



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
ÁREA ACADÉMICA DE NUTRICIÓN

“EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON VITAMINA E Y
GLICINA SOBRE EL DAÑO OXIDATIVO Y RENDIMIENTO
FÍSICO EN RATAS DURANTE EL EJERCICIO AERÓBICO”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN NUTRICIÓN

PRESENTA
ALBA MARÍA FERNÁNDEZ SÁNCHEZ

DIRECTOR DE TESIS:
DR. JOSÉ ANTONIO MORALES GONZÁLEZ

CODIRECTOR:
DR. ABELARDO CAMACHO LUIS

PACHUCA, HGO., MAYO DE 2008





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



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

"Efecto de la Suplementación con Vitamina E y Glicina Sobre el Daño Oxidativo y Rendimiento Físico en Ratas Durante el Ejercicio Aeróbico"

Que para obtener el Título de Licenciado de Nutrición sustenta la Pasante

C. Alba María Fernández Sánchez

ATENTAMENTE
Pachuca, Hidalgo, 27 de Marzo del 2008
"Amor, Orden y Progreso"

PRESIDENTE DEL JURADO	QFB. ZURISSADAI BETANZOS PALMEROS
SECRETARIO DE JURADO	L. NUTR. MARTHA PATRICIA REYES RAMÍREZ
1er. VOCAL DEL JURADO	DR. EDUARDO OSIRIS MADRIGAL SANTILLÁN
2º VOCAL DEL JURADO	DR. ABELARDO CAMACHO LUÍS
3er. VOCAL DEL JURADO	DR. JOSÉ ANTONIO MORALES GONZÁLEZ
SUPLENTE	DRA. ALEJANDRA CERUELOS HERNÁNDEZ
SUPLENTE	M. EN NH. AMANDA PEÑA IRECTA

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por la vida, salud, por la familia a la cual pertenezco, gracias por las experiencias y las personas que ha puesto en mi camino.

A mi Papá que aunque ya no me acompaña físicamente, siempre esta en mi corazón y en mis pensamientos

A la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, gracias a mis profesores por los conocimientos que me transmitieron y por su dedicación, puedo decir con orgullo que soy egresada de la UAEH.

Al Dr. José Gutiérrez Salinas y sus colaboradores por su valiosa ayuda.

A mi Madre por ser el pilar de mi familia, gracias por procurar mi sustento y mi educación, por ser la persona valiente y recta que siempre me has demostrado ser. Agradezco tu infinito cariño a pesar de todo, tu paciencia, tus cuidados y apoyo.

A Dalia y Gabriel, por la dicha de compartir algo más que los apellidos, por estar juntos en las buenas y en las malas. Los quiero mucho.

A José Antonio, por la oportunidad de trabajar con él, le agradezco que compartiera sus conocimientos, la confianza, sinceridad, pero sobretodo por su amistad. De igual manera agradezco el apoyo, paciencia y las valiosas aportaciones a mi trabajo del Dr. Abelardo Camacho.

A los miembros del jurado por su interés y sugerencias para el enriquecimiento de este trabajo de investigación.

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

Este trabajo fue apoyado parcialmente por el donativo de PROMEP UAEHGO-PCT-334 (primer y segundo año) y el PAI-UAEH (55B).

ÍNDICE

I. RESUMEN.....	1
II. MARCO TEÓRICO.....	3
1. Radicales libres	3
1.1. Principales RL derivados del oxígeno.....	4
1.1.1. Anión superóxido.....	4
1.1.2. Peróxido de hidrógeno.....	4
1.1.3. Radical hidroxilo.....	5
1.1.4. Radical peroxilo.....	5
1.1.5. Oxígeno singulete.....	5
1.2. Mecanismos de formación de los RL.....	6
1.2.1. Fuentes exógenas.....	6
1.2.2. Fuentes endógenas.....	6
1.2.2.1. Mitocondria.....	6
1.2.2.2. Peroxisoma.....	7
1.2.2.3. Leucocitos.....	8
1.2.2.4. Retículo endoplásmico.....	8
2. Estrés oxidativo.....	8
2.1. Estrés oxidativo y daño a las biomoléculas.....	9
2.1.1. Peroxidación lípida.....	9
2.1.2. Daño a las proteínas.....	10
2.1.3. Daño al ADN.....	11
2.1.4. Daño a los hidratos de carbono.....	11
2.2. Métodos de evaluación de estrés oxidativo.....	12
3. Antioxidantes.....	13
3.1. Sistemas primarios de defensa antioxidante.....	13
3.1.1. Superóxido dismutasa.....	13
3.1.2. Catalasa.....	14
3.1.3. Glutación peroxidasa.....	14
3.1.4. Proteínas ligadoras de metales.....	14
3.2. Sistemas secundarios de defensa antioxidante.....	15
3.2.1. Glutación.....	15
3.2.2. Vitamina E.....	15
3.2.3. Vitamina C.....	17

3.2.4. Glicina.....	18
3.2.5. Ácido úrico.....	19
3.3. Sistemas terciarios de defensa antioxidante.....	20
4. Ejercicio aeróbico.....	20
4.1. Efectos fisiológicos del ejercicio.....	20
4.2. Formación de RL durante el ejercicio.....	21
4.2.1. Mitocondria.....	21
4.2.2. Catecolaminas.....	22
4.2.3. Ácido úrico.....	22
4.2.4. Xantinaoxidasa.....	22
4.2.5. Peroxisomas.....	23
4.2.6. Células fagocíticas.....	23
4.2.7. Alteraciones en la homeostasis de calcio.....	23
5. Enzimas séricas como marcadores biopatológicos.....	24
5.1. Factores que determinan el aumento de la actividad enzimática.....	24
III. ANTECEDENTES.....	26
IV. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	31
V. JUSTIFICACIÓN.....	32
VI. OBJETIVOS.....	33
1. General.....	33
2. Específicos.....	33
VII. HIPÓTESIS.....	34
VIII. MATERIAL Y METODOS.....	35
1. Animales.....	35
1.1. Grupos experimentales.....	35
1.2. Suplementación.....	35
1.3. Actividad física y determinación del rendimiento físico.....	36
2. Obtención y preparación de muestras.....	36
2.1. Suero.....	36
2.2. Tejidos.....	36
3. Métodos.....	37
3.1. Determinación de metabolitos séricos.....	37
3.2. Ensayo enzimático en suero.....	37
3.3. Cuantificación de MDA.....	37

3.4. Determinación de la actividad específica de la SOD.....	37
4. Análisis estadístico.....	38
IX. RESULTADOS	39
1. Actividad específica de la superóxido dismutasa (SOD).....	39
2. Concentración de malondialdehído (MDA).....	41
3. Ensayo enzimático en suero.....	43
3.1. Actividad específica de la ALT.....	43
3.2. Actividad específica de la AST.....	44
4. Efecto de la suplementación con antioxidantes y la AF sobre la concentración de los metabolitos sérico.....	45
4.1. Concentración sérica de glucosa	46
4.2. Concentración sérica de albúmina	48
4.3. Concentración sérica de bilirrubina	50
4.4. Concentración sérica de triglicéridos (TG)	51
5. Determinación del rendimiento físico.....	52
X. DISCUSIÓN.....	54
XI. CONCLUSIONES.....	59
XII. BIBLIOGRAFÍA.....	60
XIII. ANEXOS.....	67
1. Determinación cuantitativa de glucosa.....	67
2. Determinación cuantitativa de albúmina.....	68
3. Determinación cuantitativa de bilirrubina total.....	69
4. Determinación cuantitativa de triglicéridos.....	70
5. Determinación cuantitativa de alanino aminotransferasa (ALT).....	71
6. Determinación cuantitativa de aspartato aminotransferasa (AST).....	72
7. Determinación de la concentración de albumina bovina.....	73

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales RL y pro-radicales libres derivados del O ₂	4
Tabla 2. Efecto de la AF y la suplementación con vitamina E y/o glicina sobre la concentración de los metabolitos séricos.....	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Producción de RL durante la cadena respiratoria.....	7
Figura 2. Reacciones de peroxidación lípidica.....	9
Figura 3. Estructura química de la vitamina E.....	16
Figura 4. Oxidación de la vitamina E por RL y su reducción por vitamina C.....	17
Figura 5. Estructura química de la glicina.....	18
Figura 6. Efecto de la suplementación con antioxidantes y la AF sobre la actividad de la enzima SOD en diferentes tejidos de ratas.....	40
Figura 7. Efecto de la suplementación con antioxidantes y la AF sobre la concentración de MDA en diferentes tejidos de ratas.....	42
Figura 8. Efecto de la suplementación con antioxidantes y la AF sobre la actividad sérica de la enzima ALT.....	43
Figura 9. Efecto de la suplementación con antioxidantes y la AF sobre la actividad sérica de la enzima AST.....	44
Figura 10. Efecto de la suplementación con los antioxidantes y la AF sobre la concentración sérica de glucosa.....	47
Figura 11. Efecto de la suplementación con los antioxidantes y de la AF sobre la concentración sérica de albúmina.....	49
Figura 12. Efecto de la suplementación con antioxidantes y la AF sobre la concentración sérica de bilirrubina.....	50
Figura 13. Efecto de la suplementación con los antioxidantes y la AF sobre la concentración sérica de triglicéridos (TG).....	51
Figura 14. Efecto de la suplementación con antioxidantes sobre el rendimiento físico en ratas durante el ejercicio aeróbico.....	53

I. RESUMEN

Durante el ejercicio aeróbico se incrementa el consumo de oxígeno y a su vez la producción de radicales libres, ésta condición puede generar una elevación en las reacciones de peroxidación así como daño a las biomoléculas del organismo, es importante mencionar que la magnitud del daño esta condicionada por la presencia de sistemas antioxidantes tanto endógenos como exógenos. También se conoce que el ejercicio habitual podría mejorar las defensas antioxidantes de los deportistas, aunque no se ha determinado a ciencia cierta si tal protección es suficiente para contrarrestar la gran cantidad de agentes oxidantes que se producen. Se han realizado múltiples investigaciones para observar el efecto benéfico de la suplementación con sustancias antioxidantes sobre parámetros de oxidación. El objetivo del presente estudio fue investigar el efecto protector de la vitamina E y de la glicina contra el estrés oxidativo que se produce durante el ejercicio aeróbico. A ratas macho wistar se les organizó en ocho grupos, 1. No suplementado, no realizó actividad física (Control) 2. Suplementación con vitamina E (VE), 3. Suplementación con glicina (Gly), 4. Suplementación con vitamina E + suplementación con glicina (VE+Gly), 5. Solamente realizó actividad física (AF) 6. AF + suplementación de vitamina E (AF+VE), 7. AF + suplementación de glicina (AF+Gly), 8. AF + suplementación de vitamina E + suplementación de glicina (AF+VE+Gly), a los cuales se les mantuvo en el tratamiento respectivo durante un mes. La dosis de vitamina E fue de 400 UI y la de glicina de 0.6g/Kg/día.

Para examinar el efecto del ejercicio aeróbico sobre el nivel de oxidación, se analizaron los niveles de MDA así como la actividad de la SOD y de enzimas que son marcadores de daño celular (AST y ALT). De igual manera se analizaron los niveles de metabolitos séricos (glucosa, albúmina, bilirrubina y triglicéridos), de igual manera se tomo en cuenta el rendimiento físico que las ratas presentaron a lo largo del estudio.

La administración de los antioxidantes no modifico de manera importante los niveles de metabolitos séricos. La suplementación fue efectiva para disminuir los niveles de MDA y presencia de enzimas AST y ALT que se habían visto incrementadas durante el ejercicio aeróbico. De igual manera la suplementación con los antioxidantes fue efectiva para incrementar la actividad de la SOD. Se comprobó el efecto protector de los antioxidantes sobre el daño oxidativo generado por el ejercicio aeróbico. No se pudo determinar un efecto positivo sobre el rendimiento físico.

Palabras clave: **radicales libres, ejercicio aeróbico, vitamina E, glicina.**

SUMMARY

During the aerobic exercise the oxygen consumption is increased and so is the production of free radicals, this condition can as well generate an elevation in the peroxidation reactions as well as to bimolecular damage of the organism, it is important to mention that the magnitude of the damage this conditional by the presence of systems endogenous antioxidants as well as exogenous. Combined with the previous thing, it is also known that the habitual exercise could improve the defenses antioxidants of the sportsmen, although it has not been determined for sure if such protection is sufficient to resist the great amount of oxidizing agents which take place. Multiple investigations have been realised where the beneficial effect of the suplementación with substances has been observed with antioxidants on oxidation parameters. The objective of the present study was to investigate the protective effect of the vitamin E and glycine against the oxidative stress that takes place during the aerobic exercise. Male Wistar rats was divided to them in eight groups, 1. Not supplemented, do not realise physical activity (Control) 2. Supplementation with vitamin E (Vit E), 3. Supplementation with glycine (Gly), 4. Supplementation with vitamin E + supplementation with glycine (VE+Gly), 5. Only realised physical activity (AF) 6. Physical activity + supplementation of vitamin E (AF+VE), 7. Physical activity + supplementation of wisteria (AF+Gly), 8. Physical activity + supplementation of vitamin E + supplementation of glycine (AF+VE+Gly), to which was given to them in respective treatment for a month.

In order to examine the effect of the aerobic exercise on the oxidation level, the levels of MDA, as well as the activity of the SOD and enzymes of cellular damage were analyzed (AST and ALT). Of equal way the levels of metabolites series (glucose, albumin, bilirubin and TG), another point of great importance that take into account is the physical yield that the rats presented throughout the study.

The administration of antioxidants do not modify of important way the metabolites series. On the other hand the suplementación was effective to diminish the levels of MDA and the enzymes AST and ALT that had been increased during the aerobic exercise. Of equal way the suplementation with antioxidants was effective to increase the activity of the SOD. The protective effect of antioxidants was verified on the oxidative damage generated by the aerobic exercise. A positive effect could not be determined on the physical yield.

Key words: free radicals, aerobic exercise, vitamin E, glycine.

II. MARCO TEÓRICO

Gracias al oxígeno (O_2) los organismos aeróbicos pueden obtener energía de los alimentos por medio de procesos como la beta-oxidación, glucólisis, ciclo de Krebs y de la respiración celular (1,2). Durante dichos procesos se llevan a cabo reacciones llamadas de óxido-reducción ya que generalmente una reacción de oxidación se acompaña de otra de reducción. Oxidación es todo proceso en el que ocurre una pérdida de electrones, captación de O_2 o una cesión de hidrógeno (H) y reducción es aquel proceso en el cual se captan electrones o se pierde O_2 (3).

Los organismos superiores como el ser humano, no pueden existir sin el oxígeno; sin embargo, a su vez éste es peligroso para su existencia (2), Gersham y Gilbert (1964) propusieron que los efectos nocivos del oxígeno se debían a los radicales libres (RL) y a las especies reactivas de oxígeno (EROS) que se originaban de él (4), se sabe que en la cadena respiratoria el complejo citocromo-oxidasa reduce el O_2 que utiliza el organismo en agua (H_2O). Se estima que del 4-5% del oxígeno consumido durante la respiración no es completamente reducido a agua formando así los radicales libres (5).

1. RADICALES LIBRES

Se denomina radical libre a todo átomo o molécula capaz de existir independientemente de otra y que contiene un electrón desapareado en su orbital más externo. Dicha característica lo vuelve inestable, de vida efímera, por lo que reaccionan con diversas moléculas como hidratos de carbono, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos así como con sus derivados, oxidándolos y atacando sus estructuras. Debido a la reactividad oxidante para otras especies también se les conoce como especies reactivas, dentro de las cuales las más importantes a nivel celular son las derivadas del oxígeno (Tabla 1) y del nitrógeno. Existen también otras sustancias que no siendo RL, tienen la posibilidad de convertirse o generar radicales libres por su alta inestabilidad, a estas sustancias se les llama pro-radical libre.

Para que una célula se vea dañada, los radicales libres deben llevar a cabo tres pasos: 1) Iniciación. Es la producción inicial de los radicales libres ya sea por fuentes endógenas o exógenas; 2) Propagación. Cuando los RL producen otros

RL y éstos a su vez atacan otras moléculas provocando daño celular; 3) Terminación. Al término de las reacciones se producen metabolitos secundarios, los cuales deben ser eliminados por la célula (6,7,8).

Tabla 1. Principales RL y pro-radicales libres derivados del O₂

ESPECIES REACTIVAS DERIVADAS DEL OXÍGENO	
Radical libre	Pro-radical
Superóxido (O ₂ ^{•-})	Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)
Radical hidroxilo (•OH)	Ácido hipocloroso (HOCl)
Radical peroxilo (R-O ₂ [•])	Ácido hipobromoso (HOBr)
Radical alcoxilo (RO [•])	Ozono (O ₃)
Hidroperoxilo (HO ₂ [•])	Oxígeno Singulete (¹ O ₂)

(Modificado de Gutiérrez, 2007)

1.1. Principales RL derivados del oxígeno

1.1.1 Anión superóxido (O₂^{•-})

Este radical libre resulta de la reducción de la molécula de O₂ por parte de un electrón. Es relativamente poco reactivo, pero potencialmente tóxico, ya que puede iniciar reacciones que den lugar a otros intermediarios a su vez muy reactivos. Puede formarse como producto de muchas reacciones catalizadas enzimáticamente, también en reacciones no enzimáticas del O₂ con la cisteína o la riboflavina, o bien se produce en la cadena respiratoria mitocondrial (4,9)

1.1.2. Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

Es el estado de reducción de dos electrones del oxígeno, se forma a partir del radical O₂^{•-} por dismutación, o directamente del O₂.



No es un radical libre, pero su toxicidad es importante ya que atraviesa fácilmente las membranas. Muchas enzimas como la superóxido dismutasa, glucosa oxidasa, la D-aminoácido oxidasa y la uricasa, producen H₂O₂ a partir de O₂. El peróxido de hidrógeno, también puede producirse por reacciones químicas, como la autooxidación del ácido ascórbico catalizada por el cobre. Éste pro-radical se convierte en agua por acción de la catalasa (4,9,10).

1.1.3. Radical hidroxilo ([•]OH)

Es el estado de reducción de tres electrones de la molécula de O₂. Es la especie más reactiva. Puede generarse *in vivo* como consecuencia de radiaciones de alta energía, la luz ultra violeta puede dividir el H₂O₂ en 2 moléculas de radical hidroxilo.

Otro proceso todavía más importante en la formación del radical hidroxilo es la llamada reacción de Fenton:



También a partir de H₂O₂ y del radical superóxido puede formarse el radical hidroxilo, por la Reacción de Haber-Weiss, la cual es catalizada por metales como hierro o cobre:



(4,10).

1.1.4. Radical peroxilo (RO₂[•])

Formado a partir de hidroperóxidos orgánicos, por ejemplo lípidos, o RO₂H por pérdida de hidrógeno. Tiene una vida media relativamente larga.

1.1.5. Oxígeno singulete (¹O₂)

Es una forma excitada del oxígeno molecular. No es un radical libre y se forma *in vivo* por acción de la luz sobre las moléculas de oxígeno. Puede formarse en la oxidación del NADPH en los microsomas, o por la actividad de varias enzimas como la xantina oxidasa, la lactoperoxidasa, lipooxigenasa y prostanglandinsintetasa, entre otras (9).

1.2. Mecanismos de formación de RL

Los RL son originados de manera endógena por el organismo, pero pueden tener también distintas fuentes exógenas.

1.2.1. Fuentes exógenas de RL

La exposición a radiaciones ionizantes, luz Ultra Violeta, humo de cigarro, hiperoxia, ozono, óxido nítrico (NO), metales pesados, hidrocarburos halogenados, drogas como el tabaco y el alcohol, así como el ejercicio excesivo, son algunas de las fuentes exógenas que dan lugar a la formación de radicales libres (1,11).

1.2.2. Fuentes endógenas (biológicas) de RL

1.2.2.1 Mitocondria: Durante la cadena respiratoria (Figura 1), que se lleva a cabo en la membrana interna de la mitocondria el O₂ actúa como aceptor de electrones para formar H₂O. Dicho proceso se inicia cuando un protón y un electrón son removidos de las moléculas de nicotinamin adenin dinucleótido reducido (NADH), el electrón se trasfiere a la cadena respiratoria mientras que el protón se libera en el fluido circulante. De esta forma en NADH se oxida en NAD⁺. La cadena respiratoria lleva a cabo la transferencia del electrón hasta que finalmente es unido a una molécula de O₂ dando origen a una molécula de agua al final de la cadena. Durante este proceso los radicales libres se forman como productos intermedios (7,12).

La reducción de O₂ a H₂O se lleva a cabo en 4 pasos durante los que se producen las EROS:

1. $O_2 + e \rightarrow O_2^{\cdot -}$ Radical superóxido
2. $O_2^{\cdot -} + H_2O \rightarrow HO_2^{\cdot}$ Radical peroxhidrilo
3. $HO_2^{\cdot} + e + H \rightarrow H_2O_2$ Peróxido de hidrógeno
4. $H_2O_2 + e \rightarrow \cdot OH + \cdot OH$ Radical Hidroxilo (2,5).

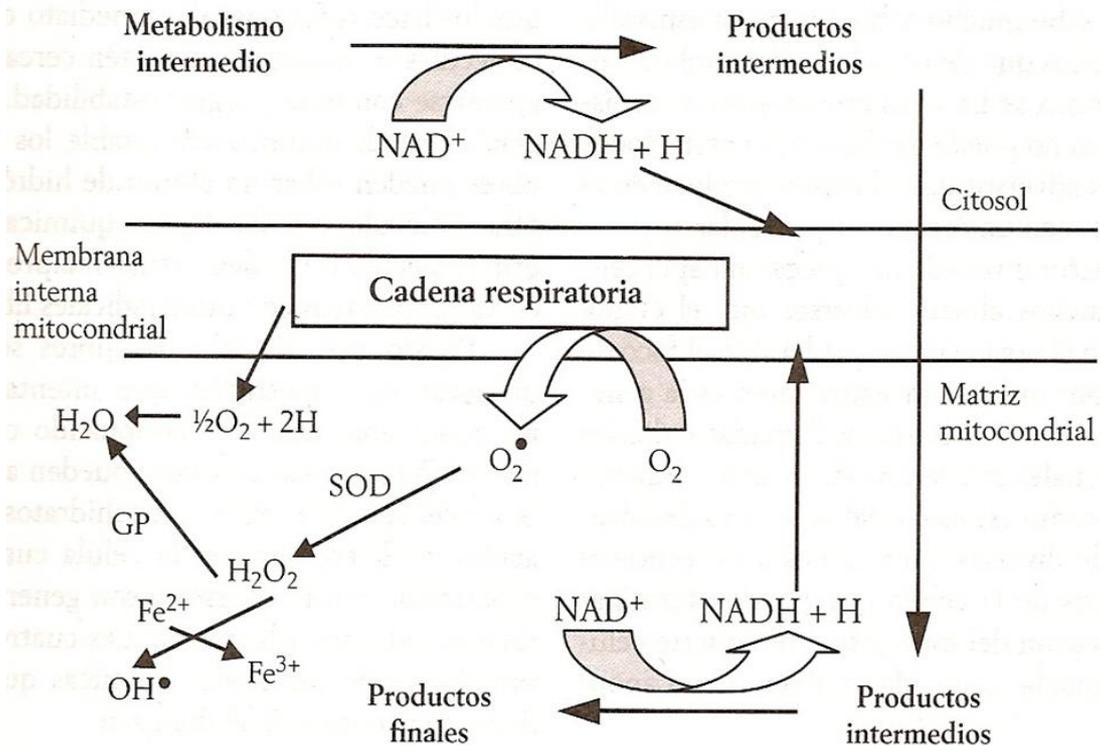


Figura 1. Producción de RL durante la cadena respiratoria. (Tomado de Gutiérrez, 2007).

Dentro de la mitocondria encontramos el sistema hipoxantina/xantina oxidasa (XO), la cual actúa como una deshidrogenasa que en condiciones normales remueve hidrógeno de la xantina o de la hipoxantina usando como cofactor una molécula de NAD^+ la cual es convertida en NADH . En condiciones de hipoxia esta enzima es capaz de producir superóxido por intervención de una molécula H_2O_2 (7,8).

1.2.2.2. Peroxisomas: Los peroxisomas son ricos en oxidasa como la D-aminoácido oxidasa y la acil-CoA oxidasa, enzimas utilizadas en la degradación de ácidos grasos y aminoácidos, que producen H_2O_2 como producto de la reacción que catalizan, por lo que se consideran una fuente importante de éste radical. La catalasa peroxisomal metaboliza la mayor parte del H_2O_2 formado en ellos (9,12,13).

1.2.2.3. Leucocitos (polimorfonucleares): Activados por las interleucinas, estos leucocitos tienen en su membrana NADPH oxidasa generadora de O_2 pero que en presencia de Fe^{2+} originan $\cdot OH$ (12).

1.2.2.4. Retículo endoplásmico: En el retículo endoplásmico existen sistemas de transporte electrónico, estos sistemas de membrana contienen los citocromos P450 y b5, que pueden oxidar ácidos grasos insaturados y xenobióticos. Dichos citocromos son los más poderosos oxidantes *in vivo*, aunque también pueden actuar como agentes reductores. Son monooxigenasas que actúan activando el oxígeno molecular a especies electrofílicas de oxígeno (radicales o generadoras a su vez de radicales) que pueden ser liberadas en la célula (9,14,15).

2. ESTRÉS OXIDATIVO

En la célula existe balance entre prooxidantes y antioxidantes, este balance puede inclinarse hacia los prooxidantes cuando la producción de EROS aumenta de modo considerable. Un prooxidante es un compuesto químico y aquellas reacciones que puedan generar EROS, por otro lado, las reacciones y compuestos que eliminan estas especies se les conoce como antioxidantes. Los RL se originan en situaciones fisiológicas controladas pero al aumentar su producción en un proceso patológico o durante el ejercicio extenuante puede llegar a un estado de estrés oxidativo (12).

Estrés oxidativo se define como un trastorno en el estado de equilibrio de los sistemas prooxidante/antioxidante en la célula, inclinándose hacia los prooxidantes, por lo que se produce daño generalizado que afecta los procesos metabólicos de la célula (9). Por su alta inestabilidad atómica, los RL colisionan con una biomolécula y le sustraen un electrón, oxidándola, perdiendo de esta manera su función específica en la célula. La producción de EROS de manera incontrolada puede ser fuente de enfermedades debido a que altera los procesos celulares (1,3).

2.1 Estrés oxidativo y daño a las biomoléculas

2.1.1. Peroxidación lipídica

Es una reacción en cadena, autopropagante, en la cual los radicales $\cdot\text{OH}$, $\text{HO}_2\cdot$ y el $^1\text{O}_2$ pueden reaccionar con los ácidos grasos de los fosfolípidos y otros componentes lipídicos de las membranas para formar hidroperóxidos lipídicos. El proceso de ataque oxidativo (Figura 2), comienza cuando un radical libre ataca a un carbono de la cadena alifática de un ácido graso, le desprende un átomo de hidrógeno, formando un radical alquílico. Este radical centrado en un átomo de carbono reacciona con el O_2 y forma un radical peróxido, $\text{R-CO}_2\cdot$. Los radicales peróxido pueden reaccionar con cadenas laterales de otros ácidos grasos poliinsaturados adyacentes formando un radical alquílico ($\text{R}'\text{-CH}'\cdot$) y un peróxido lipídico ($\text{R-CO}_2\text{H}$), con lo que se propaga la reacción en cadena. La oxidación de los lípidos membranales provoca alteraciones a su permeabilidad, así como pérdida de la integridad de la misma (13,19).

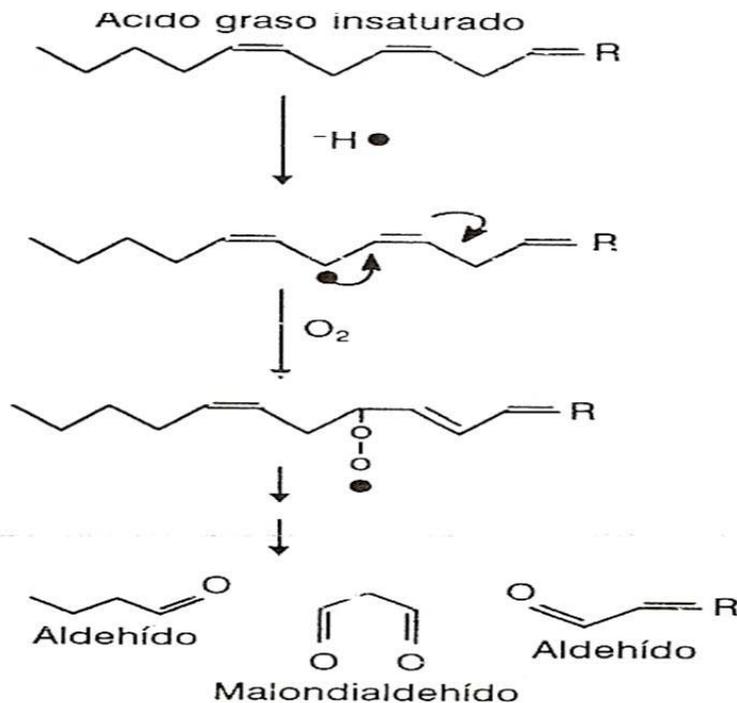


Figura 2. Reacciones de peroxidación lipídica (Tomado de Thomas. 2002.)

Los productos finales de la peroxidación lípida como los hidrocarburos volátiles, alcoholes o aldehídos pueden desplazarse a otros sitios y alterar la permeabilidad vascular, la respuesta inflamatoria y la quimiotaxis. El malondialdehído (MDA) es un producto de la peroxidación y se utiliza como medida de estrés oxidativo, puede causar entrecruzamiento y polimerización de los componentes de las membranas, de igual forma puede reaccionar con las bases nitrogenadas del ADN. Se ha observado que la lipoperoxidación tiene efectos sobre las lipoproteínas plasmáticas en especial con las de baja densidad (LDL) (4,6,20).

2.2.2 Daño a las proteínas

Los aminoácidos presentes en las proteínas son susceptibles de ser atacados por los RL, especialmente aquellos que contienen grupos insaturados o azufre. Por consiguiente las proteínas con alto contenido de fenilalanina, histidina, tirosina, triptófano, cisteína y metionina son más susceptibles a ser atacadas. Radicales agresivos como el radical $\cdot\text{OH}$, pueden fragmentar las cadenas peptídicas de las proteínas incluyendo a las plasmáticas, dando lugar a un cambio conformacional de la proteína y por lo tanto una pérdida en su función biológica. En condiciones aeróbicas los RL provocan una gran fragmentación de la cadena peptídica, el daño puede ser irreversible y conduce a la desnaturalización de la proteína. En los procesos de daño oxidativo a proteínas, algunos aminoácidos como lisina, prolina y arginina, se oxidan dando lugar a grupos carbonilo, el cual puede ser utilizado con un marcador de daño oxidativo. Otros aminoácidos como la histidina, cisteína y metionina, también sufren daño oxidativo, pero no forman derivados de tipo carbonilo (4,6,21,22).

Algunas enzimas antioxidantes por su naturaleza proteica pueden verse afectadas por el ataque de los RL, la catalasa (CAT) es inhibida por los radicales superóxido, que la convierten a sus formas inactivas ferroxí y ferrilo, a su vez la superóxido dismutasa (SOD) cuya actividad depende de estos aminoácidos aromáticos se inhibe en presencia de ciertos RL (4,6,21).

2.1.3. Daño al ADN

El ADN es susceptible de ataque oxidativo por parte de los RL, los cuales producen modificaciones químicas sobre sus bases y azúcares, provocando entrecruzamiento o ruptura de las hebras del mismo. El daño causado por los RL sobre algunas enzimas antioxidantes puede incrementar el daño oxidativo en el ADN, ya que éste no es reparado, provocando a su vez un incremento en el daño a ambas macromoléculas. Cuando la replicación del ADN dañado tiene lugar antes de la reparación o cuando un ADN dañado se repara de manera incorrecta, tiene lugar una mutación (23,24).

Cuando la desoxirribosa del ADN es atacada por un radical libre, se produce el rompimiento de una hebra, este daño suele ser reparado por las enzimas antioxidantes por lo que no se le considera crítico para la célula. Es probable que el $^1\text{O}_2$ reaccione con la guanina eliminándola del ADN lo que provoca rompimientos de cadena sencilla, se considera que este tipo de daño donde existe una adición a las bases del ADN es más habitual y del cual se derivan la mayor parte de las mutaciones ocasionadas por la acción de los RL (4,6,20,21).

2.1.4. Daño a los hidratos de carbono

Los hidratos de carbono son dañados en menor proporción en comparación con las anteriores macromoléculas. Los monosacáridos pueden reaccionar con el radical OH^\bullet para producir sustancias reactivas, los radicales $^\bullet\text{OH}$ retiran de manera aleatoria un átomo de hidrógeno de la cadena de carbonos, lo que produce un radical de carbono central, fragmentando de esta manera a los carbohidratos. La glucosa puede retener radicales $\text{O}_2^{\bullet -}$ por lo que actúa como agente protector celular pues impide la acción de dicho radical sobre otras moléculas. A su vez la manosa y el xilitol actúan eliminando el radical $^\bullet\text{OH}$, protegiendo de igual manera a otras moléculas (25).

Existen diversos polisacáridos que realizan funciones estructurales, al ser atacados por los RL pierden dicha función dando lugar a procesos degenerativos. Un ejemplo de este tipo de daño, es el ocasionado al ácido hialurónico, el cual se despolimeriza en presencia de una alta concentración de radicales $^\bullet\text{OH}$ y $\text{O}_2^{\bullet -}$ los

cuales son producidos por la acumulación y activación de los neutrófilos durante la inflamación, provocando con esto que disminuya la viscosidad del líquido sinovial de las articulaciones, proceso que se observa en la artritis reumatoide (4,20,21).

2.1. Métodos de evaluación de estrés oxidativo

Debido a que el estrés oxidativo produce daños importantes en las células del organismo, y considerando que el daño no se puede evaluar de manera aislada se han determinado diferentes métodos que nos permitan obtener biomarcadores del estrés oxidativo (3), algunos de los más comunes son:

Determinación de productos terminales de la oxidación de biomoléculas: La peroxidación de lípidos genera productos de desecho como lo son los aldehídos, el indicador característico del nivel de peroxidación lípidica es la medición de MDA, la cual se realiza utilizando al ácido tiobarbitúrico como reactivo. La oxidación de ácidos grasos poliinsaturados n-3 y n-6 genera productos hidrocarburoados como el etano y pentano. Debido a que estos productos son muy volátiles, son eliminados por vía pulmonar (exhalación) y se pueden cuantificar por medio de una cromatografía de gases (4).

Medición de la concentración de antioxidantes: Por medio de cromatografía líquida de alta resolución en plasma, orina y tejidos, se pueden determinar niveles de vitamina E, betacarotenos, coenzima Q, glutatión y vitamina C (3,4)

Aumento del glutatión oxidado (GSSG): En condiciones fisiológicas la concentración en sangre del glutatión reducido (GSH) es mayor en relación al GSSG. Las moléculas de GSH pueden oxidarse dando lugar a la formación del GSSG, por lo que un incremento en el cociente GSSG/GSH en sangre es un indicador característico de estrés oxidativo (3,4).

3. ANTIOXIDANTES

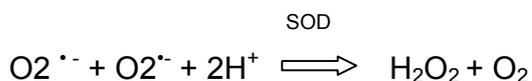
Se define como antioxidante a toda sustancia que hallándose presente en bajas concentraciones con respecto a las de un sustrato oxidable (biomolécula), retarda o previene la oxidación de dicho sustrato (12). El organismo cuenta con sistemas antioxidantes que dependen de la ingesta de vitaminas y minerales con dicha capacidad así como la producción endógena de numerosas enzimas involucradas en la eliminación de los RL. La protección de las células contra los RL comprende no solo la captura de estos intermediarios, sino también la prevención de su formación, la inhibición de su propagación y la reparación de las lesiones (5,20).

3.1 Sistemas primarios de defensa antioxidante

Los antioxidantes primarios actúan convirtiendo a los radicales libres en moléculas menos dañinas, o impidiendo su formación desde otras moléculas. Dentro de este grupo se incluyen enzimas como la superóxido dismutasa, la glutatión peroxidasa, la catalasa y otros elementos que no son de naturaleza enzimática como las proteínas ligadoras de metales (26,27). A continuación se describen algunas características de estos antioxidantes:

3.1.1 Superóxido dismutasa (SOD)

Abarca una amplia familia de metaloproteínas que se encuentran presentes en las células que utilizan oxígeno en su metabolismo. La SOD cataliza la dismutación del $O_2^{\cdot -}$ para formar H_2O_2 , constituyendo así el primer medio de defensa (4,17,28).



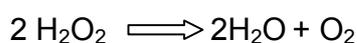
Existen 4 formas de la SOD según el grupo metálico ligado al aminoácido, tenemos así a las SOD dependiente de cobre y zinc (Cu,Zn-SOD), a la SOD dependiente de manganeso (Mn-SOD) la cual existe en dos tipos diferentes y la SOD que contiene hierro. La concentración de ésta enzima incrementa adaptativamente con la exposición de las células a gradientes superiores de presión de oxígeno, tal efecto se observa después de un episodio de ejercicio. La

actividad de la SOD debe ir acompañada por la acción de la catalasa o de la glutatión peroxidasa para evitar la acumulación de H_2O_2 en el citosol y la matriz mitocondrial (4,17,28).

3.1.2 Catalasa (CAT)

Es una hemoproteína que se encarga de catalizar la reducción del H_2O_2 a H_2O y O_2 por lo que su acción es fundamental cuando el H_2O_2 se encuentra elevado

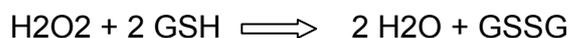
CATALASA



La mayor parte de la célula contiene catalasa, aunque principalmente se encuentra en los peroxisomas (4,17,28).

3.1.3 Glutatión peroxidasa (GPx)

Cataliza la reacción de H_2O_2 o de peróxidos orgánicos empleando GSH como sustrato. Existen dos tipos de GPx, la primera es la dependiente de selenio la cual cataliza la reducción del H_2O_2 y peróxidos orgánicos, y la GPx no dependiente de selenio la cual actúa únicamente frente a peróxidos orgánicos.



Su alta actividad catalítica se observa en mayor medida en el citosol, aunque puede encontrarse también en las mitocondrias (4,17,28).

3.1.4 Proteínas ligadoras de metales

Las proteínas ligadoras de metales, como su nombre lo indica, se encargan de disminuir los niveles de iones metálicos como Fe^{2+} y Cu^+ que participan en las reacciones donde se generan RL. Dentro de este grupo encontramos a la transferrina y lactoferrina que son glucoproteínas que ligan el hierro durante el transporte sanguíneo, encontramos también a la ferritina la cual almacena hierro intracelularmente, por último tenemos a la ceruloplasmina que se encarga de secuestrar iones de cobre y es capaz de oxidar el ion Fe^{2+} a Fe^{3+} (4,28).

3.2 Sistemas secundarios de defensa antioxidante

Los antioxidantes secundarios son protectores no enzimáticos o captadores de radicales libres que intervienen cuando hay una gran producción de radicales libres y los sistemas enzimáticos no son suficientes, previniendo así las reacciones en cadena. Se incluye el glutatión, la vitamina E, vitamina C, ácido úrico, bilirrubina y albúmina (27).

3.2.1 Glutatión

El glutatión es un tripéptido, gamma glutamil-cisteinil-glicina, que participa en el metabolismo de aminoácidos como donante de grupos gamma glutamilos. Puede encontrarse en dos formas según su estado de óxido-reducción, el GSH o glutatión reducido y el GSSG o glutatión oxidado (29).

El GSH actúa protegiendo a la membrana celular contra el daño oxidativo, reacciona directamente con RL como $O_2^{\cdot -}$, $\cdot OH$ y RO para obtener radical tiolo (GS^{\cdot}) y posteriormente GSSG, el cual es reducido nuevamente a GSH por medio de la acción de la enzima glutatión reductasa. Tanto el GSH como el ácido ascórbico son los principales protagonistas en la destrucción de intermediarios de EROS (4,17,28).

3.2.2 Vitamina E

La vitamina E es una de las sustancias pertenecientes a la familia de los tocoferoles, funciona como antioxidante en diversas reacciones del organismo (30); es una vitamina liposoluble que se encuentra en mayor concentración en la membrana mitocondrial, donde se lleva a cabo el transporte de electrones (11,16). Se han aislado ocho compuestos que tienen actividad como vitamina E; estos son α - β –y así como los tocoferoles y tocotrienoles. La mayor actividad de la vitamina E esta representada por el d- α -tocoferol, en las plantas y semillas el α -tocoferol probablemente representa entre el 10-15 % del total de los tocoferoles, pero en animales y pescados, normalmente representa más del 90% de la concentración de tocoferoles (31).

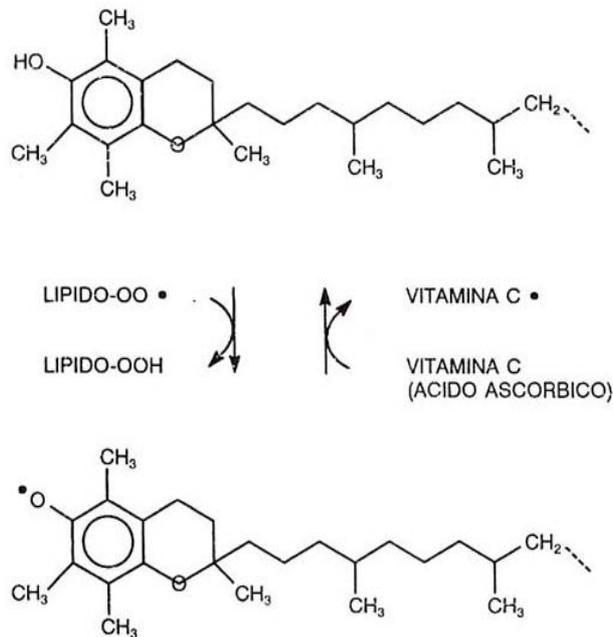


Figura 4. Oxidación de la vitamina E por RL y su reducción por vitamina C (Tomado de Thomas. 2002).

La vitamina E puede obtenerse de los aceites vegetales poliinsaturados (maíz, soya y cártamo), del germen de trigo y arroz, verduras de hoja verde, granos enteros, leguminosas, frutos secos, yema de huevo, leche, vísceras de mamíferos y en los aceites de pescados (4,17,31).

Las necesidades de vitamina E deben expresarse en función de la ingestión de ácidos grasos poliinsaturados (P.U.F.A.). La relación tocoferol/P.U.F.A. debe ser mayor de 0.79, por lo que el deportista que consuma 60 mg de ácidos grasos poliinsaturados precisaría una cantidad de vitamina E de unos 35 mg diarios, el requerimiento dietario recomendado es de 15 mg de α -tocoferol equivalente a 30 UI (17,32).

3.2.3 Vitamina C

Es una molécula hidrosoluble, la cual no puede ser sintetizada por el organismo humano, por lo cual debe ser aportada por la dieta. Esta vitamina es efectiva contra el O_2^- , H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$ y el $^1\text{O}_2$. Al reaccionar con los RL se convierte en ácido

dehidroascórbico, el cual se convertirá nuevamente ácido ascórbico por la acción de la enzima dehidroascorbato reductasa (4,17,28).

Lavitamina C puede obtenerse de frutas como el kiwi, limón, naranja, guayaba, cerezas y el melón así como algunos vegetales como jitomates, coliflor, col y brócoli.

Restaura las propiedades antioxidantes de la vitamina E y se ha observado que su administración incrementa los niveles de GSH (4,17,28).

3.2.4 Glicina

La glicina es el aminoácido más simple, su cadena lateral es un átomo de hidrógeno; ya que su $C\alpha$ (Figura 4) tiene dos sustituyentes iguales es un aminoácido no quiral. Debido al volumen reducido de su cadena lateral (-H), el esqueleto polipeptídico de los residuos de glicina tiene más libertad conformacional que los otros aminoácidos de mayor volumen (33). Es posible que las funciones de la glicina se deban a la ausencia de una cadena lateral significativa que podría afectar las características físicas de dicho aminoácido, por impartir carga, hidrofobicidad u otras limitaciones estructurales, su fórmula química es $C_2H_5NO_2$.

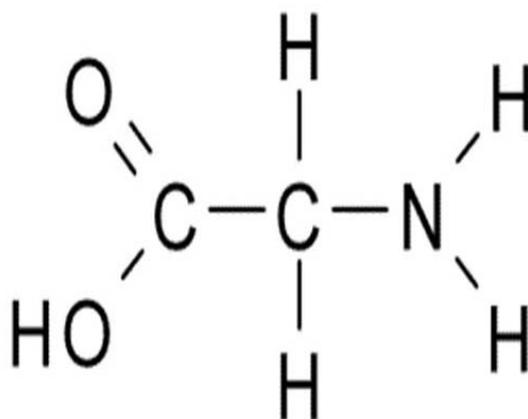


Figura 5. Estructura química de la glicina. (Modificado de Pacheco. 1996).

La glicina contribuye a la formación del anillo porfirico de la molécula de la hemoglobina y también es un constituyente importante de las purinas y pirimidias, necesarias para la síntesis de ácidos nucleídos (34). Además se conoce que es uno de los tres aminoácidos que componen a la creatina, sustancia que es

sintetizada por el organismo, pero que es utilizada como un suplemento por personas que realizan cierta actividad física generalmente de tipo anaeróbico ya que se le atribuye poder ergogénico (35,36,37,38,39).

Dentro de sus acciones en el organismo esta la de prevenir el descenso de la actividad de las enzimas hepáticas antioxidantes (SOD, GPx y CAT), este efecto se podría derivar del bloqueo ejercido sobre la activación de la células de Kupffer productoras de radicales libres, cuyas concentraciones se incrementarían en un estado de isquemia/reperfusión.

Se a observado que la glicina impide el efecto tóxico derivado del incremento de la concentración de NO al bloquear tanto la producción de radicales libres como la producción de citoquinas inflamatorias, factores que favorecen la producción de NO₂ derivado de la óxido nítrico sintetasa.

Además de ser un antioxidante, la glicina bloquea el proceso inflamatorio sistémico originado por una amplia lista de estados patológicos, la elevación de la glicina en los niveles sanguíneos ha demostrado mejorar entre otros la situación de daño hepático por alcoholismo, algunas formas de cáncer y la nefrotoxicidad debida a ciertos medicamentos (40).

3.2.5 Ácido úrico

Es el producto final del metabolismo de las purinas, resulta de la oxidación de las purinas contenidas en la dieta por acción de la xantina óxido reductasa (4).

Se ha observado que del 30-65 % de la capacidad del plasma para neutralizar radicales peroxilo es debida al ácido úrico, y en cuanto a la capacidad de neutralizar al radical hidroxilo en plasma, se ha estimado que el ácido úrico es responsable del 10 al 15 % (41,42).

El ácido úrico atrapa RL cuando están en un medios acuoso, ya que después de su producción en las células endoteliales es liberado a la sangre y a otros compartimientos extracelulares, habiéndose demostrado su presencia, además de en el plasma, en la linfa, el líquido sinovial, el liquido intersticial, fluidos intraoculares, líquido amniótico y secreciones nasales (43). Al igual que lo

sucedido con la vitamina E, la oxidación de la vitamina C previene la oxidación del ácido úrico (4,17,28).

3.3 Sistemas terciarios de defensa antioxidante

Los antioxidantes terciarios reparan biomoléculas dañadas por los radicales libres. Entre ellos se encuentran las oxidorreductasas las cuales participan en la reducción de grupos proteínicos oxidados por RL y las proteasas que degradan proteínas dañadas oxidativamente evitando de este modo su acumulación, también podemos destacar las enzimas reparadoras de ADN, como la ADN polimeraza I, ADN ligasa, endonucleasas, y glucosilasas (4,44,45,46,47,48).

4. EJERCICIO-AERÓBICO

Ejercicio se define como una actividad física planeada, estructurada y repetitiva que aumenta la condición física del individuo. El efecto positivo o negativo que pueda tener el ejercicio sobre el organismo depende de la frecuencia, intensidad y duración del mismo (49). Por otro lado el ejercicio aeróbico es aquel donde intervienen grandes grupos musculares a una baja y sostenida resistencia (duración prolongada, intensidad baja o media y de tipo rítmico), contribuyendo al incremento de las demandas energéticas. También puede denominarse isotónico, ejemplo de este son nadar, correr, bicicleta etc. (50).

4.1 Efectos fisiológicos del ejercicio aeróbico

Entre las adaptaciones fisiológicas al ejercicio encontramos las siguientes:

- En el sistema cardiovascular aumenta el flujo sanguíneo y, con ello, el transporte de oxígeno y nutrimentos a los músculos.
- Aumento en el contenido de mioglobina, incrementando la difusión de oxígeno desde la membrana de la célula muscular hasta la mitocondria.
- Eleva el consumo de oxígeno y la capacidad respiratoria, es decir hay mayor ventilación

- Si los músculos se entrenan en contracciones máximas se produce hipertrofia muscular, lo que propicia un acrecentamiento en los depósitos de glucógeno y triglicéridos.
- Favorece la pérdida de tejido adiposo e incrementa la masa muscular.
- Aumenta la sensibilidad a la insulina.
- Incrementa la capacidad de oxidación de glucógeno
- Mayor movilización de los ácidos grasos libres en el tejido adiposo.
- Reduce la actividad de la lipasa lipoproteínica.
- El ejercicio incrementa la concentración de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y disminuye los triglicéridos (TG), el colesterol total y las LDL, por lo que confiere mayor protección contra la formación aterogénica.
- Desciende la producción de ácido láctico produciendo un aumento del umbral anaeróbico.
- Disminuye la presión tanto sistólica como diastólica.
- Estimula la formación de hueso y el consiguiente aumento de la masa ósea (6,49,51).

4.2. Formación de radicales libres durante el ejercicio aeróbico

Se han identificado diferentes formas en las que se generan EROS durante el ejercicio aeróbico, algunas de las principales fuentes se describen a continuación:

4.2.1. Mitocondria

El consumo de oxígeno durante el ejercicio exhaustivo incrementa en 100 ó 200 veces en comparación con el estado de reposo. La reducción del oxígeno en la cadena respiratoria en la mitocondrias del músculo incrementa considerablemente, al mismo tiempo incrementa la producción de EROS (52). El proceso de reducción del oxígeno en la cadena respiratoria mitocondrial, se describió anteriormente en el punto 1.2.2.1.

4.2.2. Catecolaminas

Durante el ejercicio se incrementa la producción de catecolaminas, las cuales pueden autooxidarse formando EROS, un ejemplo de esto es la epinefrina. Se ha propuesto que en la lesión oxidativa de la isquemia reperfusión miocárdica ocurre autooxidación de la epinefrina en adrenocromo, asociada con la formación de O_2^- (52,53,54).

4.2.3. Acido láctico

Tras un episodio de ejercicio prolongado se incrementa la producción de ácido láctico el cual a su vez convierte al superóxido en hidroxilo (52,53).

4.2.4. Xantinaoxidasa (XO)

En el proceso de hipoxia/reoxigenación durante el ejercicio se produce estrés oxidativo a través de la vía de la XO. La hipoxantina se forma en el músculo durante el ejercicio físico intenso y existe un incremento marcado de esta purina en el músculo comparado con la sangre. La cantidad de hipoxantina que se acumula en sangre depende principalmente de la intensidad del ejercicio, un nivel elevado de hipoxantina en plasma supondría un aumento en la producción de radical superóxido en el caso en el que la conversión a XO hubiese sucedido. La fase de isquemia produce una conversión de la xantina deshidrogenasa (XDH) a XO y una degradación de los nucleótidos de adenina a hipoxantina. De esta forma con la re-introducción del oxígeno molecular durante la reperfusión, una considerable cantidad de radical superóxido, podría ser generada en la reacción catalizada por la XO (55,56,57,58).

De igual modo en condiciones de hipoxia se observa un incremento en la actividad de la enzima óxido nítrico sintetasa, conduciendo a la formación de los radicales de óxido nítrico (52,53).

4.2.5. Peroxisomas

La oxidación peroxisomal de ácidos grasos es una fuente importante de H_2O_2 , durante el ejercicio los ácidos grasos son la fuente principal de energía para el miocardio y el músculo esquelético, por lo que, los peroxisomas pueden ser sitios potenciales de producción de radicales libres (11,53,54).

4.2.6. Células fagocíticas

Las células con función fagocítica generan grandes cantidades de RL para poder eliminar a los agentes patógenos. Cuando existe lesión tisular causada por el ejercicio intenso, se activan los neutrófilos polimorfonucleares convirtiéndose en una fuente de EROS. Los neutrófilos activados utilizan la NAD(P)H oxidasa para generar radical superóxido, el cual puede genera H_2O_2 . El peróxido se convierte en ácido hipocloroso (HOCl) por la mieloperoxidasa, una hemoproteína secretada por neutrófilos y monocitos, el HOCl genera otros metabolitos reactivos como el cloro nitrilo (NO_2Cl) en presencia de nitrito. La formación de RL por las células fagocíticas puede causar peroxidación lipídica en células vecinas como los eritrocitos, y producir oxidación de la hemoglobina (11,52,53,54).

4.2.7 Alteración en la homeostasis de Ca^{++}

Existen diferentes vías por las que los radicales libres podrían alterar la homeostasis del Ca^{2+} , se considera que las EROS son responsables de la inactivación de las bombas de la membrana plasmática responsables de eliminar el Ca^+ . Dicha interrupción temporal de las bombas de calcio dependientes de ATP produce un aumento en la concentración de Ca^{2+} lo que puede activar la trayectoria de la xantinaoxidasa durante el ejercicio, generando radicales O_2^- .

Si se considera que el fallo en la homeostasis del calcio es el evento inicial en el daño muscular asociado al ejercicio físico, éste puede llevar a un aumento en la generación de radicales libres. El incremento de los niveles de Ca^{2+} intracelulares puede activar enzimas proteolíticas y la fosfolipasa la cual desprende al ácido araquidónico de los fosfolípidos. La ciclooxygenasa reacciona con el ácido araquidónico para formar el radical oxhidrilo (11,52,53,54).

5. ENZIMAS SÉRICAS COMO MARCADORES BIOPATOLÓGICOS

Las enzimas son proteínas con una función específica, la presencia o aumento de la actividad de algunas de ellas son utilizadas para diagnosticar enfermedades o lesiones de ciertos órganos como el corazón, riñón e hígado. Las enzimas séricas incrementan en proporción a la intensidad y duración del ejercicio, estas enzimas provienen de las células de los distintos tejidos del organismo, los niveles en sangre son el resultado de la liberación de enzimas de sus órganos de origen. Esto puede ocurrir por lesión celular o cambios en la permeabilidad de la membrana celular de dichos órganos. Entre las enzimas séricas que se utilizan como marcadores biopatológicos encontramos a las aminotransferasas también conocidas como transaminasas. La aspartato amino transferasa (AST) o glutamato-oxalacetato transaminasa (GOT) y la alanino-aminotransferasa (ALT) o glutamato-piruvato transaminasa (GPT), son ejemplos de aminotransferasas, las cuales se ven aumentadas en el plasma después de un infarto al miocardio o cuando existe daño hepático y/o muscular. Muchos estudios reportan un incremento en su concentración después del ejercicio intenso de un 72% para la AST y un 42% para la ALT, retornando a sus niveles normales a las 12-16 horas postejercicio (6).

5.1. Factores que determinan el aumento de la actividad enzimática con el ejercicio:

- Intensidad y duración del ejercicio, se debe mantener la integridad de las membranas celulares para reducir el flujo de enzimas a la sangre, situación que se vería sobrepasada a una determinada intensidad de trabajo.
- Tipo de ejercicio, el aumento en la actividad de estas enzimas es más claro en aquellos ejercicios donde los sujetos soportan su propio peso por ejemplo correr.
- Nivel de entrenamiento, la respuesta de las enzimas en sangre es proporcional a la cantidad de ejercicio y a la condición física así como a la adaptación al entrenamiento.

- Variabilidad individual, según las diferencias individuales como la resistencia física, capacidad aeróbica e intensidad con que cada sujeto completa el ejercicio.
- Otros factores como las temperaturas elevadas, altitud y aumento en la gravedad, distancia, velocidad, sexo, etc. (6)

III. ANTECEDENTES

A través de la historia de las ciencias médicas pocos eventos han impactado tanto como el descubrimiento de los RL y el estudio de su influencia en los seres vivos (12). Desde entonces, los RL han sido objeto de numerosos estudios para determinar si pueden ser la causa u origen de diferentes patologías; así mismo, las diferentes disciplinas médicas se han interesado en determinar el papel que desempeñan los RL en beneficio o perjuicio de cada una de ellas, dentro de estas disciplinas encontramos a la medicina del deporte.

Históricamente, el estudio de la fisiología del ejercicio se ha centrado en el consumo de O_2 , sin embargo la comunidad científica se ha interesado en los RL preguntándose si el incremento en el consumo de O_2 que trae consigo el ejercicio puede llevar a los deportistas a un estado de estrés oxidativo. En años recientes se ha visto que esto es real, además de comprobarse que el incremento de RL puede dañar a los sistemas biológicos (59).

Durante el metabolismo oxidativo, el O_2 consumido es reducido en la cadena respiratoria obteniendo como producto final moléculas de H_2O , pero no todo el O_2 que se consume durante la respiración sufre dicha reducción, aproximadamente del 2 – 5% del oxígeno no llega a reducirse totalmente generando de esta forma RL conocidos específicamente como EROS. El ejercicio incrementa el consumo de O_2 , por lo que es lógico pensar que a su vez se estén generando una mayor cantidad de EROS aumentando a la vez reacciones como la peroxidación de lípidos, y daño a otras biomoléculas (5). Por otro lado también se ha señalado que el ejercicio aeróbico refuerza el sistema antioxidante aumentando la actividad de la SOD, pero no se ha determinado con certeza si dicha reacción sea suficiente para contrarrestar la cantidad de RL y EROS que se producen durante el mismo, sobre todo considerando que la magnitud del daño esta relacionada con la tasa de consumo de oxígeno así como los antioxidantes presentes en el organismo (11).

Con el fin de aclarar dicha incógnita se han realizado diferentes investigaciones para determinar si el ejercicio aeróbico puede generar estrés oxidativo, en este contexto, se encuentra la investigación realizada por Bloomer y cols.(2005) en deportistas, donde se combinó ejercicio aeróbico con anaeróbico, al final del estudio se determinó que después de 30 minutos de practicar cualquiera de los tipos de ejercicio se incrementan los parámetros de oxidación en la sangre, además de encontrar que la glutatión reductasa disminuyó en ambos casos (60).

Por otro lado, se han realizado diversas investigaciones orientadas a evaluar la efectividad de la suplementación con vitaminas antioxidantes para prevenir el daño oxidativo generado por el ejercicio. Los estudios se han realizado tanto en humanos como en ratas entrenadas, en los cuales se han observado los efectos de la suplementación con diferentes antioxidantes incluso administrando varios de ellos conjuntamente, sin embargo, el papel que los RL juegan en el desarrollo de daño a los tejidos durante el ejercicio y papel protector que los antioxidantes desempeñan aun no esta del todo aclarado (60,61). A continuación se mencionan varias investigaciones en las cuales se ha evaluado la capacidad del ejercicio aeróbico para generar RL así como el papel protector de los antioxidantes tales como la vitamina E y la glicina sobre el estrés oxidativo.

Vasankari y cols. (1997) Suplementaron a atletas de rendimiento con tres antioxidantes los cuales se administraron de manera conjunta a una dosis de 249 mg de vitamina E (373 UI), 1000 mg de vitamina C y 60 mg de ubiquinona (coenzima Q10), encontraron que el aumento de vitamina E en suero traía consigo un incremento en el potencial antioxidante del organismo en un 30% y un aumento en el potencial antioxidante del suero en un 10%, sin afectar la concentración de LDL (62). De igual manera, Yu y cols.(2003), suplementaron vitamina E a un grupo de ratas, vitamina C a otro grupo y a un tercer grupo ambas vitaminas, todos los grupos fueron sometidos a ejercicio aeróbico exhaustivo durante 4 semanas, los resultados demuestran que la suplementación con vitamina E puede proteger a las mitocondrias del músculo y así mejorar el rendimiento deportivo,

este efecto puede verse incrementado con la administración conjunta de vitamina C, pero la protección no se ve igualada si la suplementación es realizada únicamente con vitamina C (63). A su vez Kim y cols. (2004) realizaron un estudio en ratas, las cuales fueron entrenadas 60 min por día durante 8 semanas, cada grupo recibió vitamina E, carnitina y vitamina C, al final se determinó que además de proteger del daño oxidativo y de mejorar la capacidad del ejercicio en ratas entrenadas, la suplementación con carnitina, vitamina E y vitamina C ayuda a mejorar el perfil de lípidos disminuyendo lípidos totales en suero, los TG, el colesterol total además de aumentar las HDL (64). En un trabajo en el cual se analizaron dos grupos de ratas, a uno se le suplementó con vitamina E y al otro no, se demostró que la vitamina E confiere protección a los tejidos pues en el grupo que fue suplementado con dicha vitamina y además entrenaba, se encontraban aumentados los niveles de GSH, por el contrario en el grupo que no fue suplementado y era sedentario estos niveles se encontraron bajos (65).

Asha y cols. (2002), estudiaron el efecto protector de algunos antioxidantes durante el ejercicio, utilizando ratas ancianas, los resultados han demostrado que la suplementación con vitamina E puede ser una herramienta para mejorar la defensa antioxidante, ya que logra incrementar la actividad de la SOD y otras enzimas antioxidantes. Además obtuvieron una disminución en la peroxidación de lípidos, lo cual se vio reflejado por la baja concentración de MDA (66). Un año después los mismos autores realizaron un estudio en ratas ancianas el cual mostró, que la suplementación con vitamina E incrementa la resistencia deportiva así como mejora el perfil de lípidos, aumentando las HDL en plasma (67).

Las investigaciones coinciden en que la suplementación con antioxidantes tiene un efecto favorable sobre la peroxidación lipídica y en general en la protección del daño por RL. Una de las vitaminas más estudiadas es la vitamina E, y las investigaciones han señalado en que dicha vitamina previene el daño oxidativo inducido por el ejercicio, por lo que se recomienda una suplementación con 100-200 mg de vitamina E por día para ayudar a disminuir el daño producido por los

RL (60). También se ha señalado que al suplementar α -tocoferol se logra disminuir la exhalación de pentanos durante el ejercicio, así como la concentración de MDA, por lo que se demostró protege contra la peroxidación de lípidos. Varias de las investigaciones no han encontrado efectos benéficos de la suplementación con vitamina E en el desempeño, resistencia o capacidad aeróbica (5).

Por otra parte, como ya se mencionó en la introducción, existen diversos antioxidantes además de las vitaminas. Uno de ellos es el aminoácido conocido con el nombre de glicina, el cual ha sido estudiado con mayor interés en los últimos años, tratando de demostrar su efecto protector contra el daño oxidativo así como auxiliar en la prevención de complicaciones en enfermedades crónicas como la Diabetes Mellitus (DM). Una de estas investigaciones fue la realizada por Senthilkumar y cols., (2004) en la cual se indujo hepatotoxicidad mediante la administración de etanol (7.9g/Kg de peso) por 30 días, a uno de los grupos se le administró una solución con glucosa, a otro grupo se le suplementó glicina (0.6g/kg de peso) los 30 días siguientes a la administración del etanol, al final se reportó que la administración de glicina fue efectiva para disminuir la hepatotoxicidad inducida por etanol, al disminuir la actividad en suero de enzimas como la AST y ALT (68). Los mismos investigadores en un estudio similar demostraron que la administración de éste aminoácido reduce el estrés oxidativo en las ratas a las que se les administra alcohol, además de incrementar la actividad de enzimas antioxidantes como la SOD y la CAT en el hígado de dichas ratas (69), a su vez, en otro estudio señalaron que la suplementación con glicina (0.6g/Kg peso) confiere protección ante estrés oxidativo en la membrana del eritrocito, plasma y hepatocitos de las ratas inducidas a alcoholismo, ya que protege a dichas membranas de sufrir el proceso conocido como peroxidación lipídica (70).

Otros investigadores como Carbajal y cols. (2007) han estudiado el efecto que la suplementación con glicina tiene en la prevención de los daños producidos por la DM. Dicho efecto lo atribuyen a que la glicina (20g/día en tres tomas de 7g c/u)

puede evitar la glicación de las proteínas al ser ella la molécula que sufra dicha glicación, de esta manera evita que se formen los Productos Finales de la Glicación (AGEs por sus siglas en inglés) ya que se ha atribuido a dichos compuestos la propiedad de causar daños vasculares, neurológicos e inmunológicos. Estos estudios indican que la suplementación con glicina disminuye los índices de hemoglobina glucosilada e incluso afirman que la glicina posee efecto hipoglucemiante, reduce la concentración de TG en pacientes diabéticos así como normalizar la presión arterial y se dice que tiene un efecto inmunoestimulante (71, 72).

Además de lo anterior se sabe que la glicina previene el descenso de la actividad de las enzimas antioxidantes tras una hemorragia, y previene la formación de radicales libres (33).

Es conocido que este aminoácido es un componente principal de la creatina, la cual es sintetizada en el hígado, páncreas y riñones y almacenada en el músculo esquelético. La creatina se ha utilizado desde hace tiempo como un suplemento alimenticio en deportista, puesto que se ha visto su potencial ergogénico ya que realiza varias funciones como son la de regular la energía así como regular el proceso de glucólisis, retrasa inicio de la fatiga muscular y facilita la recuperación, varias investigaciones manejan una dosis de 20g/día durante 5-7 días y después una fase de mantenimiento que consta de 3-5g/día por periodos variables que van de 1 semana a un mes. Así mismo en dichos estudios se ha tratado de demostrar si la administración individual de aminoácidos (ej. glicina) pueden tener un efecto ergogénico y por lo tanto incrementar el rendimiento físico de los atletas, los resultados muestran que no, incluso este aminoácido aún siendo uno de los componentes dicha sustancia, no parece poseer el potencial ergogénico de la misma creatina (35,36,37,38,39). Cabe mencionar que si bien se han encontrado resultados positivos de la suplementación de glicina para combatir el estrés oxidativo, no se han realizado estudios donde éste sea generado por el ejercicio, por lo cual es interesante observar los resultados.

IV. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Está comprobado que durante el ejercicio físico se aumenta el consumo de oxígeno (2,57,12,52), pero se ha estudiado poco acerca del posible daño que puede tener el incremento en la producción de RL y EROS trayendo consigo el fenómeno conocido como estrés oxidativo (5,11). Es importante tratar de equilibrar la cantidad de RL y antioxidantes en el organismo de los atletas, ya que de lo contrario son más susceptibles de presentar una serie de trastornos en el organismo. Tampoco se ha definido que la suplementación con antioxidantes mejore el rendimiento en sí (60,61), pero al proteger al organismo de una dieta inadecuada y una mayor actividad física, pueden estar contribuyendo de manera importante a tener un mayor rendimiento. Esto provoca que se ponga más atención en el estudio de los antioxidantes como factores protectores del organismo de los atletas, los cuales en muchos casos no llevan un plan de alimentación adecuado a sus necesidades.

Sabemos que el ejercicio se relaciona con un estilo de vida saludable, lo que preocupa en mayor medida es el daño a los tejidos que se provoca durante el estrés oxidativo, condicionando al organismo a un gasto de energía para la reparación del mismo y a su vez una disminución en el rendimiento.

Diversos estudios señalan tanto a la vitamina E (62,63,64,65,66,67) como a la glicina (33,40,71,72) como agentes protectores contra el estrés oxidativo, por lo que se eligieron para ver su efecto es esta investigación.

Por lo tanto nos preguntamos que tanto es el daño ocasionado a los tejidos por el estrés oxidativo inducido por el ejercicio, y si la suplementación con vitamina E y/o glicina puede proteger de la misma manera del daño oxidativo a los órganos íntimamente relacionados con el ejercicio, favoreciendo de esta manera el rendimiento.

V. JUSTIFICACIÓN

El estudio del deporte y de la actividad física ha adquirido gran relevancia en los últimos años. Se busca con todas las investigaciones lograr que el deportista mejore su condición física y a la vez su rendimiento.

Los profesionales de la salud, como lo son los nutriólogos y los médicos deben ofrecer a los deportistas alternativas de alimentación y de cambios en sus hábitos de vida que les ayuden cumplir con el objetivo planteado, además de permanecer atentos a los nuevos descubrimientos y nuevas técnicas aplicables a la ciencia del deporte, para dar a los atletas las herramientas necesarias para mejorar su desempeño tanto físico como mental.

En vista del daño que puede causarse al incrementar el consumo de oxígeno durante el ejercicio, es importante crear las condiciones necesarias para que este daño sea minorizado y se disminuya el riesgo de que el rendimiento de nuestros deportistas este en detrimento. Al conocer esta problemática se deben buscar alternativas que prevengan el daño, como es el uso de suplementos alimentarios, entre los cuales encontramos a los antioxidantes.

VI. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la suplementación con vitamina E y/o glicina sobre el daño oxidativo y el rendimiento físico en ratas durante el ejercicio aeróbico.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la actividad específica de la enzima antioxidante SOD, en hígado, corazón, pulmón y músculo de ratas sometidas a ejercicio aeróbico con o sin suplementación de vitamina E y/o glicina.
- Cuantificar la concentración de MDA en hígado, corazón, pulmón y músculo de ratas sometidas a ejercicio aeróbico con o sin suplementación de vitamina E y/o glicina.
- Determinar la actividad de enzimas de daño celular (AST y ALT) en suero de ratas sometidas a ejercicio aeróbico con o sin suplementación de vitamina E y/o glicina.
- Cuantificar en suero de ratas sometidas a ejercicio aeróbico, con o sin suplementación de vitamina E y/o glicina, la concentración de metabolitos séricos (glucosa, TG, bilirrubina, albúmina).
- Determinar el rendimiento físico en ratas sometidas a ejercicio aeróbico, con o sin suplementación de vitamina E y/o glicina.

VII. HIPÓTESIS

El ejercicio aeróbico incrementa la producción de RL y a su vez el estrés oxidativo, la suplementación con antioxidantes como la vitamina E y/o glicina a ratas protegerá del daño al hígado, corazón, pulmón y músculos disminuyendo el estrés oxidativo, por lo tanto incrementará el rendimiento físico.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, con un peso de 200 ± 20 gramos (aproximadamente de 10 semanas de edad), obtenidas del bioterio de Harlan México. Las ratas fueron alimentadas con una dieta normal para roedores (Purina de México S.A.) y agua *ad libitum* (73).

1.1. Grupos experimentales

Los animales fueron organizados en ocho grupos (3 ratas por grupo) de la siguiente manera:

- 1) No suplementado, no realizó actividad física (Control).
- 2) Suplementación con vitamina E, no realizó actividad física (VE).
- 3) Suplementación con glicina, no realizó actividad física (Gly).
- 4) Suplementación con vitamina E + suplementación con glicina, no realizó actividad física (VE+Gly).
- 5) Solamente realizó actividad física (AF).
- 6) AF + suplementación con vitamina E (AF+VE).
- 7) AF + suplementación con glicina (AF+Gly).
- 8) AF + suplementación con vitamina E + suplementación con glicina (AF+VE+Gly).

1.2. Suplementación

Los animales sometidos a suplementación recibieron una dosis de 400 UI de vitamina E (Sigma Chemical St. Louis MO) intraperitonealmente (para garantizar que no existan pérdidas de la dosis en el proceso de digestión), y los grupos suplementados con glicina recibieron 0.6 g/Kg de peso (Sigma Chemical St. Louis MO), por vía intragástrica. En ambos casos la suplementación se llevó a cabo por 5 días a la semana a lo largo de un mes (64,68,69).

1.3. Actividad física y determinación del rendimiento

Los grupos sometidos a ejercicio aeróbico, permanecieron en una caja de actividad física por 30 min/día, 5 días a la semana durante cuatro semanas. Al inicio del experimento se realizó un proceso de adecuación a la actividad física, el cual tuvo una duración de un mes; en la primera semana se mantuvieron en la caja de actividad física durante 15 min, el tiempo se fue incrementando 5 min. por semana hasta alcanzar los 30 min (35). El rendimiento físico diario se evaluó contando el número de vueltas en la rueda de ejercitación, al final estos datos se convirtieron en m/min. (65). Para efectos de simplificar términos, al referirnos en los resultados a actividad física (AF), estamos hablando del ejercicio aeróbico que realizado por las ratas.

2. Obtención y preparación de muestras

Después de las ocho semanas de entrenamiento las ratas fueron anestesiadas con pentobarbital 40 mg/Kg. por vía intraperitoneal y sacrificadas por decapitación.

2.1. Suero

Después de decapitar a las ratas, se recolectó la sangre en tubos Vacutainer con gel separador de plasma. Se sometió a centrifugación 3500 rpm por 10 min en centrífuga clínica, de esta manera se obtuvo el suero.

2.2. Tejidos

Los tejidos se obtuvieron en el siguiente orden: Hígado, pulmón, corazón y por último músculo de una pierna.

Dichas muestras fueron homogeneizadas en un amortiguador de sacarosa-TRIS-EDTA (sacarosa 0.255 M, tris base 0.01 M, EDTA 0.3 Mm a un pH 7.4), al finalizar se mantuvieron en congelación (-20° C) hasta que se utilizaron (65,73).

3. Métodos

3.1. Determinación de metabolitos séricos

Se determinó glucosa, albúmina, bilirrubina y triglicéridos utilizando kits de reactivos de la marca Spinreact, siguiendo las instrucciones del fabricante (anexo 1, 2, 3 y 4 respectivamente).

3.2. Ensayo enzimático en suero

Se determinó la actividad de las enzimas AST y ALT en suero, como un marcador de daño celular, utilizando kits de reactivos de la marca Spinreact (anexo 5 y 6 respectivamente). La actividad de las enzimas en suero se reporta como unidades internacionales por litro (UI/L).

3.3. Cuantificación de MDA

Una vez obtenido el homogenado total de los tejidos, se determinó la concentración de MDA como un indicador de peroxidación lipídica. Para esto se realizó la técnica de espectrofotometría de reacción con el ácido tiobarbitúrico (TBARS) en el homogenado de los tejidos de acuerdo a la técnica de Song y cols 2003 (74).

3.4. Determinación de la actividad específica de la SOD

Se determinó la actividad de la enzima SOD en los homogenados totales de los tejidos, aplicando la técnica de Halliwell y Gutteridge (1992) (75). La proteína total de la muestra fue determinada por el método ya establecido por Lowry utilizando albúmina bovina como estándar (anexo 7). El resultado se expresa en nmol/min/mg de proteína.

4. Análisis estadístico

Los datos se integraron en una base de datos la cual fue analizada por medio del programa Sigma Plot 7.0. Las diferencias significativas entre los grupos se analizaron mediante la prueba t de Student para muestras pareadas y análisis de varianza (ANOVA) siendo significativo con una $p < 0.05$. Los resultados se expresan como $\bar{x} \pm EE$.

RESULTADOS

1. Actividad específica de la superóxido dismutasa (SOD)

Se determinó la actividad específica de la enzima SOD en muestras de hígado, corazón, pulmón y músculo de ratas en los diferentes grupos de la investigación.

La figura 6 muestra que los grupos que no realizaron actividad física tuvieron un incremento mínimo de la actividad de la SOD en comparación con el grupo control, independientemente del antioxidante que se le administró. Lo anterior fue observado en los cuatro tejidos.

Nuevamente se presentó un comportamiento similar del grupo AF en los cuatro tejidos, éste grupo muestra un incremento en el hígado del 44%, corazón 41%, pulmón 35% los cuales fueron significativos estadísticamente ($p < 0.05$) en comparación con el control, y en el músculo el incremento fue del 34% aunque en este caso no fue significativo.

Finalmente la actividad de la SOD se ve incrementada nuevamente, ahora como resultado de la suplementación con los antioxidantes, los tres grupos que realizaron actividad física y además fueron suplementados, tuvieron un incremento significativo ($p < 0.05$) en la actividad de la SOD en comparación con el grupo AF, lo anterior se observa en hígado, corazón y pulmón, para el caso del músculo solo se observó un incremento significativo ($p < 0.05$) de la actividad de la SOD en el grupo AF+VE+Gly en comparación con el grupo AF.

Para músculo y corazón el grupo donde se observó un mayor incremento de la actividad de la enzima fue AF+VE+Gly (músculo 31% y corazón 58%), en el caso del hígado fue AF+VE (27%) y para el pulmón fue AF+Gly (58%) en comparación con el grupo AF.

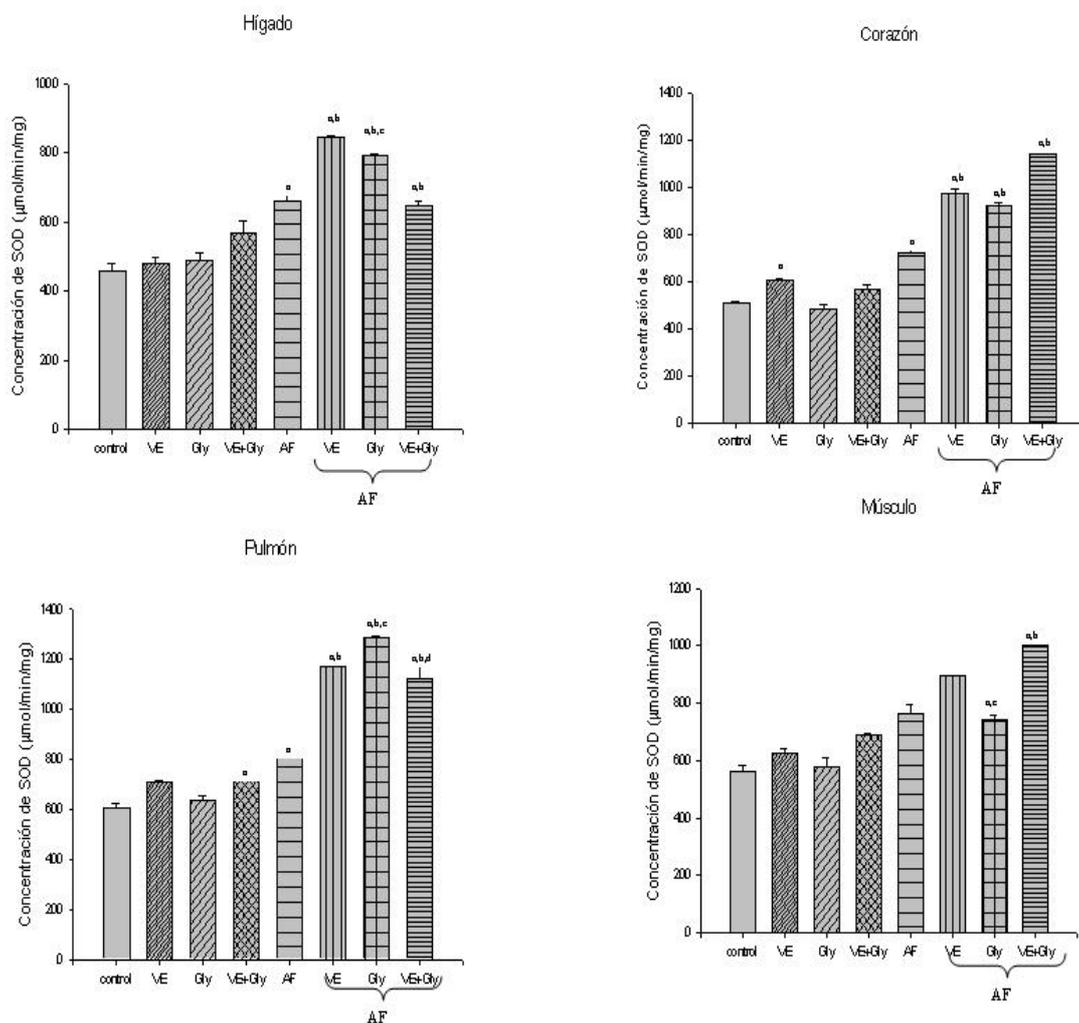


Figura 6. Efecto de la suplementación con antioxidantes y la AF sobre la actividad de la enzima SOD en diferentes tejidos de ratas

Vitamina E (Vit E); Glicina (Gly); Actividad física (AF)

^a (p<0.05 vs control)

^b (p<0.05 vs AF)

^c (p<0.05 AF+VE vs AF+Gly)

^d (p<0.05 AF+VE vs AF+VE+Gly)

2. Concentración de malondialdehído (MDA)

Se determinó la concentración de MDA en el hígado, corazón, pulmón y músculos de ratas, de acuerdo a los diferentes grupos del estudio. La elevación en la concentración de MDA se utiliza como un marcador de estrés oxidativo.

La figura 7 presenta los valores de MDA para los diferentes tejidos y a su vez los diferentes grupos de investigación. Como se puede observar, los grupos que no realizaron AF no sufrieron grandes modificaciones en la concentración de MDA en comparación con el grupo control, solo en el caso del grupo Gly en corazón, se observa un incremento significativo estadísticamente ($p < 0.05$). En cambio el grupo AF de cada tejido sufrió un incremento significativo ($p < 0.05$) comparándolo con el control, dicho incremento varía entre el 360% que se presentó en el hígado, 284% en pulmón, 222% en músculo, hasta un 127% de incremento en corazón.

Todas las muestras de los grupos que realizaron AF en los diferentes tejidos a mostraron valores mayores en comparación al grupo control, siendo la diferencia significativa ($p < 0.05$) a excepción del grupo AF+VE+Gly en corazón. Por otro lado observamos como la suplementación con los antioxidantes disminuye la concentración de MDA, tanto el grupo AF+VE como al AF+Gly y el AF+VE+Gly disminuyeron la concentración del MDA en comparación al grupo AF. Solo en las muestras de pulmón se encontró que la disminución en dichos grupo fue significativa ($p < 0.05$) estadísticamente.

En el caso del hígado, corazón y pulmón, el mayor efecto protector se presentó en el grupo AF+VE+Gly, para el caso del músculo fue el grupo AF+VE.

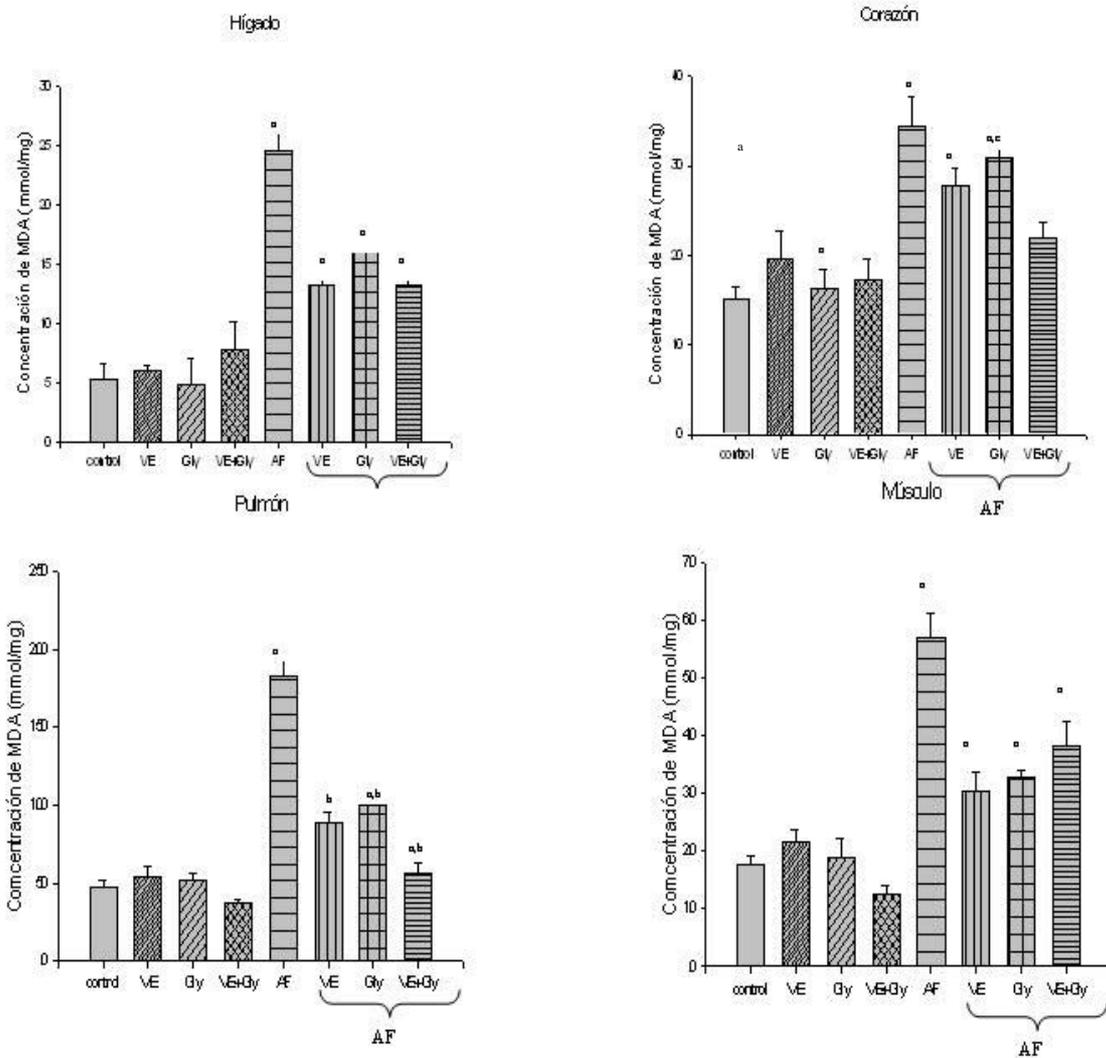


Figura 7. Efecto de la suplementación con antioxidantes y la AF sobre la concentración de MDA en diferentes tejidos de ratas

Vitamina E (Vit E); Glicina (Gly); Actividad física (AF)

^a (p<0.05 vs control)

^b (p<0.05 vs AF)

^c (p<0.05 AF+VE vs AF+Gly)

3. Ensayo enzimático en suero.

3.1. Actividad específica de la enzima ALT

Se determinó la actividad específica de la enzima ALT en suero de ratas de los diferentes grupos de la investigación. Como se observa en la figura 8, la actividad enzimática de la ALT presento un incremento significativo estadísticamente ($p < 0.05$) en el grupo Gly (150.2 UI/L) en comparación con el grupo control (13.1 UI/L), lo que representa un aumento del 1040%, los otros dos grupos suplementados y que no realizaron AF no sufrieron alteraciones importantes. El grupo AF también mostro una actividad de ALT mas alta en comparación al grupo control, aunque dicha actividad no fue significativa, el efecto anterior se ve revertido en los grupos AF+VE y en el grupo AF+VE+Gly. Los demás grupos no presentaron alteraciones importantes.

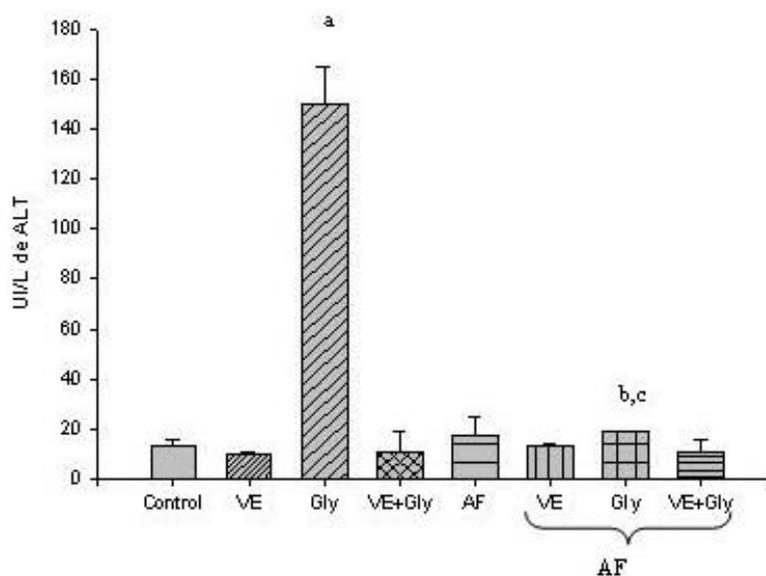


Figura 8. Efecto de la suplementación con antioxidantes y AF sobre la actividad sérica de la enzima ALT

Vitamina E (Vit E); Glicina (Gly); Actividad física (AF)

^a ($p < 0.05$ vs control)

^b ($p < 0.05$ vs AF)

^c ($p < 0.05$ AF+VE vs AF+Gly)

3.2. Actividad específica de la enzima AST

Se determinó la actividad de la enzima AST como un marcador de daño, ya que es una enzima que se encuentra en el citoplasma y las mitocondrias de las células de tejidos como el cardíaco, hepático y músculo esquelético principalmente. Los resultados de la figura 9 muestran un incremento en la actividad de la AST en los grupos VE, Gly y VE+Gly, en comparación con el grupo control aunque dicho incremento no es significativo, en cambio en grupo AF mostró un aumento del 264% el cual si fue significativo estadísticamente ($p < 0.05$) en comparación con el control. También se puede observar que la suplementación con antioxidantes disminuye de manera significativa ($p < 0.05$) la actividad de dicha enzima en comparación con el grupo AF, el grupo AF+VE disminuyó su actividad en un 92 %, el grupo AF+Gly en un 90% y el AF+VE+GLy en un 51%

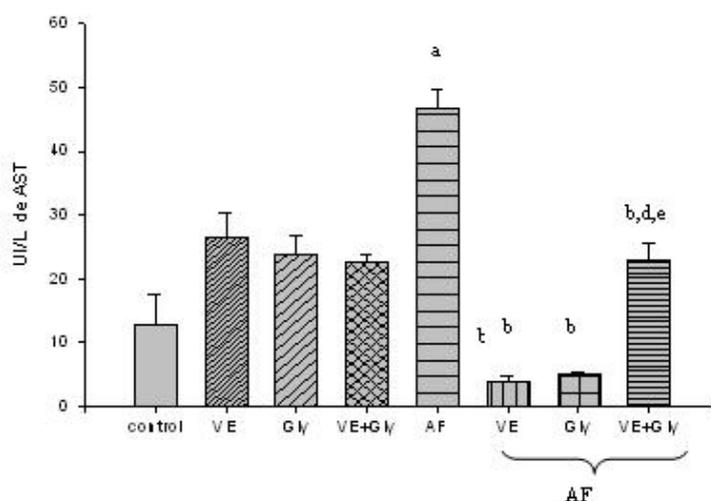


Figura 9. Efecto de la suplementación con antioxidantes y AF sobre la actividad sérica de la enzima AST

Vitamina E (Vit E); Glicina (Gly); Actividad física (AF)

^a ($p < 0.05$ vs control)

^b ($p < 0.05$ vs AF)

^d ($p < 0.05$ AF+VE vs AF+VE+Gly)

^e ($p < 0.05$ AF+Gly vs AF+VE+Gly)

4. Efecto de la suplementación con antioxidantes y la AF sobre la concentración de los metabolitos séricos.

El efecto de la suplementación con vitamina E y/o glicina así como de la actividad física sobre los metabolitos séricos se presenta en la tabla 2.

Tabla 2. Efecto de la AF y la suplementación con vitamina E y/o glicina sobre la concentración de los metabolitos séricos

TRATAMIENTO $\bar{x} \pm EE$	GLUCOSA (mg/dL)	ALBÚMINA (g/dL)	BILIRRUBINA (mg/dL)	T.G. (mg/dL)
Control	120±11	4.2±0.08	0.05±0.007	114±24
VE	106±6	3.8±0.2	0.33±0.08	211±24
Gly	90±10	3.4±0.2 ^a	0.17±0.02 ^a	124±12
VE + Gly	86±16	3.3±0.1 ^a	0.19±0.04 ^a	59±12
AF	97±5	4.3±0.1	0.06±0.02	228±27 ^a
AF+VE	102±0.6	3.6±0.2	0.05±0.007	104±14 ^b
AF+Gly	120±9	3.9±0.1 ^b	0.08±0.01 ^c	108±18 ^b
AF+VE+Gly	88±3 ^{b,e}	3.3±0.06 ^{b,e}	0.42±0.1 ^e	178±59 ^{b,d,e}

Vitamina E (Vit E); Glicina (Gly); Actividad física (AF)

^a (p<0.01 vs control)

^b (p<0.01 vs AF)

^d (p<0.05 AF+VE vs AF+VE+Gly)

^e (p<0.05 AF+Gly vs AF+VE+Gly)

4.1. Concentración sérica de glucosa

Como se puede observar en la figura 10, el grupo control así como el AF+Gly son los que presentaron el nivel de glucosa más alto (120 mg/dL), los grupos que no realizaron actividad física, pero que fueron suplementados con los antioxidantes mostraron valores de glucosa menores en comparación con el grupo control, aunque ninguna de estas disminuciones resultó significativa estadísticamente. El grupo AF también mostró una disminución en su nivel de glucosa en comparación con el control aunque nuevamente no es significativa estadísticamente. Dentro de los grupos que realizaron actividad física y además fueron suplementados, el grupo AF+VE mantuvo un nivel de glucosa similar al grupo AF, el grupo AF+Gly presentó un nivel superior a los dos anteriores y el grupo AF+VE+Gly mostró un nivel estadísticamente ($p < 0.05$) menor al grupo AF, lo que equivale a una disminución del 24%.

Cabe aclarar que solo los grupos control y AF+Gly presentaron un incremento por arriba de los valores considerados como normales (70 -110mg/dL), cabe mencionar, que éste incremento no resultó significativo en comparación con los demás grupos, por lo que se puede observar que ninguno de los tratamientos modifica de manera importante la concentración de glucosa en suero.

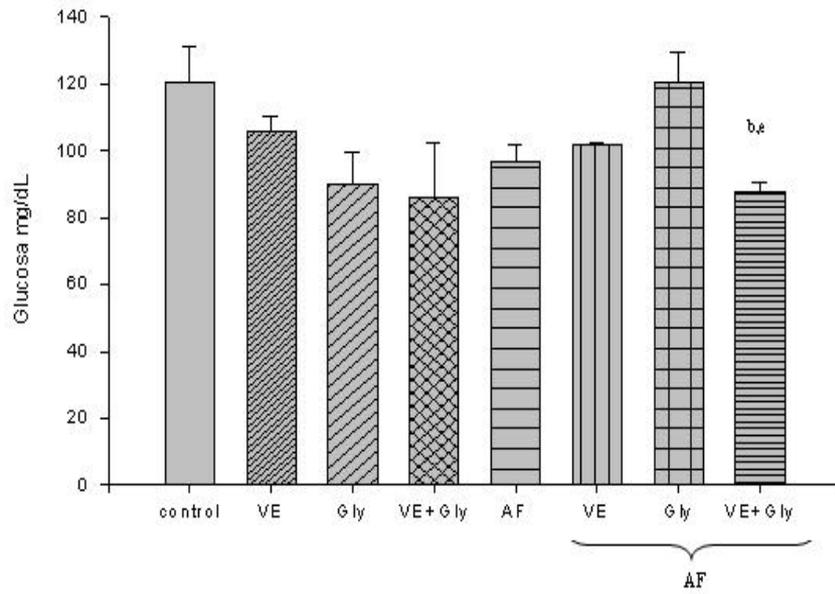


Figura 10. Efecto de la suplementación con los antioxidantes y la AF sobre la concentración sérica de glucosa

Vitamina E (Vit E); Glicina (Gly); Actividad física (AF)

^b ($p < 0.01$ vs AF)

^e ($p < 0.05$ AF+Gly vs AF+VE+Gly)

4.2. Concentración sérica de albúmina

Se determinó la concentración de albúmina en suero de ratas, de los diferentes grupos de la investigación, con el fin de detectar si alguno de los tratamientos producía una alteración en los niveles de la misma. En la figura 11 se observa que el nivel de albúmina fue similar entre el grupo control (4.2 g/dL) y el AF (4.3 g/dL). Los grupos VE, Gly así como VE+Gly presentaron una concentración menor de albúmina en comparación con el grupo control, siendo significativamente estadístico ($p < 0.05$) en los dos últimos.

Se observó un comportamiento similar con los grupos AF+VE, AF+Gly, AF+VE+Gly los cuales mostraron una disminución en la concentración de albúmina sérica en comparación con el grupo AF siendo dicha disminución significativamente estadística ($p < 0.05$) de nuevo en los dos últimos.

Aún así todos los grupos permanecieron en el rango considerado como normal para este metabolito es decir, ninguno presentó concentraciones por debajo de 3.5-5 d/dL.

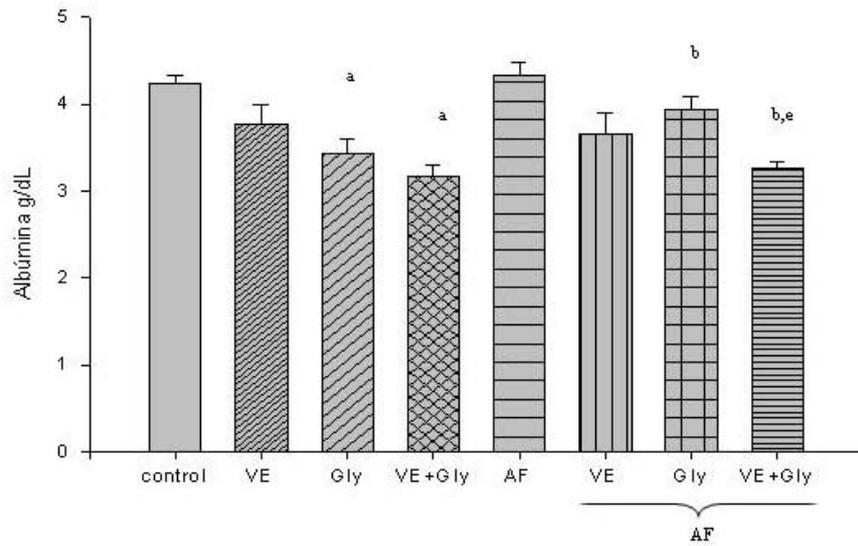


Figura 11. Efecto de la suplementación con los antioxidantes y la AF sobre la concentración sérica de albúmina.

Vitamina E (Vit E); Glicina (Gly); Actividad física (AF)

^a ($p < 0.01$ vs control)

^b ($p < 0.01$ vs AF)

^e ($p < 0.05$ AF+Gly vs AF+VE+Gly)

4.3. Concentración sérica de bilirrubina

En todos los grupos el nivel de bilirrubina (Figura 12) se mantuvo dentro del rango considerado como normal (<1.10 mg/dL) siendo los grupos VE y AF+VE+Gly los que mostraron los valores mas altos con un incremento del 560% y 740% respectivamente, en comparación al grupo control, curiosamente ninguno de estos valores resulto ser significativo estadísticamente. Por otro lado el grupo Gly y el VE+Gly si presentaron un incremento significativo estadísticamente ($p > 0.05$) en comparación al control aún cuando sus niveles están por debajo del grupo VE y el AF+VE+Gly. Los grupos que realizaron AF presentaron concentraciones bajas de éste metabolito, exceptuando el grupo AF+VE+Gly aunque nuevamente dicha elevación no es significativa en comparación con el grupo AF.

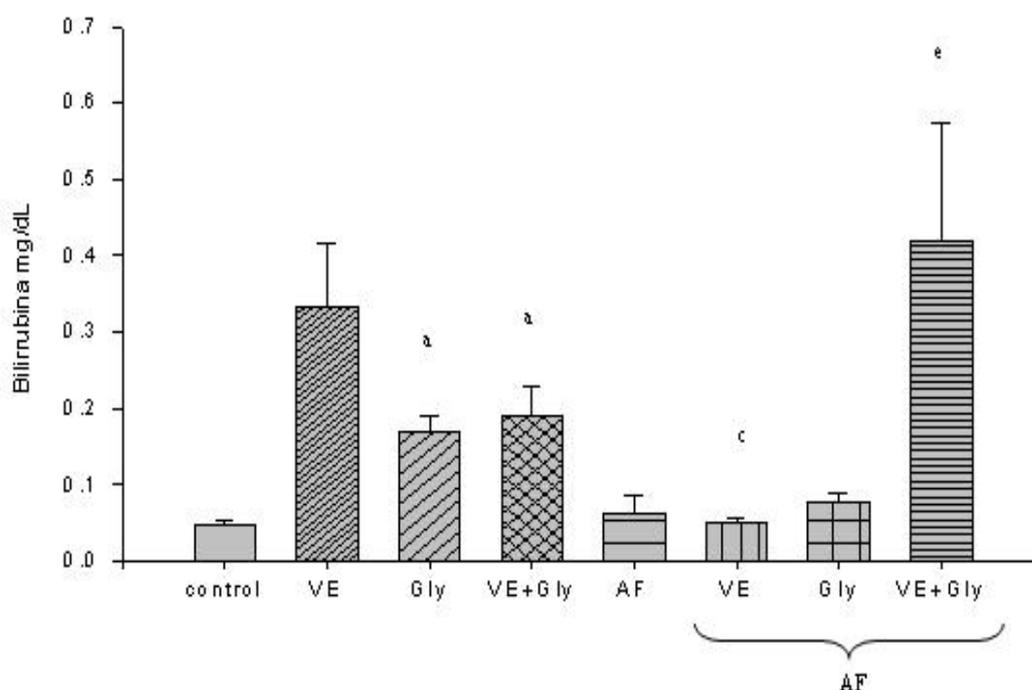


Figura 12. Efecto de la suplementación con antioxidantes y la AF sobre la concentración sérica de bilirrubina.

Vitamina E (Vit E); Glicina (Gly); Actividad física (AF)

^a ($p < 0.01$ vs control)

^c ($p < 0.05$ AF+VE vs AF+Gly)

^e ($p < 0.05$ AF+Gly vs AF+VE+Gly)

4.4. Concentración sérica de triglicéridos (TG)

La figura 13 nos muestra los resultados de las concentraciones de TG para los diferentes grupo, en la cual se observa que en los grupo que no realizaron AF, solo el VE incremento un 85% su concentración en comparación con el grupo control, sin que dicho incremento sea significativo. El AF mostro una elevación del 100% en comparación del grupo control, en este caso la diferencia si resulto significativa estadísticamente ($p < 0.01$), al administrar los antioxidantes el nivel de TG disminuye siendo los tres grupos AF+VE, AF+Gly y AF+VE+Gly significativamente ($p < 0.05$) menores en concentración de TG séricos a comparado con el grupo AF.

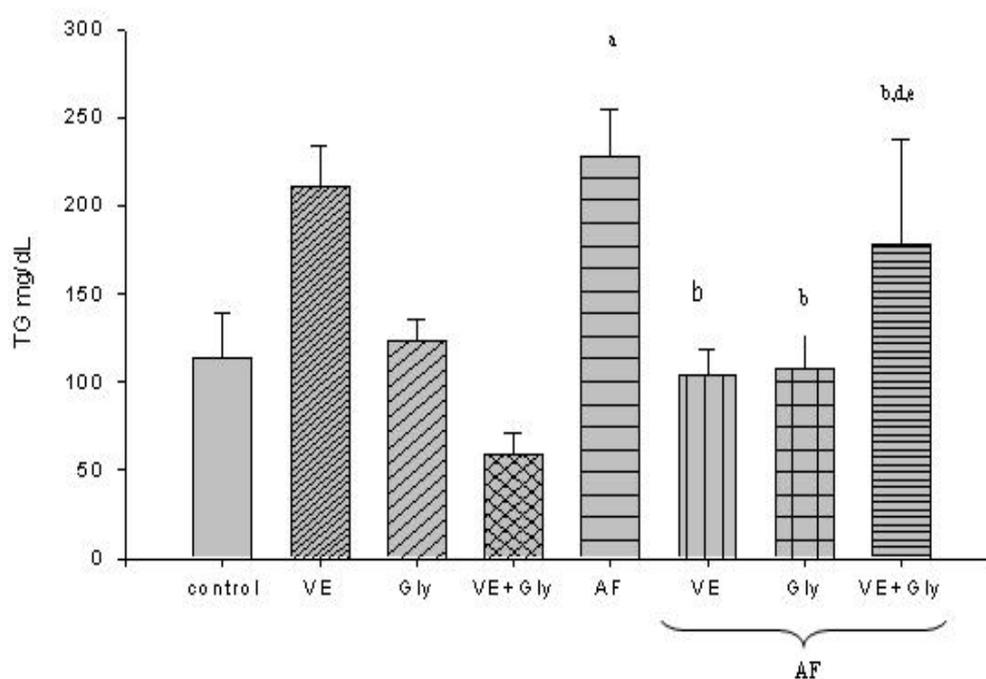


Figura 13. Efecto de la suplementación con los antioxidantes y de la AF sobre la concentración sérica de triglicéridos.

Vitamina E (Vit E); Glicina (Gly); Actividad física (AF)

^a ($p < 0.01$ vs control)

^b ($p < 0.01$ vs AF)

^d ($p < 0.05$ AF+VE vs AF+VE+Gly)

^e ($p < 0.05$ AF+Gly vs AF+VE+Gly)

5. Determinación del rendimiento físico.

Como se puede apreciar en la figura 14, el grupo control tuvo un rendimiento similar entre la semana 1,2 y 4, es decir solo en la semana 3 se puede observar un incremento importante.

En grupo AF+VE presento un rendimiento irregular a lo largo del estudio, ya que en la segunda semana fue inferior a la primera, en la tercera se incremento sin alcanzar el rendimiento inicial y en la cuarta fue similar a la tercera, pero en comparación con el grupo control, el rendimiento fue superior en las 4 semanas.

El grupo AF+Gly la gráfica nos muestra que el rendimiento de la primera semana fue inferior al del grupo suplementado con vitamina E, pero a diferencia de éste, aquí se observo un incremento gradual en la segunda y tercer semana, alcanzando incluso en este punto al rendimiento obtenido por el grupo AF+VE.

Para el grupo AF+VE+Gly se observo un comportamiento similar al grupo anterior, aumentando el rendimiento la segunda y tercer semana sucesivamente, pero en la cuarta semana dicho rendimiento se vio disminuido sin alcanzar niveles inferiores a la segunda semana. Aunque el comportamiento fue similar, cabe destacar que este fue el único grupo que aun siendo suplementado el rendimiento físico fue inferior al grupo AF.

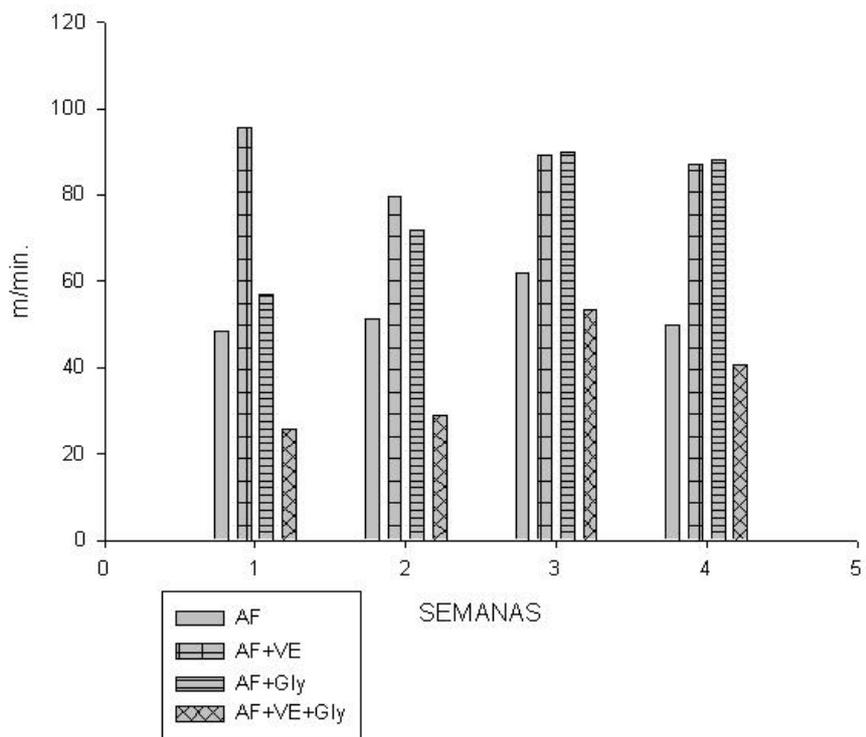


Figura 14. Efecto de la suplementación con antioxidantes sobre el rendimiento físico en ratas durante el ejercicio aeróbico.

Vitamina E (Vit E); Glicina (Gly); Actividad física (AF)

IX. DISCUSIÓN

Los efectos benéficos de la práctica del ejercicio aeróbico sobre un gran número de condiciones fisiológicas y en la prevención de diferentes enfermedades es bien conocido (5,6,49,51,60), sin embargo de igual manera la práctica del ejercicio aeróbico trae consigo la formación de RL conocidos como EROS. Existen diferentes mecanismos para la formación de EROS durante el ejercicio aeróbico, el principal mecanismo es el alto consumo de oxígeno el cual, incrementa el flujo de electrones en la cadena respiratoria de la mitocondria y por consecuencia un incremento en la producción de RL (11,17,52,53). Lo anterior lleva al organismo a un estado de estrés oxidativo, el cual es importante tratar de contrarrestar para minimizar los daños, se han realizado múltiples investigaciones donde se analiza el papel de los antioxidantes en la protección al organismo del ataque de los RL durante el ejercicio.

El objetivo de este estudio fue conocer el efecto de la suplementación con vitamina E así como con glicina sobre los parámetros de oxidación, así como determinar si dicha suplementación podía tener un efecto positivo en el rendimiento físico.

El incremento en la actividad de la enzima SOD, es un parámetro que se utiliza para determinar si algún elemento ayuda al organismo a elevar la respuesta antioxidante (7,15,16,17). Yu B y cols (2003) demostraron en su estudio que la suplementación con vitamina E incrementa la actividad de la SOD (63). Por otro lado algunas investigaciones mencionan que la glicina tiene un efecto protector contra la disminución en la actividad de las enzimas antioxidantes como la SOD, CAT Y GPx (33). Los datos obtenidos en ésta investigación demuestran que la administración de con los antioxidantes incremento ligeramente la actividad de la SOD en los grupos que no realizaron actividad física al ser comparados con el grupo control, mostrando que la suplementación ayuda a incrementar la respuesta antioxidante del organismo. En el grupo AF se observó un incremento promedio del 40% en la actividad de la SOD en los cuatro tejidos, comparado con el grupo control así como con los grupos que no realizaron actividad física, dicho efecto

había sido señalado anteriormente por otros autores, los cuales mencionan que el ejercicio por si solo ayuda a incrementar el potencial antioxidante del organismo (4,11,28). Se demostró que al administrar las vitaminas a los grupos que realizaron AF se incremento aun más la actividad de dicha enzima, confirmando reportado Senthilkumar y cols. (2004), donde señalan que la administración de glicina previene el descenso de la actividad de la SOD en hígado, bloqueando la producción de RL en las células Kupfer (40,69), de igual manera se observó un resultado semejante al obtenido por Asha y cols. los cuales reportan un incremento del potencial antioxidante endógeno que se refleja en el aumentando de la actividad de enzimas como la SOD y la CAT cuando se administra vitamina E y se realiza actividad física (66,67)

Un marcador de estrés oxidativo es la determinación de lipoperóxidos en plasma, diversos autores coinciden en señalar un incremento del MDA con el ejercicio físico (5,61,64). Kanter y cols. (1994), observaron que el ejercicio de elevada intensidad producía un aumento de la concentración de TBARS tanto en suero como en plasma, en sujetos altamente entrenados (61). Davies (1987), encontró un incremento similar de MDA tras el ejercicio en ratas no entrenadas (47).

En nuestro estudio encontramos que la concentración de MDA de los grupos que no realizaron actividad física no presentaron cambios importantes en comparación con el grupo control, por otro lado, observamos que los niveles de MDA se incrementaron significativamente en el grupo AF en comparación con el control. Lo anterior se observa en los cuatro tejidos analizados (hígado, corazón, pulmón y músculo). Cuando se administraron los antioxidantes se logró disminuir la concentración de MDA hasta en un 50 % en hígado, pulmón y músculo, a excepción del corazón donde la disminución es de alrededor del 20%, de esta manera se observa el papel protector de los antioxidantes sobre la oxidación de los lípidos de las membranas celulares, por lo tanto manteniendo la integridad y función de dichas células. Tanto la vitamina E como la glicina y la combinación de ambas fueron efectivas para disminuir la concentración de MDA que se genera con el ejercicio. La vitamina E reacciona con los radicales peroxilo, cediéndoles un

H para formar hidroperóxidos lipídicos que son retirados por la GPx, por este mecanismo protege a las membranas celulares de sufrir peroxidación (4,28,31,32). La glicina como ya se mencionó anteriormente, ejerce un efecto de bloqueo sobre la activación de la células de Kupffer que son productoras de radicales libres, por lo que protegen de igual manera a las biomoléculas del daño producido por los RL (40).

Se determinó la actividad de las enzimas AST y ALT, estas enzima se encuentra en el citoplasma y las mitocondrias de células del tejido cardíaco, hepático y esquelético, principalmente, y sirven como un marcador de daño a las tejidos. En nuestro estudio encontramos una elevación en la actividad de ambas enzimas en el grupo AF como ya se menciona anteriormente, elevación que podría ser atribuida a un daño a las membranas celulares por los RL a nivel hepático y/o muscular ya que estudios han reportado un aumento en su concentración después del ejercicio intenso (6) incluso se ha estudiado la elevación en la actividad de dichas enzimas a nivel hepático consecuencia del efecto toxico del alcohol (69). Al administrar los antioxidantes en los grupos que realizaban AF, se pudo observar que disminuían los niveles de AST y ALT en el suero, comprobando el efecto protector de la vitamina E y glicina contra el daño producido por el estrés oxidativo que otros autores han referido con anterioridad (68,74). Al proteger a las células de daño por RL, se evita que estas enzimas salgan de sus sitios de origen por lo que tiene menor actividad en plasma.

Los niveles de glucosa no presentaron alteraciones mayores, los grupos control y AF+Gly fueron los que mostraron la concentración mas alta, el grupo AF presento un disminución en comparación al grupo control, lo que coincide con estudios que muestran que el ejercicio es efectivo para regula la concentración de glucosa en plasma (4,49,51). A diferencia del grupo AF+Gly, los demás grupos que fueron suplementados con dicho antioxidantes mostraron niveles de glucosa mas bajas, por lo que se demuestra que la administración de glicina funciona como un hipoglucemiante (71,72).

El análisis de bilirrubina y albúmina son pruebas que se utilizan para determinar si existe daño a nivel hepático, en nuestro estudio se observó que en ambos parámetros, no sufrieron graves modificaciones ya sea con el ejercicio ni con la administración de los antioxidantes, ya que en todos los grupos ambos metabolitos se mantuvieron en concentraciones normales.

Varios estudios muestran el efecto benéfico de la suplementación con vitamina E disminuyendo los niveles de TG (64) en nuestro estudio se presentó una alteración de dicho metabolito en el grupo VE, en el cual también se vio incrementada la actividad de la AST, aunque no podemos hablar de un daño a nivel hepático pues la bilirrubina y albúmina no se encontraron afectadas en dicho grupo. Los siguientes dos grupos que sufrieron alteraciones en los niveles de TG realizaron actividad física, diversos estudios demuestran el papel benéfico que juega el ejercicio sobre el perfil de lípidos, disminuyendo el colesterol total, TG y las LDL y aumentando las HDL (6,49,51) por lo que tal efecto contradictorio podría deberse a que en estos dos grupos el tiempo de ejercitación no fue el suficiente para provocar dicha adaptación ya que los otros dos grupos que realizaron el ejercicio mantuvieron un nivel de TG bajo. En el caso del grupo AF dicha alteración podría estar relacionada con el incremento en la actividad de la AST, lo cual nos indicaría un daño a nivel hepático, lo cual provoca un cambio en el metabolismo de los TG elevando el nivel de los mismos. El tercer grupo que mostró una alta concentración de TG fue el AF+VE+Gly el cual podría explicarse como el caso anterior, aunque la elevación de AST y TG es menor que en el grupo AF, pero comparado con el grupo control si observamos un incremento en ambos niveles.

Investigaciones anteriores informan que la suplementación con antioxidantes no ayudó a incrementar el rendimiento en ratas entrenadas, incluso en deportistas, otras investigaciones reportan un efecto benéfico de la suplementación sobre el rendimiento (67), por lo que continúa la controversia de si los antioxidantes en verdad ayudan a mejorar el rendimiento o no.

En nuestra investigación evaluamos el rendimiento físico que presentaron los diferentes grupos sometidos al ejercicio aeróbico, pudimos observar que todos los grupos mantuvieron un rendimiento irregular a lo largo del estudio, la tercera semana es el punto donde se presentó el rendimiento más alto en los grupos AF, AF+Gly y AF+VE+Gly y para la última semana del estudio el rendimiento no aumentó y en algunos casos disminuyó un poco. Los grupos AF+VE y AF+Gly presentaron un rendimiento mayor al grupo control durante las cuatro semanas en cambio el grupo AF+VE+Gly mostró un rendimiento menor que el grupo control a lo largo del estudio aún así no podemos hablar de un efecto directo sobre el rendimiento físico, ya que todos los grupos presentaron el mismo patrón de comportamiento

X. CONCLUSIONES

- El ejercicio por si mismo incremento la actividad de la SOD, aunque al mismo tiempo se incrementa la concentración de MDA.
- La vitamina E así como la glicina incrementan la actividad la de enzima SOD confiriendo mayor protección antioxidante al organismo.
- El tratamiento con antioxidantes logro disminuir la concentración de MDA producida durante el ejercicio aeróbico, lo cual indica que ambos antioxidantes son efectivos para detener la peroxidación lípida.
- La suplementación con VE y/o Gly no produjo modificaciones importantes en parámetros de función hepática como lo son la albúmina, bilirrubina y enzimas AST y ALT.
- La administración de los antioxidantes no incremento el rendimiento físico de las ratas.
- La administración conjunta de los antioxidantes no mostro cambios significativos en comparación con los grupos donde la suplementación se realizo por separado.
- La suplementación con vitamina E y/o glicina logró proteger a los órganos relacionados con el ejercicio (corazón, hígado, pulmón y músculo) del daño oxidativo, pero no incremento el rendimiento físico de las ratas.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1)** Pérez PL. Estrés oxidativo: La paradoja del oxígeno. *Rev Cubana Endocrinol.* 2002; 11:139-142
- (2)** Grupo de Investigación en Nutrición Comunitaria y Estrés Oxidativo del IUNICS. Respirando a tu enemigo: cuando el oxígeno deriva en compuestos altamente destructivos. Disponible en: <http://www.uib.es/servei/comunicacio/sc/projectes/arxiu/nousprojectes/ero/erocast.pdf>. Acceso:13/08/2006
- (3)** Elejalde GJ. Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *An Med Interna (Madrid)* 2001; 18:326 – 335
- (4)** Martínez CM, Sánchez MC. Especies reactivas de oxígeno y defensa antioxidante. En: *Nutrición Clínica, Implicaciones del estrés oxidativo y de los alimentos funcionales.* 2001. (ed) SENPF, España. pp 81-107
- (5)** Clarkson MP, Thompson HS. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health?. *Am J Clin Nutr.* 2000; 72:637-646
- (6)** López C.J. Adaptaciones hematológicas al ejercicio. En: *Fisiología del ejercicio.* 1998. 2ª Edición. Médica Panamericana, España. pp 124-131
- (7)** Gutiérrez SJ. Daño al hígado por radicales libres derivados del oxígeno. En: *Alcohol, alcoholismo y cirrosis.* 2007 1ª Edición (ed) UAEH; México. pp 97-102
- (8)** Gutiérrez SJ. ¿Qué sabe usted acerca de... radicales libres? *Revista Mexicana de ciencias farmacéuticas.* 2006; 4:69-73
- (9)** Gómez MC. Papel de los radicales libres en el ejercicio físico agotador. Efecto de la administración de antioxidantes (Tesis doctoral). España. Universidad de Valencia. 2004.
- (10)** Liochev SI and Fridovich I. The role of O₂⁻. in the production of HO₂·: In vitro and in vivo. *Free Rad. Biol. Med.* 1994; 16: 29-33.
- (11)** Evans WJ. Vitamin E, vitamin C, and exercise. *Am J Clin Nutr.* 2000; 72:647-652
- (12)** Rodríguez PJ, Menéndez LJ, Trujillo LJ. Radicales libres en la Biomedicina y estrés oxidativo. *Rev Cubana Med Milit.* 2001; 30:36-448

- (13) Frei B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: Mechanisms of action. *Am. J. Med.* 1994; 97: 5-13.
- (14) Aust SD, Chignell CF et al. Free radicals in toxicology. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1993; 120: 168-78.
- (15) Foster RE and Estabrook RW. Is oxygen an essential nutrient?. *Annu. Rev. Nutr.* 1993; 13: 383-403.
- (16) Benitez ZD. Vitaminas y oxido reductasas antioxidantes: Defensa ante estrés oxidativo. *Rev Cubana Invest Biomed.* 2006;25(2):8-16
- (17) Bianchi PM, Antunes GL. Free radicals and the main dietary antioxidants. *Rev Nutr Campinas.* 1999;12(2):123-130
- (18) Efdeportes [en línea] Del Castillo VC. Antioxidantes, radicales libres y ejercicio. Dirección: <http://www.efdeportes.com>. Acceso: 13/09/2005
- (19) Halliwell B. Free radicals, antioxidants and human disease: Curiosity, cause or consequence? *Lancet.* 1994; 344: 721-724.
- (20) Gonzalez TM, Batancourt RM, Ortiz MR. Daño oxidativo y antioxidantes. *Biquímica.* 2000;25(1):3-9
- (21) Thomas JA. Estrés oxidativo y defensa oxidante. En: *Nutrición en salud y enfermedad.* 2002. 9ª Edición. (ed) M. E. Shils. Mc Graw Hill, México. pp 863-873
- (22) Stadtman ER. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. *Free Rad. Biol. Med.* 1999; 9:315-325.
- (23) Halliwell B and Auroma OI. DNA damage by oxygen derived species. Its mechanism of action and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett.* 1999; 281:9-19.
- (24) Breen AP and Murphy JA. Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Rad. Biol. Med.* 1995; 18:1033-1077.
- (25) Albertini R, Rindi S et al. The effect of cornea proteoglycans on liposome peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 1996; 327: 207-214.
- (26) Gutteridge JM and Stocks J. Caeruloplasmin: physiological and pathological perspectives. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 1981; 14: 257-329.

- (27) Halliwell B and Gutteridge JM. The antioxidants of human extracellular fluids". Arch Biochem Biophys. 1990; 280: 1-8.
- (28) Fomento de nutrición y salud. Orientación alimentaria: glosario de términos. Cuadernos de nutrición 2001; 24(1):30 -32
- (29) Martínez SM, Barrado da, Zubillaga M, Hager A, De Paoli T, Boccio J. Conceptos actuales del metabolismo del glutatión. Acta Bioquim Clín Latinoam. 2006;40(1):45-51
- (30) Pacheco LD. Estructura de proteínas. En: Bioquímica estructural y aplicada a la medicina. 1996. (ed) IPN; México. pp 25-34
- (31) Spallholz JE, Mallory BL, Driskell AJ. Vitamin E. En: Nutrition, Chemistry and Biology. 2ª Edición. (ed) CRC Press; pp 69-72
- (32) Fernández VA. Estructura y propiedades de las proteínas En: Bioquímica de Laguna. 2002. 5ª Edición (ed) Manual Moderno; México pp 113
- (33) Matilla B, Mauriz JL, Culebras JM, González- Gallego J, González P. La glicina: un nutriente antioxidante protector celular. 2002. *Nutr Hosp.*17(1): 2-9.
- (34) Williams HM. Vitaminas reguladoras orgánicas. En: Nutrición para la salud, condición física y deporte. 2005. 7ª Edición (ed) Mc Graw Hill; México. pp 20, 258-261
- (35) Demant TW, Rhodes EC. Effects of creatine supplementation on exercise performance. Sports Med. 1999;28(1):49-60
- (36) Bembien MG, Lamont HS. Creatine supplementation and exercise performance: recent findings. Sports Med. 2005;35(2):107-125
- (37) Williams MH. Facts and Fallacies of purported ergogenic amino acid supplements. 1999;18(3):633-49.
- (38) Kreider RB. Effects of creatine supplementation on performance and training adaptations. Mol Cell Biochem. 2003;244(1-29):89-94
- (39) Mujika I, Padilla S. Creatine supplementation as an ergogenic aid for sports performance in highly trained athletes: a critical review. Int J Sport Med. 1997;18(7):491-496

- (40)** Ramos IN. La importancia del ejercicio de alta intensidad y su repercusión en el crecimiento, menarquía y estado nutricional de jóvenes adolescentes. *Nutrición Clínica*. 2004;7(4):251-261
- (41)** Wayner DD, Burton GW et al. The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxyl radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochim Biophys Acta*. 1987; 924: 408-19.
- (42)** Thomas MJ. Urate causes the human polymorphonuclear leukocyte to secrete superoxide. *Free Radic Biol Med*. 1992; 12: 89-91.
- (43)** Peden DB, Hohman R et al. Uric acid is a major antioxidant in human nasal airway secretions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990; 87: 7638-42.
- (44)** Demple B and Halbrook J. Inducible repair of oxidative DNA damage in *Escherichia coli*. *Nature*. 1983; 304: 466-8.
- (45)** Sevanian A and Kim E. Phospholipase A2 dependent release of fatty acids from peroxidized membranes. *J Free Radic Biol Med*. 1985; 1: 263-71.
- (46)** Dizdaroglu M. Quantitative determination of oxidative base damage in DNA by stable isotope-dilution mass spectrometry. *FEBS Lett*. 1993; 315: 1-6.
- (47)** Davies KJA. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects. *J. Biol. Chem.* 1987; 262: 9895-9901.
- (48)** Pacifici RE and Davies KJ. Protein, lipid and DNA repair systems in oxidative stress: the free radical theory of aging revised." *Gerontology*. 1991; 37:166-180.
- (49)** Enciclopedia médica en español. Ejercicio Aeróbico. Dirección: http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/esp_imagepages/19383.htm.
Acceso: 2/10/2005
- (50)** Hernández RS. Medicina de la actividad física y deportiva. *Rev Fac Med UNAM*. 1997;40(6):234-237
- (51)** Bonilla FJ, Narvaéz R, Chuaire L. El deporte como causa de estrés oxidativo y hemólisis. *Colomb Med*. 2005;36:234-237
- (52)** Alarcon LF, Piñar M. 2003. La vitamina E como complement nutricional en rendimiento deportivo. *Efdeportes* (en línea). Dirección: <http://www.efdeportes.com>. Acceso: 20/10/2006

- (53) Dornelles SC, Reischak OA. 2004. Radicales libres de oxígeno y ejercicio: mecanismos de síntesis y de la adaptación al entrenamiento físico. *Med Esporte*. 10(4):
- (54) Jenkins RR. Exercise and oxidative stress methodology: a critique. *Am J Clin Nutr*. 2000;72(suppl):670-674
- (55) Gomez-Cabrera MC, Martínez A, Santangelo G, Pallardó FV, Sastre J, Viña J. Oxidative stress in marathon runners: interest of antioxidant supplementation. *Br J Nutr*. 2006; 96: 31-33
- (56) Viña J, Gimeno A, Sastre J, Desco C, Asensi M, Pallardó FV, Cuesta A, Ferrero JA, Terada LS, Repine JE. Mechanism of free radical production in exhaustive exercise in humans and rats; role of xanthine oxidase and protection by allopurinol. *IUBMB Life*. 2000; 49: 539-544
- (57) Viña J, Gomez-Cabrera MC, Lloret A, Marquez R, Miñana JB, Pallardó FV, Sastre J. Free radicals in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants. *IUBMB Life*. 2000; 50: 271-277
- (58) Sanganahalli BG, Joshi PG, Joshi NB. Xanthine oxidase, nitric oxide synthase and phospholipase A(2) produce reactive oxygen species via mitochondria. *Brain Res*. 2005; 10: 200-2003
- (59) Bloomer RJ, Goldfarb AH, Wideman L, McKenzie MJ, Cansitt LA. Effect of acute aerobic and anaerobic exercise on blood markers of oxidative stress. *J Strength Cond Res*. 2005; 19:216-28
- (60) Williams MH. Dietary supplements and sport performance: Introduction and Vitamins. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*. 2004; 1:1-6
- (61) Kanter MM. Free radicals, exercise, and antioxidant supplementation. *Int J Sport Nutr*. 1994;4:205-220
- (62) Vasankari TJ, Kujala UM, Vasankari TM, Vuorimaa T, Ahotupa M. Increased serum and low-density lipoprotein antioxidant potential after antioxidant supplementation in endurance athletes. *Am J Clin Nutr*. 1997; 65:1052-1056
- (63) Yu B, Quin CH, Lou JW, Yang JC, Lin WT, Wen XY, Huang LY. Effect of antioxidant vitamins on the exercise performance of rats. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*. 2003; 23:892-894

- (64) Kim E, Park H, Cha YS. Exercise training and supplementation with carnitine and antioxidant increases carnitine store, triglyceride utilization, and endurance in exercising rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2004; 50(5):334-343
- (65) Metin G, Atukeren P, Gumustas MK, Belce A, Kayserilioglu A. The effect of vitamin E treatment on oxidative stress generated in trained rats. *Tohoku J Exp Med*. 2002; 198:47-53
- (66) Asha Devi S, Prathima S, Subramayam MV. 2003 Dietary vitamin E and physical exercise: II. Antioxidant status and lipofuscin-like substances in aging rat heart. *Exp Gerontol*. 2003; 38:291-294
- (67) Asha Devi S, Prathima S, Subramayam MV. Dietary vitamin E and physical exercise: I. Altered endurance capacity and plasma lipid profile in ageing rats. *Exp Gerontol*. 2003; 38(3):285-290
- (68) Senthilkumar R, Nalini N. Effect of glycine on tissue fatty acid composition in an experimental model of alcohol-induced hepatotoxicity. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2004; 31:456-61.
- (69) Senthilkumar R, Viswanathan P, Nalini N. Effect of glycine on oxidative stress in rats with alcohol induced liver injury. *Pharmazie*. 2004; 59:55-60.
- (70) Senthilkumar R, Sengottuvelan M, Nalini N. Protective effect of glycine supplementation on the levels of lipid peroxidation and antioxidant enzymes in the erythrocyte of rats with alcohol-induced liver injury. *Cell Biochem Funct*. 2004;22:123-8.
- (71) Carvajal SG, Zamudio CP, Carvajal JM, Juárez CE. Prevención de los daños producidos por la diabetes mellitus y la senescencia. *Gac Med Mex*. 2007; 143(1):51-59
- (72) Lezcano MD, Terán OL, Carvajal SG, Gutiérrez CM, Terán GD, Estrada PS. Effect of glycine in the immune response of the experimentally diabetic rats. *Revista Alergia México*. 2006; 53:212-216
- (73) Morales GJ, Gutiérrez SJ, Yáñez L, Villagómez RC, Badillo RJ, Hernández MR. Morphological and biochemical effects of a low ethanol dose on rat liver regeneration. *Digestive Diseases and Sciences*. 1999;(44)10:1963-1974

(74) Song Z, Zhou Z, Chen T, Hill D, Kang J, Barve S, McClain C. S-Adenosymethionine (SAME) protects against acute alcohol induced hepatotoxicity in mice. *Journal Nutritional Biochemistry*. 2003; 14:591-597

(75) Halliwell B, Gutterioge JMC. *Free radical in biology and medicine*. Oxford: Clarendon, 1992;1:142

ANEXO 1



ANEXO 1



GLUCOSE -TR

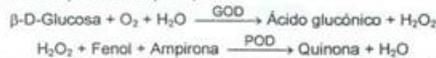
Glucosa
Trinder. GOD-POD

Determinación cuantitativa de glucosa IVD

Conservar a 2-8°C

PRINCIPIO DEL MÉTODO

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



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

SIGNIFICADO CLÍNICO

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

REACTIVOS

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

PREPARACIÓN

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

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

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

GLUCOSE CAL

Una vez abierto, es estable 1 mes si se mantienen los viales bien cerrados a 2-8°C, protegidos de la luz y se evita su contaminación.

Indicadores de deterioro de los reactivos:

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

MATERIAL ADICIONAL

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

MUESTRAS

Suero o plasma, libre de hemólisis¹ y LCR. El suero debe separarse lo antes posible del coágulo. Estabilidad: La glucosa en suero o plasma es estable 3 días a 2-8°C.

PROCEDIMIENTO

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

	Blanco	Patrón	Muestra
RT (mL)	1,0	1,0	1,0
Patrón ^(100µL) (µL)	—	10	—
Muestra (µL)	—	—	10

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

CÁLCULOS

$$\frac{(A)\text{Muestra}}{(A)\text{Patrón}} \times 100 (\text{Conc. Patrón}) = \text{mg/dL de glucosa en la muestra}$$

Factor de conversión: mg/dL x 0,0555= mmol/L.

CONTROL DE CALIDAD

Es conveniente analizar junto con las muestras sueros control valorados: SPINTROL H Normal y Patológico (Ref. 1002120 y 1002210). Si los valores hallados se encuentran fuera del rango de tolerancia, revisar el instrumento, los reactivos y el calibrador. Cada laboratorio debe disponer su propio Control de Calidad y establecer correcciones en el caso de que los controles.

VALORES DE REFERENCIA¹

Suero o plasma:
60 – 110 mg/dL ≅ 3,33 – 6,10 mmol/L
LCR:
60 – 80 % del valor en sangre

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

CARACTERÍSTICAS DEL METODO

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

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

Precisión:

	Intraserie (n=20)		Interserie (n=20)	
Media (mg/dL)	96,8	241	98,4	248
SD	0,81	1,43	1,55	3,73
CV (%)	0,83	0,59	1,58	1,50

Sensibilidad analítica: 1 mg/dL = 0,0036 A.

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

Los resultados obtenidos con 50 muestras fueron los siguientes:

Coefficiente de correlación (r): 0,99.

Ecuación de la recta de regresión: y = 1,0x + 0,12.

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

INTERFERENCIAS

No se han observado interferencias con: hemoglobina hasta 4 g/L, bilirubina hasta 20 mg/L, creatinina hasta 100 mg/L, galactosa hasta 1 g/L. Se han descrito varias drogas y otras sustancias que interfieren en la determinación de la glucosa^{5,6}.

NOTAS

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

BIBLIOGRAFÍA

- Kaplan A. Glucose. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton 1984; 1032-1036.
- Trinder P. Ann Clin Biochem 1969; 6: 24-33.
- Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACCC Press, 1995.
- Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACCC 2001.
- Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACCC 1999.
- Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed AACCC 1995.

PRESENTACIÓN

Ref:1001190 Cont. 4 x 125 mL
Ref:1001191 Cont. 4 x 250 mL

67



IMPORTADORES EXCLUSIVOS : LAB CENTER DE MEXICO S.A. DE C.V.
Colina de las Termas #35 Fracc. Boulevardes Naucalpan Edo. de México C.P. 53140
TEL: 01 (55) 5360-8772 LAJLA SIN COSTO 01 800 506 SPIN (7746)

ANEXO 2

SPINREACT

ALBUMIN

Albumina

Verde bromocresol. Colorimétrico

Determinación cuantitativa de albúmina IVD

Conservar a 2-8°C

PRINCIPIO DEL METODO

La albúmina se combina con el verde de bromocresol a pH ligeramente ácido, produciéndose un cambio de color del indicador, de amarillo verdoso a verde azulado proporcional a la concentración de albúmina presente en la muestra ensayada^{1,2,3,4}.

SIGNIFICADO CLINICO

La albúmina es una de las más importantes proteínas plasmáticas producidas en el hígado. Entre sus múltiples funciones se incluye nutrición, mantenimiento de la presión oncótica y transporte de sustancias como Ca⁺⁺, bilirrubina, ácidos grasos, drogas y esteroides. Alteraciones en los valores de albúmina indican enfermedades del hígado, desnutrición, lesiones de la piel como dermatitis, quemaduras severas o deshidratación^{1,7,8}. El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio.

REACTIVOS

R	Verde bromocresol pH 4,2	50 mmol/L
ALBUMIN CAL	Patrón primario acuoso de Albúmina 5 g/dL	

PREPARACION

El reactivo y calibrador están listos para su uso.

CONSERVACION Y ESTABILIDAD

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

ALBUMIN CAL

Una vez abierto, es estable 1 mes si se mantienen los viales bien cerrados a 2-8°C, protegidos de la luz y se evita su contaminación.

Indicadores de deterioro de los reactivos:

- Presencia de partículas y turbidez.
- Absorbancia (A) del Blanco a 630 nm \geq 0,40.

MATERIAL ADICIONAL

- Espectrofotómetro o analizador para lecturas a 630 nm.
- Cubetas de 1,0 cm de paso de luz.
- Equipamiento habitual de laboratorio.

MUESTRAS

Suero o plasma libre de hemólisis¹: Estabilidad 1 mes a 2-8°C o 1 semana a 15-25°C.

PROCEDIMIENTO

1. Condiciones del ensayo:
 - Longitud de onda: 630 nm (600-650)
 - Cubeta: 1 cm paso de luz
 - Temperatura 15-25°C
2. Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.
3. Pipetear en una cubeta:

	Blanco	Patrón	Muestra
R (mL)	1,0	1,0	1,0
Patrón (Nota 1-2) (µL)	--	5	--
Muestra (µL)	--	--	5

4. Mezclar e incubar 10 min a temperatura ambiente (15-25°C).

5. Leer la absorbancia (A) del Patrón y la muestra, frente al Blanco de reactivo. El color es estable 1 hora a temperatura ambiente.

CALCULOS

$$\frac{(A)_{\text{Muestra}}}{(A)_{\text{Patrón}}} \times 5 \text{ (Conc Patrón)} = \text{g/dL de albúmina en la muestra}$$

Factor de conversión: g/dL x 144,9 = µmol/L

CONTROL DE CALIDAD

Es conveniente analizar junto con las muestras sueros control valorados: SPINTROL H Normal y Patológico (Ref. 1002120 y 1002210). Si los valores hallados se encuentran fuera del rango de tolerancia, revisar el instrumento, los reactivos y el calibrador. Cada laboratorio debe disponer su propio Control de Calidad y establecer correcciones en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias.

VALORES DE REFERENCIA

3,5 a 5,0 g/dL¹.
Estos valores son orientativos. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

CARACTERISTICAS DEL METODO

Rango de medida: Desde el límite de detección de 0,04 g/dL hasta el límite de linealidad de 6 g/dL.

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

Precisión:

	Intraserie (n= 20)		Interserie (n= 20)	
Media (g/dL)	3,38	5,80	3,30	5,67
SD	0,02	0,03	0,26	0,04
CV (%)	0,52	0,49	0,78	0,69

Sensibilidad analítica: 1 g/dL = 0,126 A.

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

Los resultados obtenidos con 50 muestras fueron los siguientes:

Coefficiente de correlación (r): 0,99.

Ecuación de la recta de regresión: y = 0,98x + 0,09.

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

INTERFERENCIAS

Bilirrubina hasta 110 mg/L, hemoglobina hasta 1 g/L y lipemia hasta 10 g/L, interfieren^{1,4}.

Se han descrito varias drogas y otras sustancias que interfieren en la determinación de la albúmina^{5,6}.

NOTAS

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

BIBLIOGRAFIA

1. Gender S. Uric acid. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton 1984; 1268-1273 and 425.
2. Rodkey F L. Clin Chem 1965; 11: 478-487.
3. Webster D. Clin Chem. 1974; Acta 53: 109-115.
4. Doumas BT Clin Chem. 1971; Acta 31: 87-96.
5. Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC Press, 1995.
6. Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC 2001.
7. Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACC 1999.
8. Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed AACC 1995.

PRESENTACION

Ref: 1001020 Cont. 2 x 250 mL

BSDDT02 Ed.2003



SPINREACT, S.A. Ctra. Santa Coloma, 7 E-17176 SANT ESTEVE DE BAS (GI) SPAIN
Tel. +34 972 69 08 00 Fax +34 972 69 00 99. e-mail: spinreact@spinreact.com

ANEXO 3



BILIRUBIN T&D

Bilirrubina Total y Directa DMSO. Colorimétrico

Determinación cuantitativa de bilirrubina IVD

Conservar a 2-8°C

PRINCIPIO DEL MÉTODO

La bilirrubina se convierte en azobilirrubina mediante el ácido sulfanílico diazotado midiéndose fotométricamente. De las dos fracciones presentes en suero, bilirrubin-glucuronido y bilirrubina libre ligada a la albúmina, sólo la primera reacciona en medio acuoso (bilirrubina directa) precisando la segunda la solubilización con dimetilsulfóxido (DMSO) para que reaccione (bilirrubina indirecta). En la determinación de la bilirrubina indirecta se determina también la directa, correspondiendo el resultado a la bilirrubina total. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de bilirrubina presente en la muestra ensayada^{1,2}.

SIGNIFICADO CLÍNICO

La bilirrubina se origina por la degradación de la hemoglobina. Es transportada del hazo al hígado y se excreta en la bilis. La hiperbilirrubinemia es el resultado de un incremento de la bilirrubina en plasma. Causas más probables de la hiperbilirrubinemia: Bilirrubina Total (T): Aumento de la hemólisis, alteraciones genéticas, anemia neonatal, alteraciones eritropoyéticas, presencia de drogas. Bilirrubina Directa (D): Colestasis hepática, alteraciones genéticas y alteraciones hepáticas^{3,4}. El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio.

REACTIVOS

R 1 (D)	Ácido sulfanílico	30 mmol/L
	Ácido clorhídrico (ClH)	150 mmol/L
R 2 (T)	Ácido sulfanílico	30 mmol/L
	Ácido clorhídrico (ClH)	50 mmol/L
	Dimetilsulfóxido (DMSO)	7 mol/L
R 3	Sodio nitrilo	29 mmol/L
Opcional	BILIRRUBIN CAL Calibrador de Bilirrubina 20 mg/dL Ref. 1002210	

PRECAUCIONES

Ácido clorhídrico (ClH): Irritante (Xi) R36/37/38 Irrita los ojos, la piel y las vías respiratorias. S26: En caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua y acudir a un médico.

PREPARACIÓN

Todos los reactivos están listos para su uso.

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

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

Indicadores de deterioro de los reactivos:

- Presencia de partículas y turbidez.
- Desarrollo de color en el R 2.

MATERIAL ADICIONAL

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

MUESTRAS

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

PROCEDIMIENTO

- Condiciones del ensayo:
Longitud de onda: 555 nm (530-580)
Cubeta: 1 cm paso de luz
Temperatura: 15-25°C
- Ajustar el espectrofotómetro a cero frente a agua destilada.
- Pipetear en una cubeta:

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

- Mezclar e incubar exactamente 5 minutos a 15-25°C.
- Leer la absorbancia (A).

CÁLCULOS

- Con Calibrador:

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

- Con Factor:

$$((A) \text{ Muestra} - (A) \text{ Blanco Muestra}) \times \text{Factor}^* = \text{mg/dL bilirrubina en la muestra}$$

$$\text{Factor} = \frac{\text{Concentración del Calibrador}}{(A) \text{ Calibrador} - (A) \text{ Blanco Calibrador}}$$

$$\text{Factor teórico: Bilirrubina (T)} = 19,1 ; \text{Bilirrubina (D)} = 14$$

$$\text{Factor de conversión: mg/dL} \times 17,1 = \mu\text{mol/L}$$

CONTROL DE CALIDAD

Es conveniente analizar junto con las muestras sueros control valorados:

SPINROL H Normal y Patológico (Ref. 1002120 y 1002210).

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

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

VALORES DE REFERENCIA¹

Bilirrubina Total Hasta 1,10 mg/dL \approx 18,81 $\mu\text{mol/L}$

Bilirrubina Directa Hasta 0,25 mg/dL \approx 4,27 $\mu\text{mol/L}$

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

CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO

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

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

Precisión:

Bilirrubina T	Intraserie (n= 20)		Interserie (n= 20)	
Media (mg/dL)	1,12	5,36	1,01	5,28
SD	0,02	0,12	0,04	0,12
CV (%)	2,16	2,27	4,77	2,38

Bilirrubina D	Intraserie (n= 20)		Interserie (n= 20)	
Media (mg/dL)	0,64	2,28	0,68	2,53
SD	0,01	0,02	0,02	0,05
CV (%)	1,91	1,10	2,91	1,95

Sensibilidad analítica: 1 mg/dL = 0,015 A (T).
1 mg/dL = 0,073 A (D).

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

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

INTERFERENCIAS

La presencia de hemólisis disminuye el valor de bilirrubina^{1,2}.

Se han descrito varias drogas y otras sustancias que interfieren con la determinación del bilirrubina^{3,4}.

NOTAS

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

BIBLIOGRAFÍA

- Kaplan A et al. Bilirubin. Clin. Chem. The C.V. Mosby Co. St. Louis - Toronto - Princeton 1984; 1238-1241, 436 and 650.
- Malloy H T. et al. The determination of bilirubin with the photoelectric colorimeter. J. Biol Chem 1937; 112, 2; 481-491.
- Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC Press, 1995.
- Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC 2001.
- Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACC 1999.
- Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed AACC 1995.

PRESENTACIÓN

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



ANEXO 4

SPINREACT



TRIGLYCERIDES

Triglicéridos GPO-POD. Enzimático colorimétrico

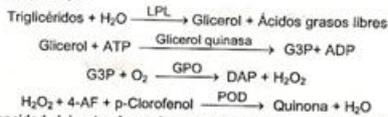
Determinación cuantitativa de triglicéridos IVD

Conservar a 2-8°C

PRINCIPIO DEL METODO

Los triglicéridos incubados con lipoproteinlipasa (LPL) liberan glicerol y ácidos grasos libres. El glicerol es fosforilado por glicerolfosfato deshidrogenasa (GPO) y ATP en presencia de glicerol quinasa (GK) para producir glicerol-3-fosfato (G3P) y adenosina-5-difosfato (ADP). El G3P es entonces convertido a dihidroxiacetona fosfato (DAP) y peróxido de hidrogeno (H₂O₂) por GPO.

Al final, el peróxido de hidrogeno (H₂O₂) reacciona con 4-aminofenazona (4-AF) y p-clorofenol, reacción catalizada por la peroxidasa (POD) dando una coloración roja:



La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de triglicéridos presentes en la muestra ensayada^{1,2,3}.

SIGNIFICADO CLINICO

Los triglicéridos son grasas que suministran energía a la célula. Al igual que el colesterol, son transportados a las células del organismo por las lipoproteínas en la sangre. Una dieta alta en grasas saturadas o carbohidratos puede elevar los niveles de triglicéridos.

Su aumento es relativamente inespecífico. Diversas dolencias, como ciertas disfunciones hepáticas (cirrosis, hepatitis, obstrucción biliar) o diabetes mellitus, pueden estar asociadas con su elevación^{3,4,5}. El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio.

REACTIVOS

R 1	GOOD pH 7,5	50 mmol/L
Tampón	p-Clorofenol	2 mmol/L
R 2	Lipoprotein lipasa (LPL)	150000 U/L
	Glicerol quinasa (GK)	500 U/L
	Glicerol-3-oxidasa (GPO)	2500 U/L
	Peroxidasa (POD)	440 U/L
	4 - Aminofenazona (4-AF)	0,1 mmol/L
Enzimas	ATP	0,1 mmol/L
TRIGLYCERIDES CAL	Patrón primario acuoso de Triglicéridos 200 mg/dL	

PREPARACION

Reactivo de trabajo (RT): Disolver (→) el contenido de un vial de R 2 Enzimas en un frasco de R 1 Tampón.

Ref: 1001310 Reactivo de trabajo (RT): Reconstituir (→) el contenido de un vial de R 2 Enzimas en 10 mL de R 1 Tampón.

Tapar y mezclar suavemente hasta disolver su contenido.
RT Estabilidad: 6 semanas en nevera (2-8°C) o una semana a 15-25°C.

CONSERVACION Y ESTABILIDAD

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

TRIGLYCERIDES CAL

Una vez abierto, es estable 1 mes si se mantienen los viales bien cerrados a 2-8°C, protegidos de la luz y se evita su contaminación.

Indicadores de deterioro de los reactivos:

- Presencia de partículas y turbidez.
- Absorbancia (A) del Blanco a 505 nm ≥ 0,14.

MATERIAL ADICIONAL

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

MUESTRAS

Suero y plasma heparinizado o EDTA¹. Estabilidad de la muestra: 5 días a 2-8°C.

PROCEDIMIENTO

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

- Pipetear en una cubeta:

	Blanco	Patrón	Muestra
RT (mL)	1,0	1,0	1,0
Patrón ^(100001,20) (µL)	--	10	--
Muestra (µL)	--	--	10

- Mezclar e incubar 5 minutos a 37°C o 10 min. a temperatura ambiente.
- Leer la absorbancia (A) del Patrón y la muestra, frente al Blanco de reactivo. El color es estable como mínimo 30 minutos.

CAI CULOS

$$\frac{(A)_{\text{Muestra}}}{(A)_{\text{Patrón}}} \times 200 (\text{Conc. Patrón}) = \text{mg/dL de triglicéridos en la muestra}$$

Factor de conversión: mg/dL x 0,0113 = mmol/L.

CONTROL DE CALIDAD

Es conveniente analizar junto con las muestras sueros control valorados: SPINROL H Normal y Patológico (Ref. 1002120 y 1002210). Si los valores hallados se encuentran fuera del rango de tolerancia, revisar el instrumento, los reactivos y el calibrador. Cada laboratorio debe disponer su propio Control de Calidad y establecer correcciones en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias.

VALORES DE REFERENCIA

Hombres: 40 – 160 mg/dL
Mujeres: 35 – 165 mg/dL

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

CARACTERISTICAS DEL METODO

Rango de medida: Desde el límite de detección de 0,7 mg/dL hasta el límite de linealidad de 1000 mg/dL.

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

Precisión:

Media (mg/dL)	Intra serie (n=20)		Inter serie (n=20)	
	118	216	119	215
SD	0,67	0,94	2,17	2,91
CV (%)	0,60	0,43	1,83	1,36

Sensibilidad analítica: 1 mg/dL = 0,0012 A.

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

Los resultados obtenidos con 50 muestras fueron los siguientes:

Coefficiente de correlación (r): 0,996.

Ecuación de la recta de regresión: y = 1,00x + 0,0743.

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

INTERFERENCIAS

No se han observado interferencias con bilirrubina hasta 170 µmol/L y hemoglobina hasta 10 g/L².

Se han descrito varias drogas y otras sustancias que interfieren en la determinación de los triglicéridos^{4,5}.

NOTAS

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

BIBLIOGRAFIA

- Buccolo G et al. Quantitative determination of serum triglycerides by use of enzymes. Clin Chem 1973; 19 (5): 476-482.
- Fossati P et al. Clin. Chem 1982; 28(10): 2077-2080.
- Kaplan A et al. Triglycerides. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis, Toronto, Princeton 1984; 437 and Lipids 1194-1206.
- Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC Press, 1995.
- Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC 2001.
- Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACC 1999.
- Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed AACC 1995.

PRESENTACION

Ref: 1001310	5 x 10 mL
Ref: 1001311	10 x 20 mL
Ref: 1001312	10 x 50 mL
Ref: 1001313	4 x 125 mL
Ref: 1001314	4 x 250 mL

BSDTT31 Ed.2003



SPINREACT S.A. Ctra.Santa Coloma, 7 E-17176 SANT ESTEVE DE BAS (GI) SPAIN

ANEXO 5



GPT (ALT)

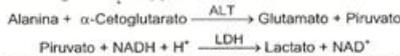
NADH. Cinético UV. IFCC rec.

Determinación cuantitativa de alanina aminotransferasa GPT (ALT) IVD

Conservar a 2-8°C

PRINCIPIO DEL METODO

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



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

SIGNIFICADO CLINICO

La ALT es una enzima intracelular, se encuentra principalmente en las células del hígado y el riñón. Su mejor aplicación es en el diagnóstico de las enfermedades del hígado. Se observan niveles elevados en enfermedades hepáticas como la hepatitis, enfermedades de los músculos y traumatismos. Cuando se emplean en conjunción con la AST ayuda en el diagnóstico de infartos de miocardio, ya que el valor de la ALT se mantiene dentro de los límites normales y aumenta en los niveles de AST^{1,4,5}. El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio.

REACTIVOS

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

PREPARACION

Reactivo de trabajo (RT):
 Ref: 1001170 Disolver (→) una tableta de R2 Substrato en un vial de R1.
 Ref: 1001171 Disolver (→) una tableta de R2 Substrato en 15 mL de R1.
 Ref: 1001172 Disolver (→) una tableta de R2 Substrato en 50 mL de R1.
 Tapar y mezclar suavemente hasta disolver su contenido.
 Estabilidad: 21 días a 2-8°C o 72 horas a temperatura ambiente.

CONSERVACION Y ESTABILIDAD

Todos los componentes del kit son estables, hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, cuando se mantienen los frascos bien cerrados a 2-8°C, protegidos de la luz y se evita su contaminación. No usar las tabletas si aparecen fragmentadas. No usar reactivos fuera de la fecha indicada. **Indicadores de deterioro de los reactivos:**
 - Presencia de partículas y turbidez.
 - Absorbancias del Blanco a 340 < 1,00.

MATERIAL ADICIONAL

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

MUESTRAS

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

PROCEDIMIENTO

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

RT (mL)	1,0
Muestra (µL)	100

- Mezclar, incubar 1 minuto.
- Leer la absorbancia (A) inicial de la muestra, poner en marcha el cronometro y leer la absorbancia cada minuto durante 3 minutos.

- Calcular el promedio del incremento de absorbancia por minuto (ΔA/min).

CALCULOS

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

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

Factores de conversión de temperaturas

Los resultados pueden transformarse a otras temperaturas multiplicando por:

Temperatura de medición	Factor para convertir a		
	25°C	30°C	37°C
25°C	1,00	1,32	1,82
30°C	0,76	1,00	1,39
37°C	0,55	0,72	1,00

CONTROL DE CALIDAD

Es conveniente analizar junto con las muestras sueros control valorados: SPINTROL H Normal y Patológico (Ref. 1002120 y 1002210). Si los valores hallados se encuentran fuera del rango de tolerancia, se debe revisar el instrumento, los reactivos y la técnica. Cada laboratorio debe disponer su propio Control de Calidad y establecer correcciones en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias.

VALORES DE REFERENCIA^{4,5}

	25°C	30°C	37°C
Hombres	Hasta 22 U/L	29 U/L	40 U/L
Mujeres	Hasta 18 U/L	22 U/L	32 U/L

En recién nacidos normales se han descrito valores de referencia hasta el doble del de los adultos, debido a su inmadurez hepática, estos valores se normalizan aproximadamente a los tres meses. Estos valores son orientativos. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

CARACTERISTICAS DEL METODO

Rango de medida: Desde el límite de detección 1,20 U/L hasta el límite de linealidad, diluir 1/10 con ClNa 9 g/L y multiplicar el resultado final por 10.

Precisión:

	Intraserie (n= 20)		Interserie (n= 20)	
Media (U/L)	34,9	118,4	34,1	118,3
SD	0,64	1,17	1,03	1,53
CV (%)	1,84	0,99	3,04	1,29

Sensibilidad analítica: 1 U/L = 0,000557 ΔA / min.

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

Los resultados obtenidos con 50 muestras fueron los siguientes:

Coefficiente de regresión (r): 0,99.

Ecuación de la recta de regresión: y = 0,98x + 0,38.

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

INTERFERENCIAS

Los anticoagulantes de uso corriente como la heparina, EDTA oxalato o fluoruro no afectan los resultados. La hemólisis interfiere con la determinación¹. Se han descrito varias drogas y otras sustancias que interfieren en la determinación de la ALT^{2,3}.

NOTAS

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

BIBLIOGRAFIA

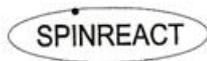
- Murray R. Alanine aminotransferase. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton 1984; 1088-1090.
- Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACG Press, 1995.
- Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed. AACG 2001.
- Burtis A. et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd edition. AACG 1999.
- Tietz N. W. et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed. AACG 1995.

PRESENTACION

Ref: 1001170	Cont.	20 x 2 mL
Ref: 1001171		10 x 15 mL
Ref: 1001172		10 x 50 mL



ANEXO 6



GOT (AST)

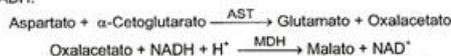
NADH. Cinético UV. IFCC rec.

Determinación cuantitativa de aspartato aminotransferasa GOT (AST) IVD

Conservar a 2-8°C

PRINCIPIO DEL METODO

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



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

SIGNIFICADO CLINICO

La AST es una enzima intracelular, se encuentra en niveles altos en el músculo del corazón, las células del hígado, las células del músculo esquelético y en menor cantidad en otros tejidos. Aunque un nivel elevado de AST en suero no es específico de enfermedad hepática se emplea principalmente para su diagnóstico y seguimiento, junto con otras enzimas como la ALT y ALP. También se utiliza en el control post-infarto, en pacientes con desórdenes del músculo esquelético, y en otras afecciones^{1,4,5}. El diagnóstico clínico debe realizarse teniendo en cuenta todos los datos clínicos y de laboratorio.

REACTIVOS

R 1	TRIS pH 7,8	80 mmol/L
	L-Aspartato	200 mmol/L
R 2	NADH	0,18 mmol/L
	Lactato deshidrogenasa (LDH)	800 U/L
	Malato deshidrogenasa (MDH)	600 U/L
	α -Cetoglutarato	12 mmol/L

PREPARACION

Reactivo de trabajo (RT):
 Ref: 1001160 Disolver (→) una tableta de R2 Substrato en un vial de R1.
 Ref: 1001161 Disolver (→) una tableta de R2 Substrato en 15 mL de R1.
 Ref: 1001162 Disolver (→) una tableta de R2 Substrato en 5 mL de R1.
 Tapar y mezclar suavemente hasta disolver su contenido.
 Estabilidad: 21 días a 2-8°C o 72 horas a temperatura ambiente.

CONSERVACION Y ESTABILIDAD

Todos los componentes del kit son estables, hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, cuando se mantienen los frascos bien cerrados a 2-8°C, protegidos de la luz y se evita su contaminación. No usar las tabletas si aparecen fragmentadas. No usar reactivos fuera de la fecha indicada. **Indicadores de deterioro de los reactivos:**
 - Presencia de partículas y turbidez.
 - Absorbancias del Blanco a 340 < 1,00.

MATERIAL ADICIONAL

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

MUESTRAS

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

PROCEDIMIENTO

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

RT (mL)	1,0
Muestra (μ L)	100

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

CALCULOS

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

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

Factores de conversión de temperaturas

Los resultados pueden transformarse a otras temperaturas multiplicando por:

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

CONTROL DE CALIDAD

Es conveniente analizar junto con las muestras sueros control valorados: SPINROL H Normal y Patológico (Ref. 1002120 y 1002210). Si los valores hallados se encuentran fuera del rango de tolerancia, se debe revisar el instrumento, los reactivos y la técnica. Cada laboratorio debe disponer su propio Control de Calidad y establecer correcciones en el caso de que los controles no cumplan con las tolerancias.

VALORES DE REFERENCIA¹

	25°C	30°C	37°C
Hombres	Hasta 19 U/L	26 U/L	38 U/L
Mujeres	Hasta 16 U/L	22 U/L	31 U/L

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

CARACTERISTICAS DEL METODO

Rango de medida: Desde el límite de detección 5,44 U/L hasta el límite de linealidad 260 U/L.

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

Precisión:

	Intraserie (n= 20)		Interserie (n= 20)	
Media (U/L)	17,4	128	17,1	128
SD	0,68	1,35	0,72	1,28
CV (%)	3,91	1,05	4,20	0,99

Sensibilidad analítica: 1 U/L = 0,0017 $\Delta A/\text{min}$.

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

Los resultados obtenidos con 50 muestras fueron los siguientes:

Coefficiente de regresión (r): 0,99

Ecuación de la recta de regresión: $y = 0,96x + 1,33$.

Las características del método pueden variar según el analizador utilizado.

INTERFERENCIAS

Los anticoagulantes de uso corriente como la heparina, EDTA oxalato o fluoruro no afectan los resultados. La hemólisis interfiere con la determinación¹.

Se han descrito varias drogas y otras sustancias que interfieren en la determinación de la AST^{2,3}.

NOTAS

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

BIBLIOGRAFIA

- Murray R. Aspartate aminotransferase. Kaplan A et al. Clin Chem The C.V. Mosby Co. St Louis, Toronto, Princeton 1984; 1112-1116.
- Young DS. Effects of drugs on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC Press, 1995.
- Young DS. Effects of disease on Clinical Lab. Tests, 4th ed AACC 2001.
- Burtis A et al. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed AACC 1999.
- Tietz N W et al. Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed AACC 1995.

PRESENTACION

Ref: 1001160	Cont.	20 x 2 mL
Ref: 1001161		10 x 15 mL
Ref: 1001162		10 x 50 mL



ANEXO 7

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

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

Pasos a seguir:

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

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

- Se ajusta el colorímetro a cero, y se lee la absorbancia en el colorímetro a 850nm.