <http://www.alilamedicalimages.org/2013/12/23/diabetes/> Fecha de consulta: 15 de Enero 2017.
19. Fletcher B, Gulanick M, Lamendola C. Risk factors for type 2 diabetes mellitus. *J Cardiovasc Nurs*. 2002; 16 (2):17-23.
20. Browning LM, Jebb SA. Nutritional influences on inflammation and type 2 diabetes risk. *Diabetes Technol Ther*. 2006; 8 (1): 45-54.
21. Monroy VS, Díaz CA, Trenado LM, Peralta JM, Soto SM. Thr130Ile polymorphism of HNF4A gene is associated with gestational diabetes mellitus in Mexican population. *J Investig Med*. 2014; 62(3): 632-4.
22. Kierstan Boyd. American academy of ophthalmology. What Is Diabetic Retinopathy? Reviewed: Sep 2017. Recuperado de <https://www.aao.org/salud-ocular/enfermedades/retinopatia-diabetica> Fecha de consulta: 5 de Marzo 2017.

23. National Eye Institute (NEI). La Retinopatía Diabética. Lo que usted debe saber. Reviewed: Feb 2016. Recuperado de <https://nei.nih.gov/health/espanol/retinopatia> Fecha de consulta: 19 de Febrero 2017.
24. Pitocco D, Tesauro M, Alessandro R, Ghirlanda G, Cardillo C. Oxidative stress in diabetes: implications for vascular and other complications. *Int J Mol Sci.* 2013; 14(11): 21525-50.
25. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes-2007. *Diabetes care.* 2007; 30 (1): 4-41.
26. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. Neuropatías diabéticas: El daño de los nervios. Recuperado de <https://www.niddk.nih.gov/health-information/informacion-de-la-salud/diabetes/informacion-general/prevenir-problemas/neuropatias-diabeticas> Fecha de consulta: 22 de Abril 2017.
27. Mete T, Aydin Y, Saka M, Cinar Yavuz H, Bilen S, Yalcin Y, Arli B, Berker D, Guler S. Comparison of efficiencies of michigan neuropathy screening instrument, neurothesiometer, and electromyography for diagnosis of diabetic neuropathy. *Int J Endocrinol.* 2013; 2013: 821745.
28. Xiong Q, Lu B, Ye H, Wu X, Zhang T, Li Y. The Diagnostic Value of Neuropathy Symptom and Change Score, Neuropathy Impairment Score and Michigan Neuropathy Screening Instrument for Diabetic Peripheral Neuropathy. *Eur Neurol.* 2015; 74 (5-6): 323-7.
29. Mora C, Macía M, Martínez A, Górriz JL, De Álvaro F, J. Fisiopatología de la nefropatía diabética. *Nefro Plus.* 2018;1 (1): 28-38.
30. Rosas J, García E, Gómez FJ, Calles J. Prevención, diagnóstico y tratamiento temprano de la Nefropatía Diabética. *Rev ALAD.* 2009; 17 (3): 106-14.
31. Čolak E, Majkić N. The effect of hyperglycemia and oxidative stress on the development and progress of vascular complications in type 2 diabetes. *J Med Biochem.* 2009; 28(2): 63-71.
32. Lazo de la Vega ML, Fernández C. Oxidative Stress in Diabetes Mellitus and the Role Of Vitamins with Antioxidant Actions. En: Morales JA. *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants.* Rijeka, Croatia. InTech. 2013: 209-32.

33. Piconi L, Ihnat MA, Ceriello A. Oxidative stress in the pathogenesis/treatment of diabetes and its complications. *Curr Nutr Food Sci.* 2007; 3(3): 194-9.
34. Calderón JV, Muñoz EG, Quintanar MA. Estrés oxidativo y diabetes mellitus. *REB.* 2013; 32(2): 53-66.
35. Ahmadi F. Oxidative Stress and Antioxidants. *DJH.* 2011; 3(1): 1-11.
36. Vijay P, Vimukta S. The Role of Natural Antioxidants in Oxidative Stress Induced Diabetes Mellitus. *Res J of Pharmaceutical Sci.* 2014; 3(4): 1-6.
37. Montero M. Los Radicales Libres y las Defensas Antioxidantes. *Anales de la Fac de Med. Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.* 2014; 57(4): 278-81.
38. Al-Rawi NH. Diabetes, Oxidative Stress, Antioxidants and Saliva: A Review. En: Volodymyr I. Lushchak and Dmytro V. Gospodaryov. *Oxidative Stress and Diseases.* Rijeka Croatia. InTech. 2012: 303-10.
39. Opara EC. Oxidative stress, micronutrients, diabetes mellitus and its complications. *J R Soc Promot Health.* 2002;122(1): 28-34.
40. Díez J, Zalba G, San José G, Moreno MU. Papel del anión superóxido en la fisiopatología de las enfermedades vasculares. *Nefr (Madr.).* 2003; 23 (4): 13-20.
41. Andrea M, Vincent T, James W. Oxidative Stress in the pathogenesis of Diabetic Neuropathy. *Endocr Rev.* 2004; 25 (4): 612-28.
42. Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian J Clin Biochem.* 2015; 30(1): 11-26.
43. Gérard-Monnier D, Erdelmeier I, Régnard K, Moze N, Yadan JC, Chaudière J. Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chem Res Toxicol.* 1998; 11(10): 1176-83.
44. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Thu Nguyen A, Zingraff J, Jungers P, Descamps-Latscha B. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int.* 1996; 49 (5): 1304-13.

45. Villalpando D, Alvarez C, Gómez A. Productos avanzados de oxidación proteica (PAOP) y su relación con los factores de riesgo cardiovascular en jóvenes aparentemente sanos. *Clin Investig. Arterioscler.* 2017; 29 (5): 209-15.
46. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen Khoa T, Capeillère-Blandin C, Nguyen AT, Canteloup S, Dayer JM, Jungers P, Drüeke T, Descamps-Latscha B. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J Immunol.* 1998;161(5): 2524-32.
47. Aeschbach R, Amadò R, Neukom H. Formation of dityrosine cross-links in proteins by oxidation of tyrosine residues. *Biochim Biophys Acta.* 1976; 439(2): 292-301.
48. Wong JL, Wessel GM. Free-radical crosslinking of specific proteins alters the function of the egg extracellular matrix at fertilization. *The Company of Biologists Ltd.* 2007; 135 (3): 431-40.
49. Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide.* 2001; 5(1): 62-71.
50. Yucel AA, Gulen S, Dincer S, Yucel A.E, Yetkin GI. Comparison of two different applications of the Griess method for nitric oxide measurement. *JEIM.* 2012; 2(2): 167-71.
51. Tsikas D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007; 851: 51-70.
52. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci (Lond).* 1993; 84(4): 407-12.
53. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem.* 2004; 37(4): 277-85.
54. Konan KV, Le Tien C, Mateescu MA. Electrolysis-induced fast activation of the ABTS reagent for an antioxidant capacity assay. *Anal. Methods.* 2016; 8: 5638-44.

55. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem.* 2005; 38(12): 1103-11.
56. Karaagac L, Koruk ST, Koruk I, Aksoy N. Decreasing oxidative stress in response to treatment in patients with brucellosis: could it be used to monitor treatment? *Int J Infect Dis.* 2011; 15 (5): 346-349.
57. Komosińska-Vassev K, Olczyk K, Olczyk P, Winsz-Szczotka K. Effects of metabolic control and vascular complications on indices of oxidative stress in type 2 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract.* 2005; 68(3): 207-16.
58. Saxena R, Madhu SV, Shukla R, Prabhu KM, Gambhir JK. Postprandial hypertriglyceridemia and oxidative stress in patients of type 2 diabetes mellitus with macrovascular complications. *Clin Chim Acta.* 2005; 359(1-2): 101-8.
59. Tabak O, Gelisgen R, Erman H, Erdenen F, Muderrisoglu C, Aral H, Uzun H. Oxidative lipid, protein, and DNA damage as oxidative stress markers in vascular complications of diabetes mellitus. *Clin Invest Med.* 2011; 34(3): 163-71.
60. Bansal S, Chawla D, Siddarth M, Banerjee BD, Madhu SV, Tripathi AK. A study on serum advanced glycation end products and its association with oxidative stress and paraoxonase activity in type 2 diabetic patients with vascular complications. *Clin Biochem.* 2013; 46(1-2): 109-14.
61. Jakuš V, Sándorová E, Kalninová J, Krahulec B. Monitoring of glycation, oxidative stress and inflammation in relation to the occurrence of vascular complications in patients with type 2 diabetes mellitus. *Physiol Res.* 2014; 63(3): 297-309.
62. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev.* 2014; 2014: 1-31.
63. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med.* 1991; 11(1): 81-128.
64. Pitocco D, Zaccardi F, Di Stasio E, Romitelli F, Santini SA, Zuppi C, Ghirlanda G. Oxidative stress, nitric oxide, and diabetes. The review of diabetic studies: RDS. 2010; 7(1):15.
65. Liu SX, Hou FF, Guo ZJ, Nagai R, Zhang WR, Liu ZQ, Zhang X. Advanced oxidation protein products accelerate atherosclerosis through promoting

- oxidative stress and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26(5): 1156-1162.
66. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 2001; 414(6865): 813-20.
 67. Rosner B. Fundamentals of biostatistics. 7 Ed. Belmont, CA: Thomson-Brooks/Cole. 2006.
 68. Heredia RD, Fernández CD, Alfonso RJ, Rodríguez VE, Santana GL, Rodríguez M. Sistema antioxidante enzimático e indicadores de daño oxidativo en pacientes diabéticos tipo 2. *Rev Chil Endocrinol Diabetes.* 2014; 7(3): 94-8.
 69. Dabla PK. Renal function in diabetic nephropathy. *World J Diabetes.* 2010; 1(2): 48–56.
 70. Secretaria de salud. Toma de Medidas Clínicas y Antropométricas En el adulto y adulto mayor. Distrito Federal México. (2002). Recuperado de <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/documentos/DOCSAL7518.pdf> Fecha de consulta: 27 de Enero 2017.
 71. Centers for diseases control and prevention (CDC) .About Adult BMI. Clifton Road Atlanta, GA (USA). CDC. (2015). Recupero de https://www.cdc.gov/healthyweight/assessing/bmi/adult_bmi/index.html Fecha de consulta: 2 de Febrero 2017.
 72. Pan HZ, Zhang H, Chang D, Li H, Sui H. The change of oxidative stress products in diabetes mellitus and diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol* 2008; 92: 548-51.
 73. Kalousova M, Krha J, Zima T. Advanced glycation end-products and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus. *Physiol Res.* 2002; 51: 597-604.
 74. Gradinaru D, Borsa C, Ionescu C, Margina D: Advanced oxidative and glycoxidative protein damage markers in the elderly with Type 2 Diabetes. *J Proteomics.* 2013; 92: 313-322.
 75. León O. Biomarcadores Redox. Valor diagnóstico y aplicaciones clínicas. 1 Ed. La Habana, Cuba. 2010.
 76. Cakatay U. Protein oxidation parameters in type 2 diabetic patients with good and poor glycemic control. *Diabetes Metab.* 2005; 31: 551-7.

77. Savu O, Ionescu-Tirgoviste C, Atanasiu V, Gaman L, Papacocea R, Stoian I. Increase in total antioxidant capacity of plasma despite high levels of oxidative stress in uncomplicated type 2 diabetes mellitus. *J Int Med Res.* 2012; 40(2): 709-16.
78. Kharroubi AT, Darwish HM, Akkawi MA, Ashareef AA, Almasri ZA, Bader KA, Khammash UM. Total Antioxidant Status in Type 2 Diabetic Patients in Palestine. *J Diabetes Res.* 2015; 2015: 1-7.
79. Srivatsan R, Das S, Gadde R. "Antioxidants and lipid peroxidation status in diabetic patients with and without complications". *Arch Iran Med.* 2009; 12(2): 121-7.
80. Ganjifrockwala F, Joseph J, George G. Serum Oxidized LDL Levels in Type 2 Diabetic Patients with Retinopathy in Mthatha Region of the Eastern Cape Province of South Africa. *Oxid Med Cell Longev.* 2016; 2016: 1-8.
81. Kimura F, Hasegawa G, Obayashi H, Adachi T, Hara H, Ohta M, Fukui M, Kitagawa Y, Park H, Nakamura N, Nakano K, Yoshikawa T. Serum extracellular superoxide dismutase in patients with type 2 diabetes: relationship to the development of micro- and macrovascular complications. *Diabetes Care.* 2003; 26(4):1246-50.
82. Pieme CA, Tatangmo JA, Simo G, Biapa Nya PC, Ama Moor VJ, Moukette Moukette B, Tankeu Nzufo F, Njinkio Nono BL, Sobngwi E. Relationship between hyperglycemia, antioxidant capacity and some enzymatic and non-enzymatic antioxidants in African patients with type 2 diabetes. *BMC Res Notes.* 2017;10(1):141.
83. Gómez A, Martínez G, Ortega LE, Rodríguez E, Álvarez C. Rosuvastatina y metformina reducen la inflamación y el estrés oxidativo en pacientes con hipertensión y dislipemia. *Rev Esp Cardiol.* 2007; 60: 1242-9.
84. Zúñiga S, Rodríguez R, Yamamoto J, Juárez SC. Comparación de la eficacia de los iDPP4 actualmente disponibles y ventajas antihiper glucemiantes de linagliptina en pacientes con diabetes mellitus 2. *Med Int Méx.* 2015;31: 441-53.
85. Donmez G, Derici U, Erbas D, Arinsoy OA, Sindel S, Hasanoglu E. The effects of losartan and enalapril therapies on the levels of nitric oxide, malondialdehyde and glutathione in patients with essential hypertension. *Jpn J Physiol.* 2002; 52(5): 435-40.

86. Carrizales MS, Torres M. Lípidos séricos, ácidos grasos, peroxidación lipídica y óxido nítrico en pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2. Rev de la Fac de Ciencias de la Salud. U de Carabobo. 2012; 16 (2): 15-22.
87. Núñez R, Socarras E, González A Z, Chávez J, Cano C, Amell GA, Suárez LG. Determinación de agentes antioxidantes séricos en diabéticos tipo 2. Med Interna (Caracas). 2001; 17(4): 1-10.
88. Aydin A, Orhan H, Sayal A, Ozata M, Sahin G, İşimer A. Oxidative stress and nitric oxide related parameters in type II diabetes mellitus: effects of glycemic control. Clin Biochem. 2001; 34(1): 65-70.
89. Ozden S, Tatlipinar S, Biçer N, Yaylali V, Yildirim C, Ozbay D, Güner G. Basal serum nitric oxide levels in patients with type 2 diabetes mellitus and different stages of retinopathy. Can J Ophthalmol. 2003; 38(5): 393-6.

A N E X O S



ANEXO 1 CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA FACULTAD DE MEDICINA MEXICALI

Declaración de Consentimiento del Paciente para Participar en el Estudio

Título del Estudio: Marcadores de estrés oxidativo y su relación con las complicaciones microvasculares en pacientes con diabetes mellitus tipo 2

Médico del estudio:	Julio Alberto Robledo Vázquez
Nombre de la Institución:	Universidad Autónoma de Baja California, Facultad de Medicina Mexicali
Dirección:	Calle Dr. Humberto Torres S/N, Centro Cívico, Mexicali, B.C., C.P. 21000

Lea este documento detenidamente

Lo estamos invitando a participar en un estudio de investigación. Antes de decidir participar, necesita entender por qué se lleva a cabo la investigación y qué implicará. Pregúntenos si hay algún aspecto que no esté claro o si desea más información. Estamos a su disposición para responder cualquier pregunta que tenga ahora o en cualquier momento durante el estudio.

¿Cuál es el propósito del Estudio?

El estudio tiene la finalidad de esclarecer la relación de la enfermedad diabetes mellitus tipo 2 con el estrés oxidativo, siendo este denominado como el desbalance asociado a un gran cantidad de enfermedades debido a los daños que ocasiona a ciertas biomoléculas de interés, por ello los valores obtenidos por los marcadores evaluados nos permitan inferir el daño molecular que ocurre en los pacientes a partir del estado del paciente diabético y sus respectivas complicaciones microvasculares.

Se ha de tomar en cuenta que el estudio cobra relevancia tras ser generado en una población que actualmente no ha sido estudiada con estas variables, además de que la población en cuestión evaluada se ve altamente afectada por la enfermedad debido a una serie de factores, los cuales involucran el estilo de vida de los pacientes así como su predisposición poblacional.

El objetivo de este estudio es obtener valores que permitan interpretar como las diversas complicaciones microvasculares de los pacientes con DMT2 generan cambios en los marcadores de estrés oxidativo.

Se le invita a que participe en este estudio porque usted tiene DMT2. Participarán en este estudio aproximadamente 50 pacientes de la localidad. Mientras participe en este estudio, no podrá participar en ningún otro estudio de investigación médica.

Introducción

Se define como diabetes a la enfermedad crónica que no permite al paciente generar insulina o en su defecto no usarla de manera adecuada en su organismo. La diabetes mellitus tipo 2 está asociada al estado crónico de hiperglicemia, así mismo guarda relación con la resistencia a la insulina en los tejidos, esto a su vez condiciona a generar desordenes en el metabolismo de la glucosa, algunos ejemplos serian la activación de la vía del poliol, la generación de productos de glicosilación avanzados (PGA), la activación de diversas proteínas quinasa C e incremento en la vía de las hexosaminas.

Estos procesos en el metabolismo tienden a generar un incremento en las especies reactivas de oxígeno (EROs) que se encuentran en el organismo, se menciona que la hiperglicemia es un factor de desarrollo de moléculas como el anión superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) algunos ejemplos de EROs, por lo cual predisponen a ser puntos de relevancia en la formación del desbalance oxidativo, permitiendo inferir que la generación de estrés oxidativo está en función del estado de hiperglicemia y de resistencia a la insulina.

Cómo se Realizará esta Investigación

Se conformarán de acuerdo al cumplimiento de los criterios de inclusión 4 grupos, de los cuales estarán considerados el grupo de pacientes aparentemente sanos, el grupo de pacientes con diabetes mellitus sin complicaciones microvasculares, así también existirá otros 2 grupos acorde a la cantidad de complicaciones microvasculares que presenten 1 y 2 complicaciones.

Usted será incluido en el grupo acorde a la selección y cumplimiento de los criterios de inclusión del estudio. Se le tomará dos muestras sanguíneas para la cuantificación sérica de los parámetros bioquímicos y estrés oxidativo.

Beneficios

Usted puede obtener el beneficio de conocer sus niveles de glucosa, triglicéridos, colesterol total, HDL-Colesterol, LDL-Colesterol, creatinina y hemoglobina glucosilada, además de sus niveles de malondialdehído (MDA), productos avanzados de oxidación de proteínas (PAOP), óxido nítrico (NO), capacidad

antioxidante total (CAT) y capacidad oxidante total (COT) y con ello obtener un índice de estrés oxidativo (IEO).

El propósito de este estudio es determinar si existen diferencias significativas en los marcadores de estrés oxidativo en relación a la cantidad de complicaciones microvasculares que presentan los pacientes con DMT2.

Riesgos del Estudio

Sobre la toma de muestra hay un riesgo de sangrado mínimo y de dolor al puncionar la vena.

Derechos del Sujeto de Investigación

En cualquier momento, usted tiene derecho a retirarse del estudio si así lo decide, lo que podrá hacer sin que represente alguna alteración en su atención médica. Es totalmente voluntaria su participación y se le dará tiempo para leer esta información, pensar en ello, meditarla y decidir al momento de la entrevista o en una próxima consulta, si desea participar en el estudio. Usted está en libertad de hacer todas las preguntas que desee y a que se le aclaren todas las dudas que pudiera tener sobre su participación en esta investigación. También tiene derecho a dirigirse a otras personas del equipo de investigadores.

Compensación

En el presente estudio su participación es voluntaria, por lo que no existe una compensación económica o en especie por su colaboración. Por otro lado, su contribución en el estudio, será compensada por los beneficios que se derivan del mismo como se comentó previamente.

Confidencialidad

Los datos obtenidos en el presente estudio serán confidenciales, no se le identificará su persona en los reportes o publicaciones que se deriven del mismo. Puede solicitar información de los datos que se obtenga con su participación en cualquier momento durante el estudio o al finalizar el mismo.

Bajo las condiciones arriba mencionadas accedo a participar voluntariamente.

Nombre y firma del **Paciente**: _____

Dirección: _____

Fecha: _____ Teléfono: _____

Nombre y firma del **Testigo 1**: _____

Dirección: _____

Fecha: _____ Teléfono: _____

Nombre y firma del **Testigo 2:** _____

Dirección: _____

Fecha: _____ Teléfono: _____

Nombre y firma del **Investigador:** _____

Dirección: _____

Fecha: _____ Teléfono: _____

ANEXO 2

	UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA Facultad de Medicina Mexicali Formato para recolección de datos clínicos, antropométricos y de laboratorio	Fecha:
	“Marcadores de estrés oxidativo y su relación con las complicaciones microvasculares en pacientes con diabetes mellitus tipo 2”	

Nombre completo del paciente: _____

Edad: _____ Género: _____ Peso: _____

Talla: _____ IMC: _____

Tiempo de Dx de diabetes mellitus tipo 2 (DMT2): _____

Antecedentes de importancia: _____

Antecedentes patológicos: _____

Hipertensión: SI _____ NO _____

Uso de antihipertensivos: _____ Cuáles: _____

Desde cuándo: _____

Dislipidemia: SI _____ NO _____

Uso de hipolipemiantes: _____ Cuáles: _____

Desde cuándo: _____

Uso de suplementos/antioxidantes: _____

Cuales: _____

Desde cuándo: _____

Uso de otros fármacos: _____ Cuáles: _____

Desde cuándo: _____

	UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA Facultad de Medicina Mexicali Formato para recolección de datos clínicos, antropométricos y de laboratorio	Fecha:
	“Marcadores de estrés oxidativo y su relación con las complicaciones microvasculares en pacientes con diabetes mellitus tipo 2”	

Presencia de complicaciones microvasculares propias de la DMT2

Nefropatía: _____ Fecha de diagnóstico: _____

Prueba realizada: _____ Resultado: _____

Retinopatía: _____ Fecha diagnóstico: _____

Prueba realizada: _____ Resultado: _____

Neuropatía: _____ Fecha diagnóstico: _____

Prueba realizada: _____ Resultado: _____

Observaciones:
