

Magíster en Ciencias
Mención Radicales Libres
en Biomedicina



RELACIÓN ENTRE INSULINORRESISTENCIA Y PARÁMETROS REDOX EN SUJETOS ADULTOS MAYORES.

**MAGÍSTER EN CIENCIAS
MENCIÓN RADICALES LIBRES EN BIOMEDICINA**

Carlos Vargas Donoso

Director de Tesis

Juan Rojas Montero, MSc.

Valparaíso – Chile

2019

ÍNDICE.

1. Índice de Figuras.....	3
2. Índice de Tablas.....	4
3. Índice de Anexos.....	5
4. Abreviaturas.....	6
5. Resumen.....	8
6. Abstract.....	9
7. Introducción.....	10
8. Marco Teórico.....	13
8.1. Epidemiología de Diabetes Mellitus tipo 2 e Insulinorresistencia.....	13
8.2. Insulinorresistencia.....	15
8.2.1. Vías de Señalización de Insulina.....	17
8.2.2. Mecanismos moleculares de Insulinorresistencia.....	20
8.2.3. Modelos de Medición de Insulinorresistencia.....	27
8.3. Estrés Oxidativo.....	28
8.3.1. Generalidades de Estrés Oxidativo.....	28
8.3.2. Especies Reactivas de Oxígeno.....	29
8.3.3. Fuentes Productoras de ERO.....	29
8.3.4. Mecanismos de Defensa Antioxidante.....	34
8.3.5. Mecanismos de Daño Oxidativo.....	39
8.3.6. Biomarcadores de Daño Oxidativo.....	41
8.4. Estrés Oxidativo e Insulinorresistencia.....	45
9. Hipótesis de investigación.....	51
10. Objetivos.....	51
10.1. Objetivo General.....	51
10.2. Objetivos Específicos.....	51
11. Materiales y Métodos.....	52
11.1. Materiales.....	52
11.2. Metodología y diseño de la investigación.....	55
12. Resultados.....	68
12.1. Insulinorresistencia.....	68
12.2. Parámetros REDOX.....	69
12.2.1. Actividad Antioxidante .	69
12.2.1.1. Enzimática.....	69
12.2.1.2. No Enzimática.....	71
12.2.2. Biomarcadores de Daño Oxidativo.....	72
12.2.2.1. Oxidación de Lípidos.....	72
12.2.2.2. Oxidación de Proteínas.....	73
12.2.3. Análisis Correlacional.....	74
13. Discusión.....	75
14. Conclusión.....	89
15. Bibliografía.....	90
16. Anexos.....	100

1.- INDICE DE FIGURAS.

Figura N°1: Algoritmo de diagnóstico para Diabetes mellitus tipo 2 en Chile.....	15
Figura N°2: Vía de señalización de Insulina.....	20
Figura N°3: Efectos de la represión y sobreexpresión de enzimas antioxidantes...39	
Figura N°4: Producción de ROS y RNS en mamíferos.....	40
Figura N°5: Hiperglicemia como inductor de Estrés Oxidativo.....	46
Figura N°6: Modelo propuesto de insulinoresistencia producida por estrés oxidativo.....	48
Figura N°7: Diseño de Investigación.....	55
Figura N°8: Diferencias de HOMA-IR entre GC y GIR.....	69
Figura N°9: Diferencias de Actividad de SOD entre GC y GIR.....	70
Figura N°10: Diferencias de Actividad de Catalasa entre GC y GIR.....	71
Figura N°11: Diferencias de Capacidad Antioxidante Total entre GC y GIR.....	72
Figura N°12: Diferencias de Lipoperoxidación entre GC y GIR.....	73
Figura N°13: Diferencias de Oxidación de Proteínas entre GC y GIR.....	74

2.- INDICE DE TABLAS.

Tabla Nº1: Fórmulas propuestas para el cálculo de HOMA-IR y HOMA-B.....	28
Tabla Nº 2: Biomarcadores de Estrés Oxidativo.....	44
Tabla Nº 3: Reactivos para determinar parámetros REDOX.....	54
Tabla Nº 4: Variables de Estudio.....	56
Tabla Nº 5: Criterios de Inclusión y Exclusión.....	56
Tabla Nº 6: Caracterización de la Muestra.....	59
Tabla Nº 7: Resultados de la evaluación de Insulinorresistencia.....	68
Tabla Nº 8: Resultados de Actividad de SOD.....	69
Tabla Nº 9: Diferencias de Capacidad Antioxidante Total entre GC y GIR.....	70
Tabla Nº 10: Resultados de Capacidad Antioxidante Total.....	71
Tabla Nº 11: Resultados de Niveles de Lipoperoxidación.....	72
Tabla Nº 12: Resultados de Niveles de Oxidación de Proteínas.....	73
Tabla Nº 13: Resultados Análisis Correlacional.....	74

3.- INDICE DE ANEXOS.

Anexo 1: Acta de Aprobación Comité de Bioética Universidad de Valparaíso...100

Anexo 2: Consentimiento Informado.....102

4.- ABREVIATURAS.

ACV:	Accidente Cerebro Vascular.
ADN:	Acido Desoxirribonucleico.
AGL:	Ácidos Grasos Libres.
AKT:	Proteína Kinasa B.
ATP:	Adenosin Trifosato.
CAT:	Catalasa
C β :	Células beta pancreáticas
CMKII:	Calmodulin Kinasa II
DAG:	Diacilglicerol.
DMT2:	Diabetes Mellitus tipo 2.
DNP:	Dinitrofenylhidrazina
ECV:	Enfermedad Cerebro Vascular.
eNOS:	Óxido Nítrico Sintasa endotelial.
ENT:	Enfermedades no Transmisibles.
EO:	Estrés Oxidativo
EPOC:	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
ER:	Estrés de Retículo.
ERK:	Elementos de respuesta a Kinasas.
ERO:	Especies Reactivas de Oxígeno
ERN:	Especies Reactivas de Nitrógeno.
FAD:	Flavín adenín dinucleótido.
FMN:	Flavín mononucleótido.
FOXO 3:	Factor Transcripcional Forkhead box O-3
GAA:	Glicemia alterada en ayunas.
GB:	Glóbulos Blancos.
GC:	Grupo Control.
GIR:	Grupo Insulinorresistente.
GLUT-4:	Transportador de glucosa tipo 4.
GPX:	Glutación Peroxidasa.
GR:	Glóbulos rojos.
GSH:	Glutación Reducido.
GSK-3:	Glucógeno Sintasa-3.
GSSG:	Glutación Oxidado.
H ₂ O ₂ :	Peróxido de Hidrógeno.
HDL:	Lipoproteína de alta densidad.
HTA:	Hipertensión Arterial.
ICC:	Índice cintura-cadera.
IGO:	Intolerancia a la Glucosa Oral.
IKB:	Inhibidor del factor nuclear κ -B.
IKKB:	Kinasa de IKB.
IL-1 β :	Interleukina- 1 β
IL-6:	Interleukina- 6

IL-8:	Interleukina- 8
IMC:	Índice de masa corporal
iNOS:	Óxido Nítrico Sintasa inducible.
IR:	Insulinorresistencia.
JNK-1:	Kinasa de Jun-1.
KEAP 1:	Proteína citoplasmática KEAP-1
LDL:	Lipoproteína de baja densidad.
MAPK:	Proteínas kinasas activadas por mitógenos.
MDA:	Malondialdehído
MINSAL:	Ministerio de Salud, Chile
mTOR:	Blanco mamífero de rapamicina.
NADPH:	Nicotinamide adenina dinucleótido fosfato.
NF- κ B:	Factor Nuclear κ B
NO:	Oxido Nítrico.
NOX:	NADPH oxidasa.
NRF-2:	Factor Nuclear tipo 2- relacionado con el factor eritroide tipo 2.
O ₂ :	Oxígeno
O ₂ ⁻ :	Anión Superóxido.
OH:	Radical Hidroxilo.
ONOO ⁻ :	Peroxinitrito
PAI-1:	Inhibidor del Activador de Plasminógeno-1
PCR:	Proteína C Reactiva
PDE-3B:	Bloqueador de Fosfodieterasa-3
PDK-1 :	Kinasa dependiente de fosfatidilinositol.
PI3K:	Fosfoinositol-3 Kinasa
PIP ₂ :	Fosfoinositol difosfato
PIP ₃ :	Fosfoinositol trifosfato
PKC:	Proteína Kinasa C
PLA ₂ :	Fosfolipasa A ₂
PT:	Proteínas totales
REDOX:	Perfil Oxido Reductivo
RNA _m :	Acido Ribonucleico mensajero.
SGK:	Kinasa sérica regulada por Glucocorticoides
SM:	Síndrome Metabólico
SOD:	Superóxido Dismutasa
SRI:	Sustrato Receptor de Insulina.
TBA:	Acido Tiobarbitúrico.
TCA:	Acido Tricloroacético.
TNF- α :	Factor de Necrosis tumoral- α
V-CAM:	Moléculas de adhesión celular vascular.
XO:	Xantina Oxidasa.

5.- RESUMEN.

Objetivo: *Describir y analizar la relación entre Insulinorresistencia (IR) estimada a través del indicador HOMA-IR y Parámetros de Estrés Oxidativo en sujetos adultos mayores con patologías crónicas controladas.*

Método: *El presente estudio es de tipo cuasi- experimental con diseño prospectivo transversal. La muestra corresponde a 12 adultos mayores de ambos sexos, con edades entre 63 y 82 años, distribuidos en 2 grupos: Grupo Control (GC, n= 6) y Grupo Insulinorresistente (GIR, n= 6) no diabéticos, con patologías crónicas controladas, pertenecientes al Centro de Salud Concón, Chile. En ambos grupos se evaluó el perfil Glicémico (glicemia basal, insulinemia basal y HOMA-IR), para determinar resistencia a la acción de la insulina y parámetros REDOX: actividad antioxidante enzimática de Catalasa (CAT) y Superóxido Dismutasa (SOD); Capacidad antioxidante total (TRAP) y Biomarcadores de daño oxidativo Malondialdehído (MDA) y Carbonilo (CAR). Las mediciones se realizaron durante el mes de diciembre del año 2018.*

Resultados: *El GIR demostró mayor actividad de CAT ($p= 0,04$) en comparación al GC. No hubo diferencias estadísticamente significativas ($p>0.05$) entre los GIR y GC en los Biomarcadores de daño oxidativo: MDA ($p= 0,11$) y CAR ($p=0,74$), Capacidad Antioxidante Total ($p= 0,06$) y actividad enzimática de SOD ($p=0,52$). No se encontró asociación entre HOMA- IR y las variables REDOX.*

Conclusiones: *La IR se asocia a un aumento de la actividad enzimática antioxidante de CAT en sujetos adultos mayores.*

Palabras Claves: *Insulinorresistencia; HOMA-IR; Estrés Oxidativo; Defensa Antioxidante; Antioxidantes Enzimáticos.*

6.- ABSTRACT.

Objective: *To describe and analyze the relationship between Insulin Resistance (IR) estimated through the HOMA-IR indicator and Oxidative Stress Parameters in elderly subjects with chronic controlled pathologies.*

Method: *The present study is a quasi-experimental with transversal prospective design. The sample corresponds to 12 older adults of both sexes, aged between 63 and 82 years, divided into 2 groups: Control Group (GC, n = 6) and Non-diabetic Insulin-Resistant Group (GIR, n = 6), with chronic controlled diseases, belonging to the Concón Health Community Center, Chile. In both groups the Glycemic profile (basal glycemia, basal insulinaemia and HOMA-IR) was evaluated to determine resistance to insulin action and REDOX parameters: enzymatic antioxidant activity of Catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD); Total antioxidant capacity (TRAP) and Biomarkers of oxidative damage Malondialdehyde (MDA) and Carbonyl (CAR). The measurements were made during the month of December of the year 2018.*

Results: *The GIR showed greater CAT activity ($p = 0.04$) compared to the GC. There were no statistically significant differences ($p > 0.05$) between the GIR and GC in the Biomarkers of oxidative damage: MDA ($p = 0.11$) and CAR ($p = 0.74$), Total Antioxidant Capacity ($p = 0.06$) and enzymatic activity of SOD ($p = 0.52$). No association was found between HOMA-IR and REDOX variables.*

Conclusions: *IR is associated with an increase in the antioxidant enzymatic activity of CAT in older adults.*

Keywords: *Insulin Resistance; HOMA-IR; Oxidative Stress; Antioxidant Defenses; Enzymatic Antioxidants.*

7.- INTRODUCCION.

La Insulinorresistencia (IR) es una alteración común y precoz en el desarrollo de múltiples patologías, tales como Obesidad, Síndrome Metabólico (SM) y Diabetes Mellitus tipo 2 (DMT2), todas ellas factores de riesgo fundamentales en patología cardiovascular, la cual es, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la primera causa de muerte en el mundo (OMS, 2017). La patología que cursa con IR que ha sido mayormente estudiada, es la DMT2, cuya prevalencia ha aumentado de manera casi exponencial los últimos 50 años a causa de la obesidad y del SM (Keane y cols, 2015). La altísima prevalencia de DMT2 en la población mundial, sugiere que la IR podría comenzar incluso en etapas juveniles, mucho tiempo antes del establecimiento de la DMT2 como tal y mantenerse hasta después del diagnóstico de ésta (cerca de los 50 años), razones por cuales se hace fundamental conocer los mecanismos, factores desencadenantes y los tipos de respuestas fisiológicas ante la IR (Lee y cols. 2001)

En términos epidemiológicos, la DMT2 está directamente asociada a reducción en la expectativa de vida, aumento del riesgo de complicaciones y de eventos mórbidos relacionados con patologías crónicas, disminución en la calidad de vida y aumento en los costos de salud (OMS 2017).

En Chile, según la Guía Clínica de Diabetes tipo 2, la prevalencia de ésta se encuentra entre un 4,2% y 7,5%, en donde un 85% de los sujetos con esta patología conoce su condición, lo cual contrasta con los estimados internacionales (MINSAL, 2003; Solís y cols, 2008). No obstante, la principal dificultad en Chile es la baja

proporción de pacientes en que se encuentra bien controlada la DMT2, es decir, presentan niveles de glicemia basal (ayuno) dentro de los límites normales, siendo éstos sólo entre un 17,6% a 19,7% del total de diagnosticados con DMT2. Digno es de mencionar que cuando la prevalencia de DMT2 en Chile, se analiza por grupos etarios, se aprecia un incremento significativo después de los 44 años de edad, pasando de un 0,2% en los menores de 44 años, a un 12,2% en el grupo entre 45 y 64 años y a un 15,8% en los sujetos mayores de 64 años. En relación a los sujetos de mayor edad en Chile, el año 2007 hubo 1503 muertes por DMT2, en donde el 89.3% de éstas, ocurrieron en personas mayores de 60 años, razón por la cual la población adulta mayor se hace prioritaria en función de estos indicadores, según lo declarado en los Objetivos Sanitarios para la década 2011-2020 (MINSAL. 2010).

Dado que en los Objetivos Sanitarios para la Década 2011-2020 en Chile, se propuso “ Incrementar la proporción de personas con DMT2 controlada”, cualquier mejora en la prevención y/o tratamiento tanto de esta patología, como de sus complicaciones sería importante de desarrollar y, precisamente en base a esto, es que el presente estudio se enmarca en esta directriz y tiene por objeto evidenciar cómo el Estrés Oxidativo (EO) podría estar desempeñando un rol clave en el desarrollo de IR, la cual es una de las alteraciones más precoces en el desarrollo de la DMT2 (MINSAL, 2010).

La evidencia sugiere fuertemente que existe una relación entre EO e IR y la progresión de la DMT2. Sin embargo, aún no se encuentra claramente dilucidado, por ejemplo, cómo el EO junto a un ambiente "glucolipotóxico" de los islotes pancreáticos en sujetos con IR, incrementan la infiltración leucocitaria, la cual sería responsable de la disfunción de las células beta ($C\beta$), y finalmente de su muerte

(Henriksen y cols., 2011). Evidencia reciente, sugiere que los mecanismos relacionados con IR se encuentran también presentes en otras patologías como obesidad y SM, incluyendo la alteración en la vía de señalización del receptor de insulina, inflamación crónica, Estrés de Retículo (ER) y principalmente EO (Contreras y cols., 2014).

Múltiples estudios en modelos animales tanto *in vivo* como *in vitro*, indican que un incremento en el EO podría directamente generar IR, sin embargo, estudios en modelos humanos son escasos (Park y cols., 2009).

Es por todo lo anteriormente señalado que el objetivo del presente estudio es determinar el grado de asociación entre la Insulinorresistencia y Estrés Oxidativo en sujetos adultos mayores insulinorresistentes no diabéticos, comparándolos con sujetos del mismo rango etario sin dicha alteración.

Para ello, se estimará la capacidad de defensa antioxidante enzimática, a través de la cuantificación de actividad de las enzimas Superóxido Dismutasa citosólica (SOD-1) y Catalasa (CAT), la Capacidad Antioxidante Total, así como también, se evaluará el nivel de daño oxidativo a macromoléculas: Malondialdehído (MDA) para lipoperoxidación y Proteínas Carbonilo (PC) para oxidación de proteínas.

8.- MARCO TEÓRICO.

8.1.- Epidemiología de Diabetes Mellitus tipo 2 e Insulinorresistencia.

Las enfermedades no transmisibles (ENT) se caracterizan por ser de larga duración y lenta progresión, las cuales no presentan remisión espontánea y que rara vez logran su curación total (MINSAL, 2010). Los cuatro tipos principales de ENT son; cardiovasculares (ataques cardíacos y accidentes cerebrovasculares), cáncer, respiratorias crónicas (Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica y Asma) y DMT2, teniendo esta última una población mundial en aumento, de 108 millones de personas en 1980 a 422 millones en 2014. Se estima que el año 2012 la diabetes fue la causa directa de 1.5 millones de muertes en el mundo, y que otros 2.2 millones eran atribuibles a la hiperglicemia, lo anterior sumado al hecho que el envejecimiento poblacional es considerado como un factor de riesgo predisponente para el desarrollo de ENT, determina que la DMT2 sea uno de los mayores problemas de salud pública a nivel mundial (Libre y cols., 2015; Sapunar y cols., 2016).

La DMT2 es una enfermedad metabólica caracterizada por hiperglicemia, resultante de defectos en la secreción de insulina, acción de la insulina o ambos, generando consecuencias a nivel sistémico, tales como alteraciones microangiopáticas (retinopatía, nefropatía y neuropatía) y macrovasculares (enfermedad isquémica del corazón, accidente cerebrovascular y enfermedad vascular periférica), todas las cuales presentan signos previos a su diagnóstico. No obstante el diagnóstico de DMT2 en jóvenes es un hecho cada vez más frecuente, lo que seguramente aumentará aún más la carga de las complicaciones crónicas de esta enfermedad a nivel global (Cefalu y cols., 2017).

En Chile la prevalencia de DMT2 se estima entre 4,2% y 7,5% según las encuestas realizadas a nivel nacional los años 2003 y 2006 (MINSAL, 2003; Solís y cols., 2008). La Encuesta Nacional de Salud del año 2003, evidenció un incremento importante en la prevalencia en pacientes sobre 45 años: 12,2% para menores de 65 años y 15,8% en sujetos de 65 años o más. El nivel socioeconómico también demostró diferencias entre la población chilena: mientras que en los estratos más bajos la prevalencia de DMT2 era de un 21,3%, fue de sólo un 2,5% en los estratos superiores. Sin embargo, no encontraron diferencias en la prevalencia de DMT2 por sexo, lo que nos permite concluir que esta patología es más prevalente en la población más vulnerable: la que presenta menores ingresos y de mayor edad, sin distinguir por sexo (MINSAL, 2003).

La DMT2 con frecuencia no se diagnostica de manera precoz, sino que en etapas más tardías, en donde se manifiestan los síntomas clásicos de ella (Cefalu, 2017). Sin embargo, se puede encontrar niveles de glucosa alterados en ayunas (GAA) y / o intolerancia a la glucosa oral (IGO) sin cumplir los criterios para el diagnóstico de DMT2, lo cual retrasa el inicio del tratamiento y genera mayor probabilidad de complicaciones (Park y cols, 2009). Por lo anterior se hace fundamental el estudio de la IR, fenómeno que forma parte de la fisiopatología de la DMT2 y que precede por años a la aparición de los signos típicos de ésta y, por aún más tiempo al establecimiento de su diagnóstico (Martin y cols., 1992). Este hecho se ve refrendado en nuestro país, dado que la normativa del MINSAL solo contempla el estudio de la glicemia sin considerar los niveles de insulinemia, variable que

permite conocer la existencia de Insulinorresistencia (Figura N°1).

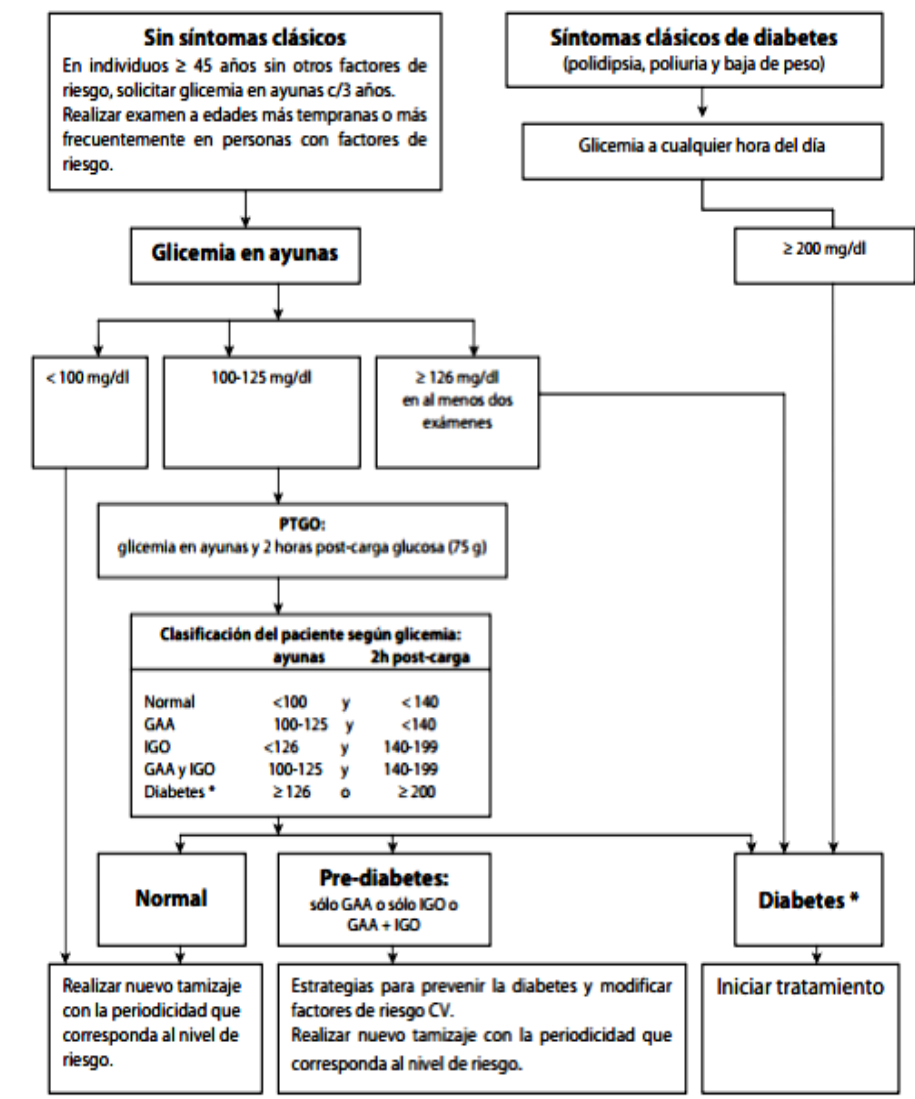


Figura N°1: Algoritmo de diagnóstico para Diabetes Mellitus tipo 2 en Chile. (Reproducido de Guía Clínica de Diabetes Mellitus tipo 2, MINSAL, 2010). El algoritmo solo contempla el estudio en base a glicemia, no considerando los niveles de insulinemia, por lo que la determinación de IR no es posible, lo cual retrasa el comienzo del tratamiento.

8.2 Insulinorresistencia.

Ye (2013), define la IR como la captación de glucosa inducida por insulina total o parcialmente disminuida en tejidos insulinosensibles como resultado de la inhibición en la vía de señalización de la acción metabólica de la insulina.

Desde décadas se conoce la convergencia en ciertos pacientes de DMT2, Hipertensión Arterial (HTA) y Enfermedad Cardiovascular (ECV). Reaven (1988), acuña el término "Síndrome X" para describir a un grupo de factores de riesgo cardiovascular que se presentaban de manera conjunta: HTA, hipertrigliceridemia, disminución de la concentración plasmática de Lipoproteína de alta Densidad (HDL) e intolerancia a la glucosa. En la actualidad la evidencia indica que la IR es el más importante mecanismo que tienen en común todas las alteraciones anteriormente mencionadas, de hecho se utiliza el concepto de Síndrome de resistencia a la insulina como agente subyacente de HTA, DMT2, ECV, dislipidemia, aterosclerosis, demencia y obesidad, jugando un rol central en la patogenia de todas estas entidades (Lee, 2001).

Bajo un estado de IR, las C β del páncreas, secretan mayor cantidad de insulina para compensar la resistencia de los tejidos a la acción de ésta, y la hiperinsulinemia sería por tanto, reflejo de IR (De Fronzo y cols., 1991). En base a lo anterior, la IR sería un signo que precede por un largo periodo (años) a la aparición de DMT2, lapso durante el cual los niveles de glicemia se mantienen en rango normal por la hiperinsulinemia compensatoria. Estudios sugieren que la cuantificación del nivel de IR en un paciente con prediabetes, tiene capacidad predictiva en la aparición de DMT2 en un plazo relativamente lejano (Martin y cols., 1992).

Los mecanismos involucrados en la IR pueden ser de tipo epigenéticos multifactoriales, como: estilo de vida urbano, nivel de actividad física, adiposidad abdominal y concentración de adipocinas (Reaven, 2011; Kahn, 1994), pero también pueden ser de tipo genéticos: expresión de enzimas antioxidantes, genes

reguladores de actividad mitocondrial, entre otros (Dedoussis y cols, 2007).

En los estadios tempranos, la tolerancia a la glucosa se encuentra conservada por la hiperinsulinemia compensatoria. Cerca de un 25% de los sujetos no diabéticos presentan IR en niveles similares a sujetos con DMT2 (Reaven, 2011). Posteriormente la IR aumenta aun más la secreción de insulina de manera compensatoria, lo cual desencadena la intolerancia a la glucosa. Este aumento de la glicemia, sumado a la hiperinsulinemia y al incremento de los ácidos grasos libres, generan una sobreproducción de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) aumentando el EO y activando vías de señalización de factores de estrés celular. Esto puede generar inhibición de la secreción y acción de la insulina, lo cual aceleraría la aparición de DMT2 (Tangvarasittichai, 2015).

8.2.1.- Vías Señalización de Insulina.

La insulina realiza múltiples acciones en diferentes tipos de tejido. De manera convencional se describe su acción en dos grandes grupos, dependiendo principalmente del tipo de fosforilación del Sustrato receptor de Insulina (IRS), proteína dependiente del receptor de dicha hormona. (Figura N°2):

a) Acción Metabólica de la Insulina (Evans y cols., 2005).

Esta vía de activación es la predominante en condiciones fisiológicas, puesto que favorece el metabolismo de la glucosa, generando acciones anabólicas preparatorias para ayuno prolongado y el estrés.

En términos moleculares, una vez que la insulina se une a su receptor, este presenta actividad Tirosina Kinasa y fosforila al Sustrato Receptor de Insulina (IRS) el cual, si

se encuentra fosforilado en residuos de tirosina, inicia una vía de señalización que incrementa la actividad de la enzima Fosfoinositol-3 Kinasa (PI3K) la que cataliza la reacción del sustrato Fosfoinositol difosfato (PIP₂) al producto Fosfoinositol trifosfato (PIP₃). Esta molécula a su vez, incrementa la actividad de la Proteína Kinasa AKT (también conocida como PKB) de manera directa o indirectamente activando a la enzima Kinasa dependiente de fosfatidilinositol (PDK-1) la que a su vez fosforila a AKT incrementando de igual modo su actividad. PDK-1 además fosforila a la Proteína Kinasa C (PKC), incrementando su actividad y junto con AKT, generan la traslocación de vesículas que disponen el transportador de glucosa tipo 4 (GLUT- 4) a la membrana plasmática, generando como efecto final, la hipoglicemia por ingreso de glucosa al citosol a través de dicho transportador.

Por otro lado, AKT también desencadena múltiples efectos metabólicos tales como: la Inhibición de la lipólisis por fosforilación del bloqueador de Fosfodiesterasa 3B. (PDE-3B), el aumento de la síntesis de ácidos grasos y glucógeno mediante la inhibición de Glucógeno Sintasa-3 (GSK-3), el incremento en la síntesis de proteínas por estimulación de la proteína blanco mamífero de rapamicina (mTOR) e incluso, incremento de la reabsorción de sodio por acción de la proteína kinasa sérica regulada por Glucocorticoides (SGK).

b) Acción Mitogénica de la Insulina (Ye, 2013):

Una vez que la insulina se une a su receptor y éste fosforila a IRS, quien se encuentra esta vez, fosforilado en residuos de serina y/o treonina, se desencadena una cascada de señalización que genera un incremento en la proliferación celular y una inhibición de la apoptosis. AKT inhibe a varias isoformas del factor transcripcional FoxO (1, 2 y

3A), generando inhibición de la autofagia y apoptosis celular. Además GSK-3 (activada por AKT) también inhibe de manera directa la apoptosis. Por otro lado, IRS puede activar también, la vía SOS - Ras, la cual a través de las Proteínas kinasas activadas por mitógenos (MAPK), incrementa la expresión de genes de crecimiento y proliferación celular. Cabe destacar que, entre varios factores, las ERO generan aumento de la actividad mitogénica de la insulina por activación de proteínas kinasas que fosforilan a IRS en residuos de serina o treonina.

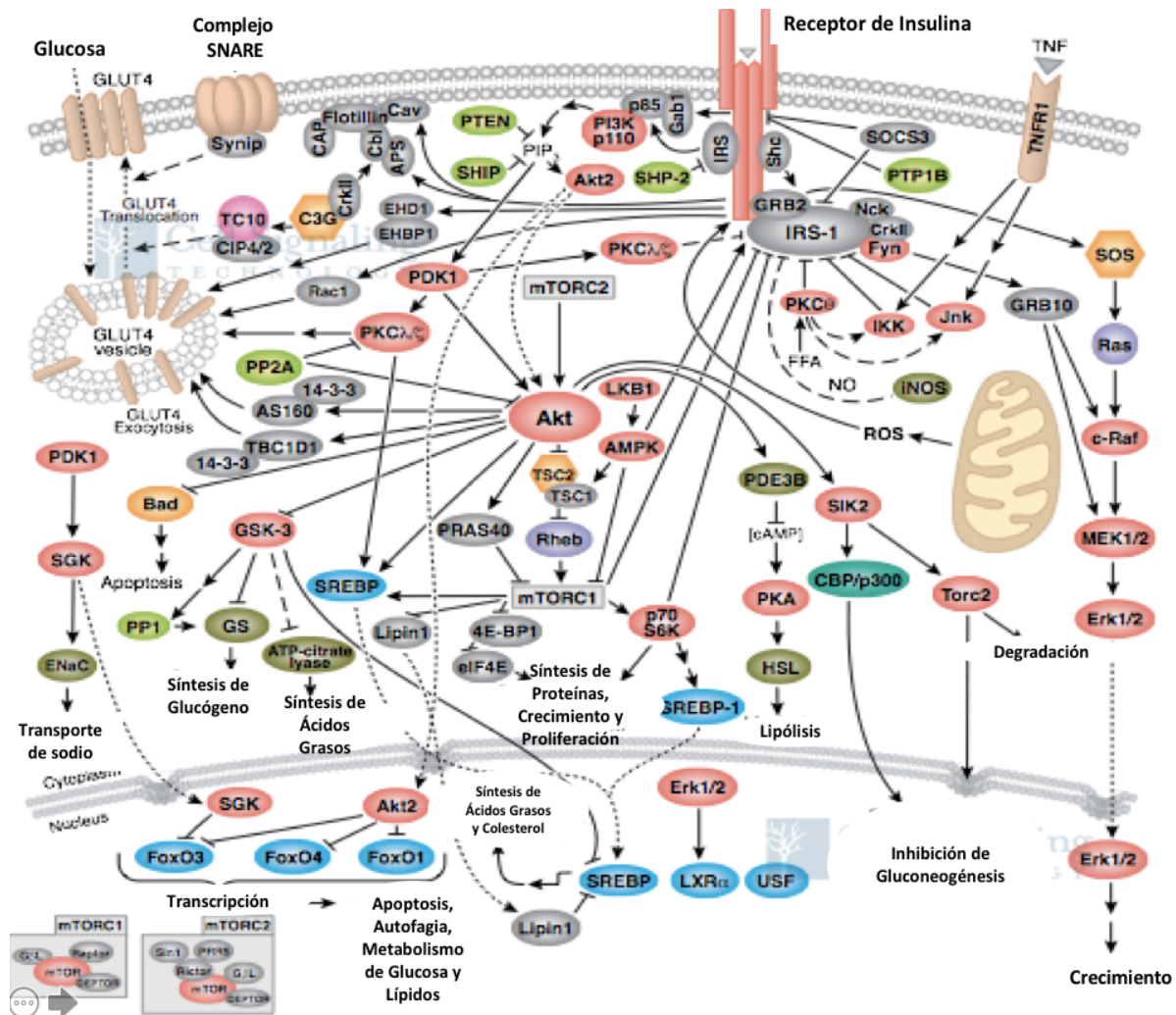


Figura N° 2: Vía de señalización de Insulina. (Reproducido de Guo, 2014). Una vez que la insulina se une a su receptor, el cual es de tipo Tirosina-Kinasa, se desencadena una cascada de señalización intracelular, la cual se puede dividir en dos tipos: la acción metabólica y la acción mitogénica. La acción que debe predominar en condiciones fisiológicas, es la de tipo metabólica, la que conduce a la traslocación de transportadores GLUT- 4 con el fin de permitir el ingreso de la glucosa a la célula, además de la reabsorción de sodio y la síntesis de glucógeno, proteínas y ácidos grasos. La vía mitogénica, en cambio, normalmente se encuentra menos activada y conduce a un incremento en la mitosis y a la inhibición de la apoptosis.

8.2.2.- Mecanismos moleculares de Insulinorresistencia.

Las acciones derivadas de la señalización de insulina (metabólicas o mitogénicas) dependen de principalmente de la fosforilación del receptor de Insulina, así como del IRS (Dedoussis, 2007). Contundente evidencia, muestra que cuando ambas proteínas se encuentran fosforiladas principalmente en residuos de Tirosina (Y), la

acción de la insulina es principalmente metabólica, superando a la actividad mitogénica (Evans y cols., 2005). No obstante cuando la fosforilación se realiza en residuos de treonina (T) o serina (S), la actividad que prima es la mitogénica, en desmedro de la acción metabólica de la insulina, por lo cual, en presencia de hiperinsulinemia (primera etapa de patogenia de DMT2), la capacidad de captar glucosa por parte de las células insulinosensibles decae, generándose lo que se conoce como IR (Ye, 2013).

Evidencia reciente demuestra que son cuatro los principales factores que favorecerían la fosforilación del receptor de insulina y del IRS en serina/treonina: a) Inflamación (aumento en la concentración de citocinas), b) hiperinsulinemia, c) incremento en la concentración de ácidos grasos libres y d) Estrés Oxidativo (Evans y cols. 2005)

a) Inflamación (Peraldi y cols., 1996):

La inflamación es un proceso fisiológico caracterizado por el aumento de leucocitos y citocinas proinflamatorias en sangre o en algún otro tejido. Constituye una respuesta favorable que permite la remodelación del tejido lesionado, reparación de éste, cicatrización de heridas e inmunidad contra infecciones. No obstante, una sobre-reacción de ésta, puede originar efectos deletéreos tales como daño tisular disfunción del órgano afectado.

En los sujetos insulino-resistentes, el status proinflamatorio proviene generalmente de su comorbilidad: HTA, dislipidemia, aterosclerosis y obesidad. Esto hace que el tejido adiposo, el hígado y la pared de los vasos sanguíneos se encuentren infiltrados por leucocitos, los cuales secretan citocinas proinflamatorias, las que ingresan al

torrente sanguíneo, generando un proceso inflamatorio sistémico. Hotamisligil G. y cols. (2003), describieron la acción de la citokina Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α) y su relación con IR, lo cual generó el desarrollo de esa línea de investigación que ligaba inflamación e IR. TNF- α al unirse a su receptor (p55), genera la inhibición de IRS-1, por lo cual la vía metabólica y concomitantemente los efectos metabólicos de la insulina, se ven profundamente disminuidos, contribuyendo a la IR. Posteriormente se describió la asociación de IR con la Proteína C Reactiva (PCR), Interleukina-6 (IL-6) y el Inhibidor del activador de plasminógeno-1 (PAI-1), los cuales se investigan hasta la actualidad.

Además se han descrito moléculas de señalización celular de inflamación y su rol en IR. Por ejemplo, se ha encontrado sobreexpresión de la proteína Kinasa de I κ B (IKKB) y de la proteína Kinasa de Jun-1. (JNK-1) en células de hígado y tejido adiposo en modelos animales con IR (Bonnard y cols., 2008).

La vía IKKB/NF- κ B es la principal vía de señalización proinflamatoria en la célula, llegando incluso a participar en fenómenos neoplásicos e inmunológicos. IKKB es una proteína que induce la ubiquitinación de Inhibidor del factor nuclear κ -B (I κ B), la cual es una proteína inactivadora del factor transcripcional NF- κ B, la cual lo mantiene inactivo. IKKB por tanto favorece la liberación de NF- κ B y su traslocación al núcleo para generar expresión génica de proteínas proinflamatorias tales como Fosfolipasa A₂ (PLA₂), Moléculas de adhesión celular vascular (VCAM) y Citocinas. Además de los efectos previamente descritos, IKKB puede fosforilar a IRS-1 en múltiples residuos de serina, por lo cual generaría inhibición del efecto metabólico de la insulina, un subsecuente incremento de la actividad mitogénica de ésta y, por tanto,

desencadenando IR (Gao y cols., 2002).

JNK-1 es una enzima que fosforila a Jun, el cual en este estado forma un complejo con Fos fosforilado, llamado AP-1, el cual es un factor transcripcional que se trasloca al núcleo y expresa genes relacionados con carcinogénesis y apoptosis. Además JNK-1 es capaz de fosforilar al receptor de insulina y a IRS-1 en residuos de serina por lo que (al igual que IKKB), induce IR (Rui y cols.,2001).

Durante la Inflamación crónica, la actividad de macrófagos hepáticos (células de Küpffer) y del tejido adiposo se encuentra exacerbada en estos órganos que son importantes reguladores de la glicemia. Ambos tipos celulares generan gran cantidad de citokinas y otras moléculas proinflamatorias, además de generar importantes daños, especialmente en tejido hepático, pudiendo desencadenar incluso una esteatosis hepática, lo cual además de generar los efectos propios de una insuficiencia hepática, incrementa de manera significativa la IR (Clavien, 1997).

Si bien la relación entre inflamación y la IR está bien documentada, la primera no es un buen blanco terapéutico para el tratamiento de la IR. Esta aseveración se basa fundamentalmente en numerosos estudios con antiinflamatorios, los cuales no generaron una disminución de la IR clínicamente significativa en los sujetos (Ye, 2012).

b) Hiperinsulinemia (Valera y cols., 2003):

La Hiperinsulinemia se define como un nivel de insulina plasmática superior a 20 μ UI/ml, después de un ayuno de entre 8 a 12 horas (Ye, 2013).

Si bien es aceptado que la hiperinsulinemia sea resultado compensatorio de la IR,

con el fin de normoglicemiar, la evidencia indica que niveles elevados de insulina, también podrían conducir a IR, especialmente en presencia de dislipidemia, es decir: la IR generaría hiperinsulinemia y ésta a su vez, favorecería el establecimiento de IR. El mecanismo propuesto se basa en que la vía de señalización metabólica de insulina sufre un feedback negativo precisamente por acción sostenida de la hiperinsulinemia. Este mecanismo se soporta en evidencia, tanto en modelos animales, como en humanos (Ye, 2013).

La concentración de insulina plasmática, es el resultado de la producción de ésta por parte de las células β pancreáticas ($c\beta$) y de su capacidad de eliminación, la cual está dada por el metabolismo hepático y renal. Considerando que la insulina tiene una vida media entre 2 a 4 minutos y que precisamente estos dos órganos sufren daños importantes durante el desarrollo de la DMT2, ambos contribuyen significativamente a la hiperinsulinemia. Por una parte la incapacidad hepática de degradar enzimáticamente la insulina (por padecer un proceso inflamatorio crónico y por la inhibición de la supresión hepática de liberación de insulina) y por otra parte, el daño renal progresivo (disminución importante de tasa de filtración glomerular, disminuyendo el clearance de insulina), determinan un estado de hiperinsulinemia crónica, lo cual acentúa aún más la IR y favorece la progresión hacia la DMT2 (Valeray cols., 2003).

c) Incremento en la concentración de ácidos grasos libres (Bergman y cols.,2000):

Los Ácidos Grasos Libres (AGL), son un factor de riesgo de IR. Éstos incrementan sus niveles plasmáticos en ayuno y disminuyen después de comer, en

condiciones fisiológicas. Los niveles de AGL plasmáticos son finamente regulados por insulina. Cuando sus niveles son elevados y se mantienen en el tiempo, esto conduce a IR, y ésta, a DMT2. En términos mecanísticos los AGL pueden suprimir la acción de IRS-1 a través de un feedback negativo con el receptor. El principal intermediario metabólico en este fenómeno sería el Diacilglicerol (DAG) que es capaz de activar a PKC, la cual inhibe la función directamente de IRS-1y además activa a JNK y IKKB, ambos mediadores inflamatorios de la IR, revisados anteriormente. Cabe destacar que la inhibición en la vía de señalización metabólica de la insulina, genera un incremento en la producción y liberación de AGL por lo cual éstos aumentarán su concentración plasmática, agravando el fenómeno de IR.

d) Estrés Oxidativo: Este factor será tratado de manera independiente en el apartado 8.3.

Cabe destacar que existen otros factores que se han asociado a EO, pero no cuentan con un corpus de evidencia tan robusto como los cuatro factores antes mencionados. Estos factores son: el envejecimiento y la obesidad.

Harman fue el primero proponer que los efectos dañinos de ERO pueden desempeñar un papel clave en el mecanismo de envejecimiento. Estudios genéticos de especies tan disímiles como *C. elegans*, *Drosophila melanogaster* y modelos murinos, apoyan esta hipótesis. Niveles anormalmente altos de ERO pueden conducir a la desregulación de las vías de señalización sensibles a REDOX. Los blancos de esta oxidación son principalmente, enzimas antioxidantes y proteínas de señalización con residuos de cisteína (sensibles a oxidación) que se oxidan a restos de ácido sulfénico y disulfuros mixtos, alterando así la función señalizadora de la

proteína. Los cambios en el envejecimiento relacionados a EO, se encuentran bien documentados (Andersen y cols., 1997). Los estudios en humanos han demostrado que los cambios oxidativos en el plasma se correlacionan con procesos fisiopatológicos propios del envejecimiento. La evidencia disponible sugiere que estos cambios juegan un papel clave en diversas condiciones que limitan la duración de la vida humana, de hecho, se han utilizado antioxidantes para mejorar las consecuencias del envejecimiento (Dröge, 2003).

El segundo factor es la obesidad, la cual se caracteriza por un aumento en el peso corporal, que resulta de una acumulación excesiva de grasa. La creciente evidencia nos permite comprender el papel crítico del tejido adiposo en el control de mecanismos fisiopatológicos de obesidad y de la comorbilidad asociada. Recientemente, el tejido adiposo (especialmente en el compartimento visceral), se ha considerado no solo como un simple tejido de depósito de energía, sino como un órgano endocrino activo que libera una variedad de productos biológicamente activos denominados, adipocitocinas o adipocinas. Basado en la compleja interacción entre las adipocinas, la obesidad también se caracteriza por presentar inflamación crónica de bajo grado, lo cual, como se explicó anteriormente, genera un estado permanente de estrés oxidativo, lo que conduce al desarrollo de complicaciones relacionadas con la obesidad (Marseglia y cols., 2015)

8.2.3.- Modelos de Medición de Insulinorresistencia.

La determinación del grado de IR de los pacientes y de la población general tiene un gran valor clínico. Esto ha hecho que se hayan desarrollado gran cantidad de métodos para calcularla. Entre los distintos métodos estimados a partir de condiciones basales figura el desarrollado por Matthews (1985), denominado Homeostatic Model Assessment (HOMA). El modelo HOMA permite estimar la función de la célula β pancreática (HOMA-B) y el nivel de Insulinorresistencia (HOMA-IR). Este último, estima la IR, a partir de la relación entre sólo dos variables: glicemia basal (en condiciones de ayuno entre 8 a 12 horas) y los niveles de insulina plasmáticos basales, evaluando la relación entre la producción hepática de glucosa y la secreción de insulina (Matthews y cols., 1985) (TABLA 1).

En la actualidad es el método más usado y publicado, dado que es mínimamente invasivo para los pacientes, de bajo costo y de gran utilidad predictiva y diagnóstica, lo que le asigna un valor añadido, ya que permite la comparación entre los estudios que lo han utilizado. Este procedimiento presenta buenas correlaciones con los test gold-standard: el clamp euglicémico y el test de tolerancia intravenosa a la glucosa, pero es más utilizado el indicador HOMA-IR, puesto que los dos métodos antes mencionados son invasivos, requieren de hospitalización y son de mucho mayor costo. (García-Fuentes y cols., 2008)

Tabla N° 1: Fórmulas propuestas para el cálculo de HOMA-IR y HOMA-B.

$\text{HOMA-IR} = \frac{\text{insulina en ayunas } (\mu\text{UI/mL}) \times \text{glucosa en ayunas } (\text{mmol/L})}{22,5}$ $\text{HOMA-B} = \frac{20 \times \text{insulina en ayunas } (\mu\text{UI/mL})}{[\text{glucosa en ayunas } (\text{mmol/L}) - 3,5]}$
--

(Reproducido de García-Fuentes, E. 2008.)

8.3.- Estrés Oxidativo.

8.3.1.- Generalidades de Estrés Oxidativo.

El oxígeno molecular es imprescindible para la vida de los organismos aeróbicos ya que constituye el comburente para los procesos metabólicos de producción de energía (Evans y cols., 2005). Es, paradójicamente, una molécula estructuralmente muy estable, es decir es difícil que esta molécula reaccione con un material inerte o una de origen biológico. Esto se debe a que su estructura molecular es muy equilibrada con lo cual es difícil extraerle o incorporarle electrones, para transformarlos en estructuras de mayor reactividad. Sin embargo bajo ciertas condiciones químicas, físicas y biológicas, como pudiese ser una enfermedad, el oxígeno molecular puede transformarse en moléculas de alta reactividad cuando se produce la pérdida o la ganancia de electrones en su estructura, no obstante esto puede ocurrir también bajo condiciones fisiológicas (Maritim y cols., 2003). Es así como la temperatura, la radiación, algunos metales (especialmente los de valencia +2) como cobre y fierro y, ciertas enzimas o microorganismos que contienen estas enzimas, pueden adicionar o sustraer electrones a la molécula de oxígeno,

transformándolo en estructuras químicas de alta reactividad, genéricamente conocidas como Especies Reactivas de Oxígeno (Evans y cols., 2005).

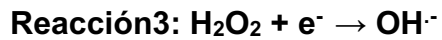
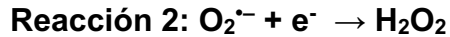
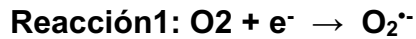
8.3.2.- Especies Reactivas de Oxígeno:

Las especies reactivas de oxígeno (ERO) son una familia de especies altamente reactivas que pueden ser beneficiosas, ya que son utilizadas por el sistema inmune como una forma de atacar y destruir a los patógenos. Sin embargo, cuando éstas se encuentran en exceso, pueden causar daño celular directamente o actuar como intermediarios en diversas vías de señalización. Las ERO de mayor producción en mamíferos, son: Anión radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2) y Anión radical hidroxilo ($OH^{\cdot-}$).

Las especies reactivas de nitrógeno (ERN) también pueden tener un comportamiento similar a las ERO: mientras que el Radical de óxido nítrico ($NO^{\cdot-}$) tiene propiedades vasodilatadoras y antiproliferativas, el Anión peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$) aumenta la concentración intracelular de ERO, con consecuencias perjudiciales para la célula.

8.3.3.- Fuentes Generadoras de ERO.

La generación de ERO es una condición fisiológica de cualquier tipo de vida aeróbica. En mamíferos, en condiciones fisiológicas, las células metabolizan aproximadamente el 95% del oxígeno (O_2) en agua, sin formación de intermediarios tóxicos. Sin embargo, en condiciones normales, un mínimo del 5% de O_2 se metaboliza a través de la reducción univalente, después de cuatro reacciones o etapas diferentes, no obstante el producto final sigue siendo H_2O .



Sin embargo, a través de estas cuatro reacciones se forman tres especies altamente tóxicas, dos de las cuales son radicales libres: Anión radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), y Radical hidroxilo ($OH^{\cdot-}$). El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) sigue siendo un compuesto altamente reactivo, pero no constituye un radical en estricto rigor.

En las células de mamíferos, las ERO pueden formarse a través de diferentes vías, ya sea enzimáticamente (d, e, f, g y h) o no enzimáticamente (a, b y c).

a) Mitocondria: (Kuyvenhoven y cols., 1999).

La mitocondria es una fuente y objetivo principal de ERO.

Genera radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en la membrana mitocondrial externa, en la matriz y en ambos lados de la membrana mitocondrial interna. Mientras que el superóxido generado en la matriz se elimina en ese compartimento, parte del $O_2^{\cdot-}$ producido en el espacio intermembrana puede pasar al citoplasma a través de canales de aniones dependientes de voltaje. El superóxido se convierte enzimáticamente en H_2O_2 por la enzima superóxido dismutasa (SOD). La matriz mitocondrial contiene una forma específica de SOD, con manganeso en el sitio activo (MnSOD), que elimina el superóxido formado en la matriz o en el lado interno de la membrana interna. La expresión de MnSOD es inducida además por agentes que

causan estrés oxidativo, incluyendo radiación e hiperoxia, en un proceso mediado por la activación oxidativa del factor transcripcional NF-κB.

El complejo I (NADH deshidrogenasa) y el complejo III (Ubiquinona citocromo C reductasa), producen la mayor parte del superóxido generado por las mitocondrias de mamíferos in vitro. Los complejos II y IV normalmente no son sitios significativos de producción de ERO.

Por lo tanto, el superóxido producido mitocondrialmente puede ser una fuente importante de daño celular, en especial bajo condiciones patológicas, lo que se denomina disfunción mitocondrial.

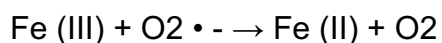
b) Reacción de Fenton. (Stohs S. y cols.,1995)

Es una de las reacciones oxidantes más potentes. La reacción implica H₂O₂ y un catalizador de hierro en estado ferroso. El peróxido se descompone en un ion hidróxido (OH⁻) y uno hidroxilo (OH[·]). Esta última es la especie oxidante primaria y se puede utilizar para oxidar y degradar moléculas orgánicas.

c) Reacción de Haber-Weiss: (Liochev S. y cols., 2002)

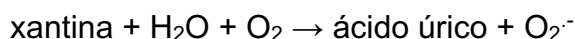
La reducción de un electrón del peróxido de hidrógeno por superóxido también se ha invocado como una fuente potencial de OH[·]. Esta reacción se ha investigado exhaustivamente y ahora se acepta generalmente que la reacción de Haber-Weiss no ocurre en ausencia de catálisis metálica.

Esta reacción combina una reacción de Fenton y la reducción de Fe (III) por O₂^{·-}, produciendo Fe (II) y O₂



d) Xantina oxidasa: (Jiménez, 2002)

La enzima xantina oxidasa (XO) cataliza la oxidación de hipoxantina a xantina y además la oxidación de xantina a ácido úrico, generando O_2^- . Esta enzima juega un papel importante en el catabolismo de las purinas en algunas especies, incluidos los humanos. En condiciones patológicas, como la isquemia tisular, la enzima xantina deshidrogenasa puede convertirse en XO.



e) NADPH oxidasa: (Arango y cols, 2010).

La enzima NADPH oxidasa (NOX) presenta varias isoformas y cataliza la reducción de un electrón de O_2 para generar O_2^- , utilizando NADPH como fuente de electrones. Esta enzima tiene una función fisiológica compleja en la respuesta inmune, en particular en la función bactericida, generando grandes cantidades de O_2^- tóxico y otras ERO importantes. Además, también se encuentra presente en fibroblastos, células endoteliales y musculares lisas de los vasos sanguíneos, constituyendo una fuente constitutiva de O_2^- .

f) Óxido nítrico sintasa: (Vasquez–Vivar y cols., 1998).

Las enzimas Óxido nítrico sintasas (NOS) son una familia de enzimas que convierten el aminoácido L-arginina en L-citrulina y NO. Todas las isoformas de NOS son enzimas homodiméricas que requieren el mismo sustrato (L-arginina), cosustratos (O_2 y NADPH) y cofactores como Flavín mononucleótido (FMN), Flavín adenín dinucleótido (FAD), tetrahidrobiopterina (BH4) y grupo hem.

Existen tres isoformas de NOS en mamíferos: NOS neuronal constitutiva (nNOS o NOS I), NOS inducible por endotoxinas y citocinas (iNOS o NOS II) y NOS endotelial constitutiva (eNOS o NOS III). NOS neuronal (NOS1) desempeña un papel importante en la comunicación intracelular, NOS inducible (NOS2) utiliza NO para inducir estrés oxidativo en patógenos, mientras que NOS endotelial (NOS3) juega un papel importante en la regulación de la función vascular, siendo un poderoso vasodilatador. Sin embargo, a partir de estudios con la enzima aislada, se ha demostrado que, bajo condiciones de estrés oxidativo, NOS3 puede desacoplarse en ausencia del sustrato L-arginina o del cofactor tetrahidrobiopterina (BH4), estimulando la producción de $O_2^{\cdot-}$, en lugar de NO.

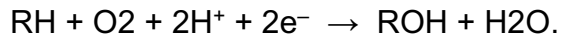
g) Mieloperoxidasa: (Heinecke J y cols., 1993).

La enzima mieloperoxidasa (MPO) produce ácido hipocloroso (HOCl) a partir de H_2O_2 y anión cloruro (Cl^-). Requiere a un grupo hem como cofactor. Además, oxida la tirosina a radical tirosilo utilizando H_2O_2 como agente oxidante. Tanto el HOCl como el radical tirosilo son citotóxicos y los neutrófilos los utilizan para matar bacterias y otros patógenos.

h) Citocromo P450: (Davydov , 2001)

La monooxigenasa microsómica unida a la membrana, es un sistema multienzimático que generalmente se resume como el Complejo citocromo P450 (C-P450), como la oxidasa terminal y una NADPH-citocromo P450 reductasa.

La reacción más común catalizada por el C-P450 es una reacción de monooxigenasa. Esto podría ser, por ejemplo, la inserción de un átomo de oxígeno en un sustrato orgánico (RH) mientras el otro átomo de oxígeno se reduce a H_2O



8.3.4.- Mecanismos de Defensa Antioxidante.

Todas las formas de vida mantienen un ambiente reductor dentro de las células. El mantenimiento de este estado se logra posiblemente a través del sistema de defensa antioxidante, que actúa para proteger la homeostasis celular contra las ERO nocivas producidas tanto en condiciones fisiológicas, así como en estados patológicos. El sistema antioxidante es preservado por sustancias antioxidantes que mantienen el estado reducido por un aporte constante de energía metabólica.

Las sustancias antioxidantes son moléculas pequeñas que pueden eliminar las ERO al aceptar o donar un electrón. Por lo general, esto significa que la molécula antioxidante se oxida, convirtiéndose en una molécula más estable y menos reactiva que la recientemente reducida. En la mayoría de los casos, la molécula captadora proporciona radicales de hidrógeno que se combinan con los radicales libres. En consecuencia, se genera un nuevo radical que tiene una vida útil mejorada en comparación con el inicio (Spiteller, 2003).

Los antioxidantes pueden formar complejos estables con ERO, impidiendo su acción catabólica. Además, dependiendo de su coeficiente de partición y potencial REDOX, los antioxidantes pueden actuar libremente en la interface celular comportándose como potentes protectores de células y lipoproteínas o estabilizando antioxidantes lipofílicos que previenen la peroxidación lipídica (Maritim y cols., 2003).

Los mecanismos homeostáticos con que el organismo enfrenta el daño oxidativo que habitualmente causan estas especies son numerosos y diversos, reflejando la multiplicidad de formas de radicales libres y especies reactivas, como también los numerosos compartimentos donde actúan en el organismo y las propiedades físicas de estos (Yang y cols., 2015). Los sistemas de defensa antioxidante celular son también muy eficientes dada la muy corta vida media de los radicales libres: comprenden desde moléculas pequeñas endógenas y exógenas, macromoléculas con capacidad antioxidante, hasta enzimas antioxidantes.

a) AOX No enzimáticos.

La capacidad antioxidante celular está dada en parte, por mecanismos no enzimáticos los cuales provienen principalmente de la dieta y comprenden moléculas como el glutatión (GSH), el ácido ascórbico (vitamina C), β -carotenos o provitamina A, vitamina E (α -tocoferol), y proteínas transportadoras de metales como la cupreína y ferritina (Maritim y cols., 2003).

Los antioxidantes exógenos, como las vitaminas E y C, actúan en varios lugares, como la membrana celular, el medio intracelular y extracelular. Reaccionan con ERO para eliminarlos o inhibirlos. El interior lipídico hidrofóbico de las membranas requiere un espectro diferente de antioxidantes. La vitamina E liposoluble es el antioxidante más importante en este entorno, que protege contra la pérdida de integridad de la membrana.

Los antioxidantes solubles en grasa son importantes para evitar que los ácidos grasos poliinsaturados de membrana sufran peroxidación lipídica. El glutatión elimina los radicales ya generados y, en ausencia de éstos, los ácidos grasos poliinsaturados no

pueden ser oxidados. Por lo tanto, protegen la membrana rica en ácidos grasos poliinsaturados contra ROS. Además, los antioxidantes solubles en agua, incluida la vitamina C, desempeñan un papel clave en la eliminación de ERO en la fase hidrofílica.

Otras moléculas antioxidantes pequeñas también están presentes de forma natural en el plasma, como el ácido úrico y la bilirrubina (Spiteller, 2002).

Además de las moléculas antioxidantes no enzimáticas, anteriormente señaladas, existen los Quelantes, los cuales disminuyen la disponibilidad de metales de transición, impidiendo la formación de OH^\cdot a partir de la Reacción de Fenton/Haber-Weiss (Adjimani, 2015) y los Inductores de defensas antioxidantes, principalmente a través de la liberación del factor transcripcional NRF-2, por oxidación de su molécula captora Keap-1, expresando proteínas antioxidantes (Kubo y cols, 2017).

b) Antioxidantes enzimáticos:

Constituyen un sistema fundamental en la prevención de daño oxidativo. Las enzimas más importantes que participan en la defensa antioxidante son la Superóxido Dismutasa (SOD) y las hidroxidrogenasas. Estas hemoproteínas catalíticas son el producto evolutivo devenido con la necesidad de la asimilación del oxígeno por parte de los organismos eucariontes. Otras enzimas involucradas en el consumo de oxígeno son las piridín y flavo deshidrogenasas del ciclo de Krebs, así como las hemoenzimas del transporte electrónico (citocromos) (Yang y cols., 2015).

La acumulación de peróxido de hidrógeno es fuente de radicales libres. Las hidroperoxidasas lo eliminan (así como a los lipoperóxidos) mediante la reducción irreversible. Este grupo general de enzimas se subdivide en 2 subgrupos: las peroxidasas y la catalasa (Maritim y cols., 2003).

a) Superóxido Dismutasa (SOD) (Maritim, 2003): Esta enzima es capaz de dismutar al radical superóxido y transformarlo en peróxido de hidrógeno, para que luego la enzima Catalasa (CAT), lo transforme en agua más oxígeno molecular o, que la enzima Glutación Peroxidasa (GPx), en presencia de glutatión reducido (GSH), lo transforme en agua, con la consecuente oxidación del glutatión (GSSG).

Existen tres isoformas de SOD: SOD-1, la cual es la isoforma citosólica y utiliza como cofactor Cu y Zn; SOD-2, que es la isoforma mitocondrial utilizando como cofactor Mn y SOD-3 que es la isoforma extracelular y utiliza como cofactor Cu y Zn al igual que SOD-1.

SOD, se encuentra presente en todos los tipos celulares del organismo humano, aunque no en igual concentración en cada una de ellas, siendo las células de mayor actividad aeróbica las que presentan mayor cantidad de ésta. (Mendez y cols, 2005).

b) Catalasa (Kodydkova, 2014): presenta una estructura de cuatro subunidades hemínicas, una de las cuales contiene un sitio de unión a NADPH, el cual actúa como cofactor. Participa en la eliminación del peróxido de hidrógeno formado como producto de la actividad de enzimas oxidasas (por ejemplo, la xantina oxidasas). En

su mecanismo de acción, la propia molécula de agua actúa como donante de electrones.

Esta importante enzima se encuentra principalmente en GR, células de médula ósea, mucosas, riñón e hígado.

c) Complejo Glutación Peroxidasa (GPX)- Glutación Reductasa:

Es la principal molécula antioxidante endógena. La enzima GPX reduce tanto el H_2O_2 como los hidroperóxidos orgánicos cuando reacciona con glutatión, oxidándolo, siendo nuevamente reducido por la acción de la enzima glutatión reductasa, utilizando como cofactor NADPH (Espinoza y cols, 2008).

CAT, SOD-1 y GPX, han sido estudiadas en DMT2, sin embargo, la evidencia no genera resultados concluyentes. En modelos animales de sobreexpresión de estas enzimas, se ha registrado hipertrofia de células β pancreáticas, hiperinsulinemia e incluso IR. Por el contrario, en modelos knockout para las mismas enzimas, se ha registrado hipotrofia de células β pancreáticas, hipoinsulinemia, hipersensibilidad a la insulina y baja de peso en los animales experimentales (Figura N°3). En ambos casos, los animales sufrían severas alteraciones metabólicas, lo cual indicaría que la regulación antioxidante enzimática es en extremo regulada y que dicha regulación es dinámica en función del status oxidativo de los modelos experimentales (Lei y cols., 2011).

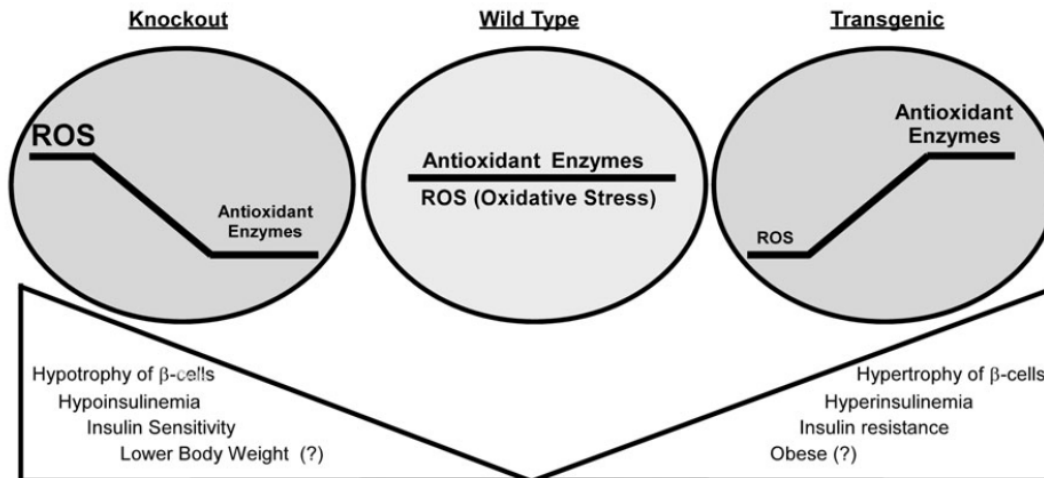


Figura N° 3: Efectos de la represión y sobreexpresión de enzimas antioxidantes (Reproducido de Lei y cols, 2011).

8.3.5.- Mecanismos de Daño Oxidativo.

Las ERO han desempeñado un rol positivo desde el origen de la vida, generando efectos benéficos en los organismos. Intervienen en la transducción de señales, transcripción génica, y la regulación de la actividad enzimática. Además, junto con las Especies Reactivas de Nitrógeno (ERN) intervienen en la adhesión leucocitaria, agregación plaquetaria, angiogénesis, tono vascular y hemodinámica (Evans, 2005). En resumen, se puede aseverar que la actividad óxido-reductora es normal en el organismo humano, siendo por tanto la pérdida de este delicado equilibrio, lo que se denomina Estrés Oxidativo (Figura N°4).

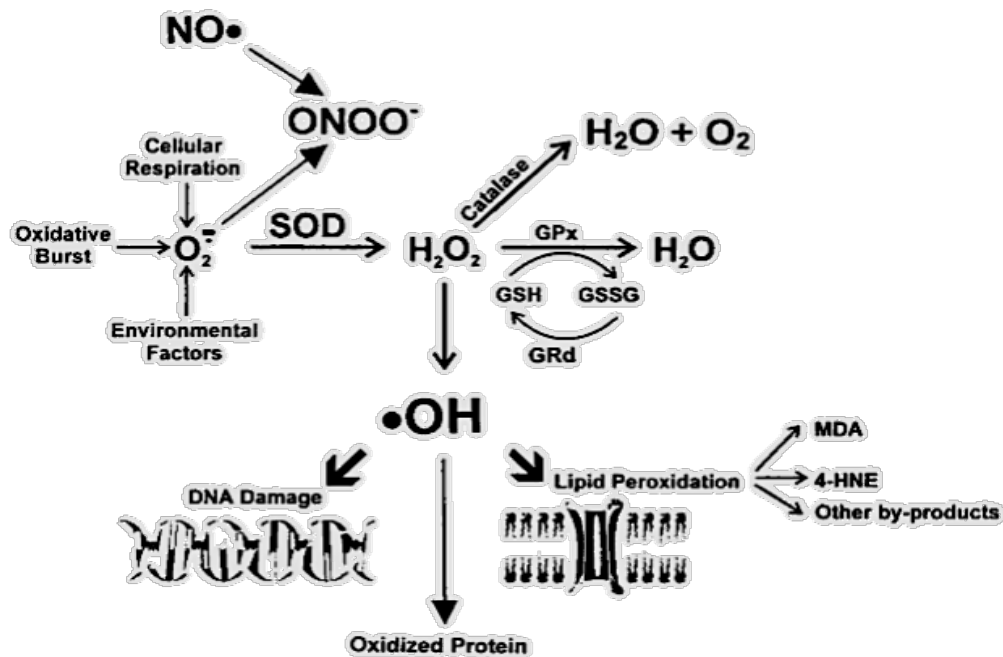


Figura N° 4: Producción de ROS y RNS en mamíferos (Reproducido de Maritim y cols., 2003).

El oxígeno molecular puede transformarse en múltiples ERO, sin embargo son dos de estos los de mayor importancia en sistemas biológicos y de mayor impacto en el organismo: El Radical Hidroxilo (OH^\cdot), de corta vida media y por consiguiente muy inestable, y el Radical Superóxido (O_2^\cdot), de vida media más larga, más estable y menos reactivo. Cuando estas moléculas se forman, comienzan un proceso de destrucción que es capaz de generar daño a micro y macromoléculas, incluyendo el material genético y que, según se ha evidenciado, aumentan en una amplia gama de procesos patológicos, tales como enfermedades neurodegenerativas, cáncer, enfermedades autoinmunes e incluso metabólicas, como lo es, la DMT2 (Park y cols., 2009).

Las proteínas sufren oxidaciones que modifican las propiedades de algunos aminoácidos, generando cambios en la actividad biológica de algunas de ellas, por

ejemplo, de enzimas. Ejemplos de lo anterior, lo constituye la enzima IKKB, la cual al estar sometida a EO, aumenta su actividad, liberando al factor transcripcional NF- κ B, el cual aumentará la expresión de genes proinflamatorios como ocurre en caso de IR (Peraldi y cols., 1996).

El material genético también es afectado por las ERO, produciéndose un deterioro en la estructura del ADN, lo cual puede tener graves consecuencias para el organismo, tales como mutagénesis y carcinogénesis (Ye, 2013).

Los lípidos son también particularmente afectados por la acción de las ERO, en especial los ácidos grasos insaturados y los esteroides. Los ácidos grasos sufren un proceso llamado lipoperoxidación, con lo cual se forman una serie de productos de degradación (peróxidos, epóxidos, aldehídos, alcoholes), siendo muchos de ellos de alta toxicidad, lo cual determinará daño, llegando incluso a la muerte celular (Bergman y cols., 2000).

8.3.6.- Biomarcadores de Daño Oxidativo.

La National Academy of Sciences (Estados Unidos), define Biomarcadores, como: "... indicadores o señalizadores de eventos en sistemas biológicos o muestras..., pudiendo ser considerados como productos finales o predictores de reacciones anteriores (Park y cols., 2009).

La forma mayormente utilizada para clasificarlos, se basa en el sustrato del cual provienen.

8.3.6.1.- Biomarcadores de Oxidación de Proteínas.

Grupos Carbonilos: Son derivados de la oxidación directa de residuos de aminoácidos, en particular de lisina, arginina, treonina y prolina. Estas modificaciones en las proteínas generan importantes cambios estructurales y funcionales (Palamanda, 1992).

Numerosos estudios demuestran que las proteínas serían un blanco de los ERO, generando de esta forma grupos carbonilos. Este hecho se ha observado en enfermedades neurodegenerativas, hipercolesterolemia, artritis juvenil y por sobre todo DMT2, sugiriendo de esta forma la función de Biomarcadores de los grupos carbonilos, lo que podría ser utilizado en el proceso diagnóstico (Komers y cols., 2000).

8.3.6.2.- Biomarcadores de Oxidación de ADN.

8-hidroxi- 2`- deoxiguanosina (8HdG): Las ERO, producen daño en el material genético, siendo el principal producto de éste, el 8-hidroxi- 2`-deoxiguanosina (8HdG) proveniente de la oxidación de la base nitrogenada guanina.

8.3.6.3.- Biomarcadores de Oxidación de Lípidos.

Malondialdehído (MDA): Es uno de los productos finales de lipoperoxidación en las membranas celulares y en las lipoproteínas de baja densidad (LDL), siendo el biomarcador de daño oxidativo en lípidos mayormente utilizado. Este puede ser cuantificado en el plasma y en orina, aunque la absorción de peróxidos y aldehídos

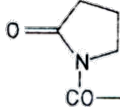


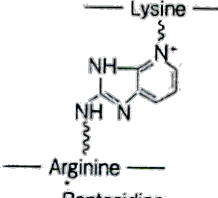
provenientes de los alimentos pueden afectar la determinación del MDA, especialmente en la orina.

Estudios que utilizaron MDA como biomarcador en caso de IR, demostraron ser un potente predictor de riesgo de DMT2 independiente de otros factores de riesgo de esta patología (Lee, 2001).

8.3.6.4.-Biomarcadores de Oxidación de Glúcidos.

Productos Finales de Glicosilación Avanzada (AGEs): son productos de glicosilación de proteínas no enzimática. La evidencia señala que los AGEs se encuentran en el plasma y tejidos en personas de mayor edad, Insuficiencia Renal y Enfermedad de Alzheimer, considerándose potencialmente un indicador de control glicémico en diabetes, permitiendo la valoración de la terapéutica en casos de retino, nefro y neuropatía.

Tabla Nº 2: Biomarcadores de Estrés Oxidativo.

MOLECULAS OXIDADAS/ NITROSADAS	BIOMERCADOR	ESTRUCTURA	PATOLOGIAS ASOCIADAS
PROTEINAS	1.- Grupos Carbonilos	 <p>2-pyrrolidone</p>	1. Enfermedades Neurodegenerativas 2. Diabetes ⁽¹⁵⁾ 3. Hipercolesterolemia 4. Artritis juvenil
ADN	1.- 8-hidroxi- 2'-deoxiguanosina	 <p>3-nitrotyrosine 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine</p>	1. Infarto Agudo al Miocardio. 2. Enf. de Parkinson. 3. Cáncer (edades avanzadas).
LIPIDOS	1. Malondialdehído	 <p>Malonaldehyde</p>	1. Patología coronaria estable. 2.- Diabetes ⁽³⁾ .
GLUCIDOS	1.- Productos Finales de Glicosilación Avanzada	 <p>Lysine Arginine Pentosidine</p>	1. Diabetes. 2. Insuficiencia Renal. 3. Enfermedad de Alzheimer.

(Reproducido de Rodrigo, R. 2009.)

8.4.- Estrés Oxidativo e Insulinorresistencia.

El estrés oxidativo como mecanismo de daño en la DMT2, ha sido bien fundamentado. La oxidación de la glucosa parece ser uno de los principales responsables en la especie humana. Ésta puede ser transformada en un radical enediol (en presencia de metales de transición), para luego formar aldehídos y anión superóxido, el cual, si no es dismutado por la enzima SOD y posteriormente transformado en agua y oxígeno molecular por la enzima CAT o GPx, podría formar radical hidroxilo (Maritim y cols, 2003). Los estados de hiperglicemia crónica como los que se encuentran en la prediabetes y posteriormente en DMT2, pueden promover la lipoperoxidación de LDL, generando ERO (Kawamura y cols., 1994). Otra importante fuente de ERO en DMT2, es mediante la interacción de glucosa con proteínas, formando productos de Amadori y productos finales de glicosilación avanzada (AGEs), los cuales generan a nivel intracelular EO logrando activar al factor transcripcional NF-kB, el cual favorece la transcripción de moléculas proinflamatorias, lo cual, como se ha revisado anteriormente, favorece el desarrollo de IR (Maritim y cols., 2003)., como lo grafica la figura N° 5.

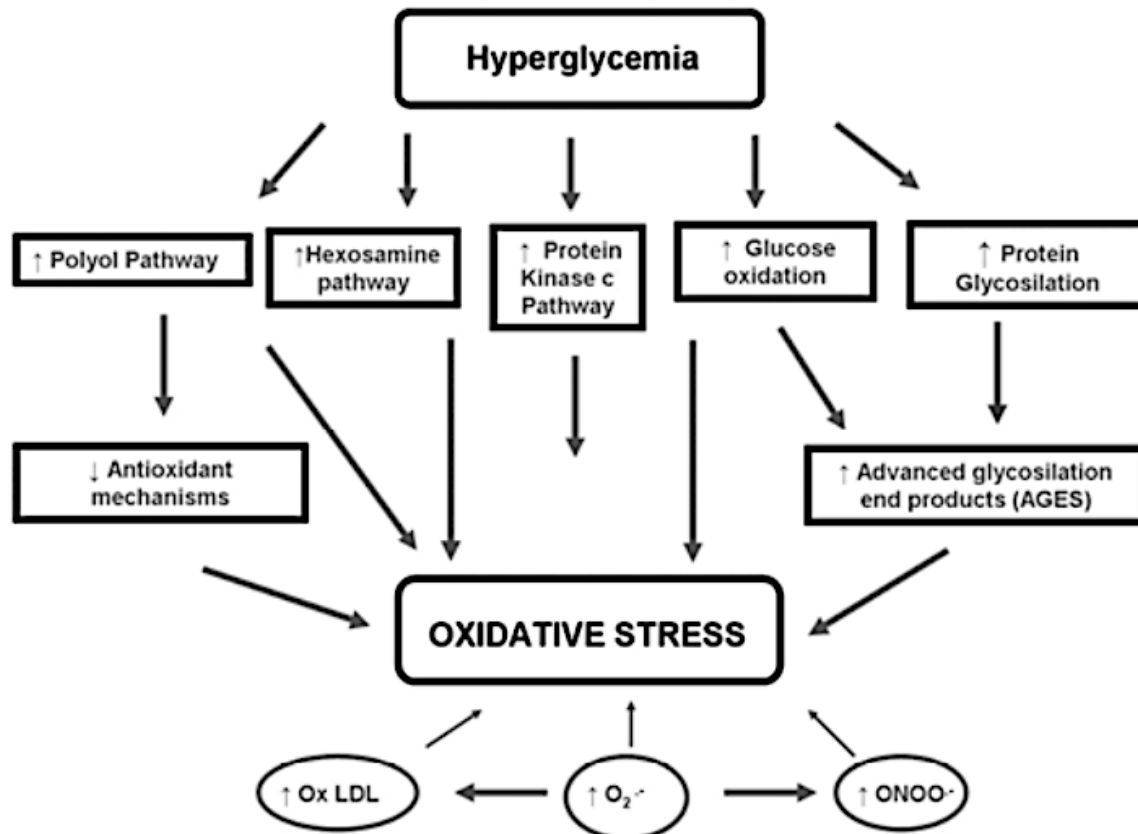


Figura N° 5: Hiperglicemia como inductor de Estrés Oxidativo. (Reproducido de Ramalho-Santos y cols., 2008). Los estados de hiperglicemia crónica estimulan diferentes vías metabólicas, las cuales generan un incremento de los productos finales de glicosilación avanzada (AGEs) y disminución de la expresión y actividad de enzimas antioxidantes, lo cual, conduce a un estado de Estrés Oxidativo. (Ox LDL: lipoproteína de baja densidad oxidada; ONOO^{•-}: peroxinitrito; O₂^{•-}: anión superóxido).

La relación entre EO e IR ha sido bien documentada en modelos animales *in vivo* e *in vitro*. Este mismo corpus de evidencia, señala que dicha relación no se restringe solamente a modelos con DMII, sino que también existe en sujetos obesos e incluso en sujetos normopeso no diabéticos. Este hecho permite suponer que podría ser posible correlacionar EO con IR en sujetos varios años antes que comiencen con DMT2 (Park, 2009).

Como ya se ha descrito anteriormente, la inflamación crónica, hiperinsulinemia y la lipotoxicidad son mecanismos productores de IR, y como es lógico, el EO también es uno de los estímulos para generarla (Lee, 2001).

Los mecanismos moleculares que ligan al EO y a la IR son múltiples, sin embargo, convergen en un punto: la activación de kinasas y la inhibición de fosfatasas, lo cual determina una alteración en la vía de señalización de insulina, tanto en células insulino dependientes como en β pancreáticas (Cohen y cols., 1996).

El primer blanco del EO en la vía de señalización de insulina es un incremento de la expresión y actividad de las enzimas IKK β y JNK. Ambas enzimas tendrán como blanco IRS1 e IRS2, lo que generará como efecto la fosforilación en residuos de serina y/o treonina y la disminución de la fosforilación en residuos de tirosina (Gao y cols., 2002). Esta alteración en IRS, genera una disminución significativa de la vía de señalización dirigida por PI3K, la cual lleva finalmente a la inactivación de AKT y a la resistencia a la acción metabólica de la insulina. La consecuencia de este hecho es un aumento en la lipólisis lo que generará dislipidemia, una disminución en la síntesis de proteínas y de glucógeno, lo cual podría generar pérdida de masa muscular e hiperglicemia respectivamente. Además, el transporte de sodio se altera con el subsecuente riesgo de HTA (Evans y cols., 2005)

Por otra parte, la hiperfosforilación de IRS en serina/treonina, potenciará la acción mitogénica de la insulina, generando una disminución en la apoptosis y un incremento en la proliferación celular, por la vía Ras-kinasa, lo cual está altamente vinculado con carcinogénesis (Aguirre y cols., 2000). En conclusión, el EO puede generar resistencia a la acción metabólica de la insulina, con la consiguiente aparición de

alteraciones como HTA, dislipidemia y disminución de la síntesis proteica, no obstante, se exagera la acción mitogénica de la insulina, incrementando el riesgo de carcinogénesis (Greene y cols., 2003), como se esquematiza en la figura N° 6.

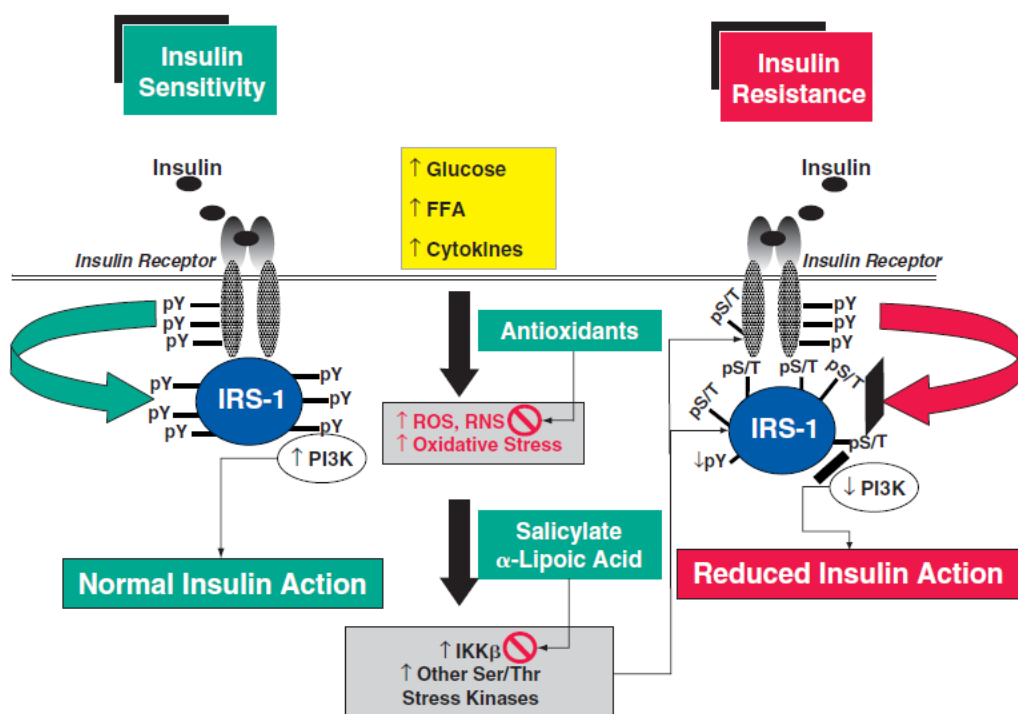


Figura 6: Modelo propuesto de insulinoresistencia producida por estrés oxidativo (Reproducido de Evans, J. et al. 2005). Los estados de hiperglicemia, dislipidemia e inflamación de tipo crónicos, aumentan la producción de ERO, generando Estrés Oxidativo, el cual aumenta la actividad de enzimas que fosforilan a IRS en residuos de serina o treonina. Esta fosforilación disminuye la acción metabólica de la insulina, pero aumenta la acción mitogénica de ésta, lo que se denomina Insulinoresistencia. (FFA: Ácidos grasos libres; IRS: Sustrato Receptor de Insulina; pY: fosforilación en Tirosina; pS/T: fosforilación en serina/treonina).

Dada la estrecha relación entre estrés oxidativo e Insulinoresistencia que muestra la literatura, parece fundamental determinar el perfil oxidativo en sujetos con IR para poder contrastarlo con sujetos que no presentan dicha alteración, con el fin de establecer asociaciones y determinar de manera precoz el riesgo de DMT2, para poder prevenirla utilizando fármacos o acciones que ataquen esta vía de generación

de IR, como pudiesen ser los antioxidantes y/o el ejercicio físico, respectivamente (Park y cols., 2009).

La IR es el mejor predictor de DMT2 en pacientes en etapa prediabética, por lo cual evaluar el nivel en que se encuentra y los factores que la producen se hace fundamental, considerando la mortalidad, discapacidad y costos que la DMT2 genera a nivel mundial y que, según proyecciones de la OMS, seguirán incrementándose por los próximos 20 años (OMS, 2017).

Existen estudios en modelos animales *in vitro*, e *in vivo*, que dan cuenta de la relación entre IR y EO en pacientes diabéticos, sin embargo, estudios de EO en humanos insulinoresistentes no diabéticos son escasos, presentan metodologías muy variadas y presentan resultados poco aclaratorios (Park, 2009).

Lee (2001) midió parámetros REDOX en 70 sujetos no diabéticos en Corea del Sur. Determinó la IR arbitrariamente como la presencia de dos de tres indicadores de prediabetes y la correlacionó con MDA, obteniendo una asociación significativa para población insulinoresistente. El resto de las variables del estudio (homocisteína, ceruloplasmina, ferritina, triglicéridos plasmáticos y parámetros antropométricos) no se correlacionaron con IR.

Uno de los estudios de IR y EO más importantes que se ha realizado es el de Park y cols. (2009), el cual tomó 2774 pacientes adultos de ambos sexos y realizó determinación de IR (a través de HOMA-IR), variables antropométricas y de EO (8-isoprostanos y LDL oxidado). Este trabajo, concluyó que existe relación sólo entre la IR y los niveles de LDLox, no considerando en su diseño la cuantificación de

antioxidantes enzimáticos o no enzimáticos y con una muestra extremadamente heterogénea.

Kopprasch y cols. (2015), compararon diferentes biomarcadores de EO (Generación de ERO por fagocitos circulantes y Capacidad Antioxidante Total del Plasma) y diferentes métodos de medición de IR en 1183 sujetos normales, 280 no diabéticos con intolerancia a la glucosa y 69 con DMT2 recientemente diagnosticada, concluyendo que HOMA-IR es el más robusto indicador para IR en EO, puesto que presentaba mayor correlación con el nivel de generación de ERO en los sujetos estudiados.

En base a la evidencia anteriormente expuesta, se puede inferir que HOMA-IR es el mejor indicador de insulinoresistencia por su bajo costo, poca invasividad para su determinación y por su sensibilidad en diferentes estadios de alteraciones del metabolismo de los glúcidos, lo cual confirmaría su utilización en estudios que describan o correlacionen dichas alteraciones con otras variables, tales como parámetros REDOX.

9.- HIPÓTESIS DE INVESTIGACION.

H1: Los adultos mayores que poseen Insulinorresistencia, presentan modificaciones en sus parámetros REDOX.

10.- OBJETIVOS.

10.1.- Objetivo General

Determinar la asociación entre Insulinorresistencia y los parámetros REDOX en adultos mayores con patologías crónicas controladas.

10.2.- Objetivos específicos

10.2.1.- Evaluar los niveles de Insulinorresistencia en adultos mayores.

10.2.2.- Evaluar la defensa antioxidante en adultos mayores.

10.2.3.- Determinar el daño oxidativo en adultos mayores.

10.2.4.- Determinar la asociación entre Insulinorresistencia y parámetros REDOX en adultos mayores.

11.- MATERIALES Y MÉTODOS.

11.1 Materiales

11.1.1.- Caracterización de la muestra:

- Entrevista personal: Edad, antecedentes mórbidos, farmacoterapia, nivel educacional, hábitos alimentarios.

- Balanza SECA

- Estadiómetro SECA.

Tanto la entrevista personal como las mediciones de talla y peso, se realizaron en dependencias de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso

11.1.2.- Extracción de muestra sanguínea

La extracción de la muestra sanguínea se realizó en dependencias del laboratorio Clínico LABOCLIN, y fue de tipo venosa simple, la cual constituye un procedimiento clínico habitual para los pacientes de la muestra, presentando rara vez algún tipo de alteración para los adultos mayores. Además, los riesgos derivados de este procedimiento son mínimos dados los criterios de selección de los pacientes. Cabe destacar que el laboratorio Clínico LABOCLIN posee un Protocolo de toma de muestra en donde se hace específica el manejo en caso de complicación.

Una vez extraída la muestra de 10 ml de sangre venosa, se separaron 9 ml para el análisis de parámetros REDOX por parte del tesista y 1 ml para la determinación de Insulinorresistencia.

11.1.3.- Determinación de Insulinorresistencia.

Se llevó a cabo inmediatamente extraída la muestra en laboratorio LABOCLIN, bajo sus protocolos habituales:

- Glicemia: Método GOD- PAD con muestra de plasma con fluoruro de sodio.
- Insulinemia: Quimioluminiscencia con muestra consistente en suero.
- HOMA-IR: Se utilizó la ecuación de Matthews y cols (1985) para HOMA-IR 1.

11.1.4.- Determinación de parámetros REDOX

11.1.4.1.- Instrumentos de medición

Espectrofotómetro UV visible. Marca Rayleigh. UV-2601

Software estadístico Graphpad Prisma 8.

11.1.4.2.- Equipos

Balanza analítica. Marca RADWAG, modelo AS220-C/2

PHmetro. Marca JENCO, modelo 60

Centrífuga clínica. Marca HETTICH, modelo UNIVERSAL / K2S

Centrífuga de alta velocidad. Marca HERMLE, modelo Z 233 M –2

Spiner. Marca SCILOGEX, modelo D1008

Placa calefactora. Marca LabTech, modelo LMS - 1003

Vórtex, Marca, modelo 37600 Mixer

Sonicador. Marca Elma, modelo TRANSSONIC 310

Baño termoregulado. Marca K, modelo YCW – 04M (11 L)

Micropipeta. Marca GILSON (volúmenes 1-10 μ L, 20-200 μ L, 100-1000 μ L y 1-5 ml)

Macbook Air, 13-inch, 2018, N° Serie C1MWH36WJ1WK

Software Microsoft Office 365. Versión 16.15

11.1.4.3.- Reactivos

Tabla N°3: Reactivos para determinar parámetros REDOX

ABTS: 2,2'-azinobi(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)
ABAP: 2,2'-azobis(2-amidinopropano)
Acetato de etilo
Ácido clorhídrico (HCl)
Citocromo C
Cloruro de Sodio (NaCl)
Carbonato de Sodio (Na ₂ CO ₃)
DNPH: 2,4 dinitrofenilhidracina
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
Etanol
Fosfato de disódio (Na ₂ HPO ₄)
Fosfato sódico dihidrogenado (NaH ₂ PO ₄)
Folin-Ciocalteu
Hidróxido de Sodio (NaOH)
Peroxido de Hidrogeno (H ₂ O ₂)
Sulfato de cobre (CuSO ₄)
Tartrato Sodio Potasio (KNaC ₄ H ₄ O ₆)
TBA: ácido tiobarbitúrico
TCA: ácido tricloroacético
Xantina
Xantina Oxidasa (XO)
Urea

11.2.- Metodología y Diseño experimental

11.2.1.- Tipo de investigación

La investigación corresponde a un estudio cuasiexperimental, ya que se analizó el efecto causal de la variable independiente (IR), mediante el control de variables intervinientes con una muestra no probabilística, distribuyéndose la muestra en grupo control y grupo con Insulinorresistencia.

11.2.2.- Diseño de investigación

El diseño del presente estudio es de tipo prospectivo transversal, y se grafica en la Figura 7.

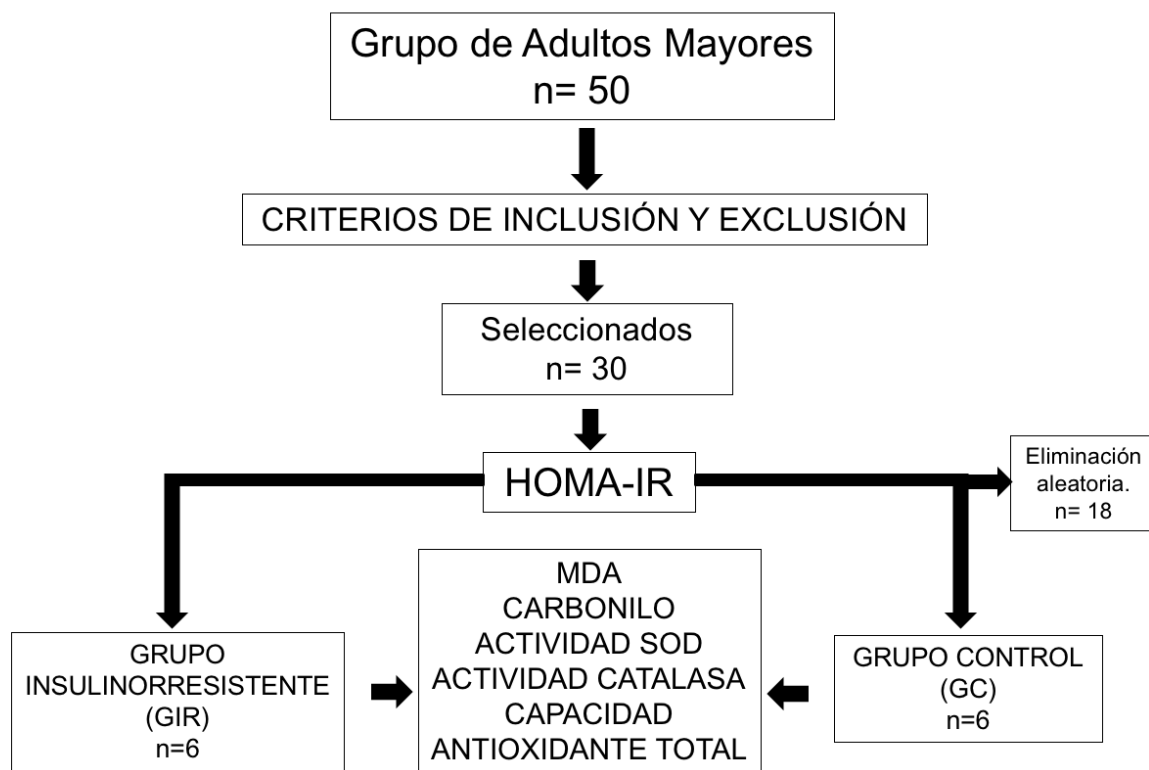


Figura 7: Diseño de Investigación.

11.2.3.- Variables.

Las Variables en estudio, están sintetizadas en la Tabla 4.

Tabla N°4: Variables de Estudio

VARIABLE	SUBVARIABLE	TIPO	DEFINICION	OPERACIONALIZACIÓN	METODO
INSULINO RESISTENCIA		INDEPENDIENTE	Captación de glucosa inducida por insulina total o parcialmente disminuida en tejidos insulinosensibles como resultado de la inhibición en la vía de señalización de la acción metabólica de la insulina.	HOMA-IR > 2,5	Matthews (1985)
DEFENSA ANTIOXIDANTE ENZIMATICA	ACTIVIDAD SOD	DEPENDIENTE	Número de unidades de SOD por miligramo de proteínas, usando el total de proteínas determinado por método Lowry.	U enzima SOD / mg proteína	Fridovich (1995)
	ACTIVIDAD CAT	DEPENDIENTE	Número de unidades de CAT por miligramo de proteínas, usando el total de proteínas determinado por método Lowry.	U enzima CAT / mg proteína	Aebi (1984)
DEFENSA ANTIOXIDANTE NO ENZIMATICA	TRAP	DEPENDIENTE	Concentración de Equivalentes de TROLOX®	TEAC µM	Romay (1996)
DAÑO OXIDATIVO	LIPOPEROXIDACION	DEPENDIENTE	Cantidad de MDA en 1 mililitro de plasma sanguíneo.	nM MDA / mL	Esterbauer (1982)
	OXIDACION DE PROTEINAS	DEPENDIENTE	Cantidad de carbonilo por miligramo de proteínas.	nM carbonilo / mg proteína	Palamanda y Kehrer (1992)

11.2.4.- Criterios de Inclusión y Exclusión

Los criterios de inclusión y exclusión del estudio, se resumen en la Tabla 5.

Tabla N°5: Criterios de Inclusión y Exclusión.

Criterios de Inclusión	Criterios de Exclusión
- Adulto mayor: <ul style="list-style-type: none"> ● >60 AÑOS (mujeres) 	-Personas < de 60 años.

<ul style="list-style-type: none"> ● >65 AÑOS (hombres) - Independiente - Capaz de proveer un consentimiento informado - Orientado en tiempo y espacio (Cognitivo) - Comorbilidad controlada. - Presencia de Insulinorresistencia (GIR). - Ausencia de Insulinorresistencia (GC). -Pertener al sistema de salud público 	<ul style="list-style-type: none"> - Presencia de Patología sistémica: DMT2, Enfermedades autoinmunes, Obesidad mórbida. -Presencia de patologías respiratorias: EPOC, Fibrosis o edema pulmonar. - Enfermedad neurodegenerativa o demencia. - Patologías cardíacas no controladas: arritmias, compromiso hemodinámico, insuficiencia cardíaca no controlada, sospecha de aneurisma, hipertensión arterial. - Evento cardiovascular reciente: infarto agudo al miocardio. - Comorbilidad no controlada - Consumo de tabaco - Epilepsia - No pertenecer a un sistema de salud público.
--	--

11.2.5.- Población y Muestra

- a) Universo: Adultos Mayores que pertenecen a la comuna de Concón durante el año 2018.
- b) Población: Adultos mayores que participan en Grupo de Adultos Mayores Renacer.
- c) Muestra: A este grupo (Población) se les solicitó su colaboración voluntaria a través de la firma de un Consentimiento Informado (ANEXO 1) aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso (ANEXO 2). Una vez firmado dicho Consentimiento, se realizó una entrevista personal y se le aplicaron los criterios de inclusión y exclusión, detallados en la Tabla 5.

Posteriormente al grupo remanente (n=30), se le midió el indicador HOMA-IR en base a una muestra sanguínea, dividiéndose en dos grupos: Grupo con Insulinorresistencia (GIR), compuesto por 6 adultos mayores y Grupo sin Insulinorresistencia (GC), compuesto por 24 adultos mayores. Del GC, se eligieron aleatoriamente 6 sujetos que conformaron el GC definitivo.

11.2.6.- Evaluación

11.2.6.1.- Caracterización de la Muestra.

Para caracterizar la muestra de estudio se valoraron las características generales de los sujetos, la cual se adjuntó a la información general recopilada en las entrevistas previas (sexo, edad, antecedentes clínicos y sociales).

Se midió la altura y el peso, para posteriormente calcular el Índice de masa corporal (IMC) el cual se obtiene del cociente entre el peso (Kg) y el cuadrado de la talla (m) (Nuttall, F. 2015). Se evidenció que los sujetos del GIR presentaban obesidad 1, mientras que el GC, sólo presentaba sobrepeso.

Además, se realizó la evaluación de los perímetros de cintura y cadera y el Índice cintura/cadera el cual es el cociente entre el perímetro de cintura (cms) y el perímetro a nivel de cadera (cms) (Tseng, 2005). Cabe destacar que todos los participantes se encontraban con sus patologías de base controladas, adheridos a su terapia farmacológica, la cual no afecta los niveles de las variables evaluadas en este estudio.

Esta información se expone en la Tabla 6.

Tabla Nº 6: Caracterización de la Muestra.

Parámetro	GC (Media ± EE)	GIR (Media ± EE)
Sexo (F/M)	4/2	5/1
Edad (años)	74,67 ± 2,75	73,33 ± 1,65
Peso (Kg)	71,65 ± 5,46	81,6 ± 8,4
Talla (m)	1,6 ± 0,05	1,6 ± 0,03
IMC (Kg/m²)	27,47 ± 2,27	31,38 ± 1,94
ICC	0,92 ± 0,04	0,92 ± 0,03

11.2.6.2.- Evaluación de Insulinorresistencia (HOMA-IR)

Para realizar esta medición se separaron 1 ml de sangre, de los 10ml extraídos totales. La obtención de esta muestra fue a través de una punción venosa única, se almacenaron en un tubo heparinizado, para luego ser procesados en el mismo laboratorio clínico donde se tomaron las muestras. Para esta determinación, se

deben requiere de los valores de Glicemia basal (ayuno) e Insulinemia basal (ayuno) y aplicar la fórmula de HOMA-IR, expuesta en la Tabla 1.

11.2.6.3.- Determinación de Parámetros REDOX

Para realizar este procedimiento, se utilizaron los 9 ml de sangre remanente contenida tubos heparinizados. Estos fueron entregados al investigador y fueron transportados en cadena de frío, desde el laboratorio clínico al Laboratorio de Bioensayos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso.

11.2.6.3.1.- Preparación de las muestras.

En el Laboratorio de Bioensayos, las muestras sanguíneas se sometieron a un proceso de centrifugación durante 15 minutos a 3000 r.p.m., una vez finalizado este proceso se obtuvieron tres fases en la muestra: plasma, glóbulos blancos (GB) y glóbulos rojos (GR). La fase superior (plasma), se almacenó en 2 tubos Eppendorf de 1,5 ml cada uno a -20°C para la prueba TRAP y la determinación de proteínas totales. El plasma remanente y los GB, se eliminaron según protocolo de bioseguridad para muestras humanas. Posteriormente para extraer las trazas de plasma y GB, se administró a cada muestra un buffer de lavado fosfato salino (NaCl 0,15M, Na₂HPO₄ 0,01M, NaH₂PO₄ 0,1M) a pH: 7,4, para luego ser sometidas a un nuevo proceso de centrifugación durante 15 minutos a 3000 r.p.m; este procedimiento se realizó por triplicado, desechando en cada oportunidad el sobrenadante.

Una vez obtenidos los GR limpios, estos se hemolizaron con una solución hipotónica y se almacenaron a -20°C en 2 tubos Eppendorf para las pruebas: carbonilo, actividad de SOD y de CAT, a las siguientes concentraciones:

- a) Carbonilo: GR más solución hipotónica en relación 1:100.
- b) SOD: GR más solución hipotónica en relación 1:28.
- c) CAT: GR más solución hipotónica en relación 1:100.

Finalmente, se extrajeron 2 ml de GR en dos tubos Eppendorf para realizar la prueba TBARS de inmediato.

11.2.6.3.2.- Determinación de proteínas totales.

Para realizar la determinación de concentración de proteínas carbonilo, actividad enzimática de SOD y actividad enzimática de CAT, se estableció previamente la concentración de PT mediante el método de Lowry (1951) que mide la reacción de los residuos de tirosina con el reactivo Folin-Ciocalteu.

Para iniciar la lectura de las muestras se realizó en primera instancia una muestra blanco con 1ml de agua destilada, 1 ml de RCA y 4 ml de reactivo Folin. Posteriormente, en un tubo de ensayo se agregó 1 mL de la muestra sanguínea, 1 ml de RCA y 4 ml de la mezcla folin, la cual fue incubada a 55°C en un baño termostático durante 5 minutos. Finalmente, los datos se obtuvieron espectrofotométricamente a 650nm utilizando celdas de vidrio, por triplicado. Los datos de absorbancia obtenidos fueron exportados a una base de datos del laboratorio para estimar las proteínas totales de la muestra.

11.2.6.3.3.- Defensa antioxidante enzimática.

Como una forma de evaluar la capacidad antioxidante endógena se realizaron los ensayos para determinar actividad de las enzimas SOD y CAT.

11.2.6.3.3.1- Actividad de Superóxido Dismutasa (SOD)

Este análisis se realizó según lo descrito por Fridovich (1995). Para esta lectura se preparó una solución "A", compuesta de xantina 0,5 mM y citocromo C 20 μ M en una relación 1:11 disueltos en un PBS (EDTA 0,1 mM, Na_2HPO_4 50 mM y NaH_2PO_4 50 mM) ajustado a pH=7,8 la cual se debió mantener a una temperatura constante de 37°C en un baño termorregulado; y una solución "B" compuesta por 25 μ L de Xantina Oxidasa (XO) y 1 ml de EDTA 0,1 mM en una relación 1:40 la que se debió mantener en hielo. La actividad enzimática se detectó a 550 nm durante dos minutos con mediciones cada 15 segundos; para iniciar la lectura se realizó inicialmente un blanco en celda de vidrio con 3 ml de solución "A" y la medición de las muestras se realizó con una mezcla de 2,9 ml de solución "A", 50 μ L de solución "B" y 50 μ L de muestra de eritrocitos con la dilución para SOD. Los resultados se expresaron como unidades de enzima/mg proteína usando la determinación de proteínas totales obtenidas mediante el método de Lowry(1951).

11.2.6.3.3.2.- Actividad de Catalasa (CAT)

Este análisis se realizó como esta descrito en Aebi (1984).

En la muestra CAT guardada previamente, se midió espectrofotométricamente en celdas de cuarzo mediante una cinética de degradación de H_2O_2 , la pérdida de la absorbancia a 240 nm.

Para este protocolo, inicialmente se preparó un PBS (Na_2HPO_4 50mM y NaH_2PO_4 50 nM) ajustado a un pH: 7,0 y luego H_2O_2 a 0,3 M.

Previo a la lectura de las muestras, se hizo un blanco con 3 ml de Buffer, mientras que para las muestras se realizó una mezcla de 2,9 ml de PBS, 100 μ L de H_2O_2 y 5 μ L de muestra de eritrocitos con la dilución para CAT. Las lecturas fueron realizadas durante un periodo de 90 segundos con mediciones cada 30 segundos, por triplicado. Una vez obtenidas las lecturas, éstas se graficaron y se obtuvo la constante de velocidad según la ecuación de Monod.

Una vez obtenida la constante, ésta se comparó con la base de datos para estimar la cantidad de enzima, posteriormente se dividió por la cantidad de proteínas totales de cada individuo. Los resultados se expresaron como unidades de enzima/mg proteína usando la determinación de proteínas totales obtenidas mediante el método de Lowry.

11.2.6.3.4.- Defensa antioxidante no enzimática.

Para evaluar la capacidad antioxidante no enzimática presente en el plasma de los sujetos se realizó una estimación de la capacidad antioxidante la cual se expresa en TEAC (Trolox enzymatic activity equivalent), según el protocolo TRAP

descrito por Romay et al.(1996), el cual compara la actividad antioxidante con la actividad de Trolox, un antioxidante mimético a la Vitamina E. En este método se midió la pérdida de absorbancia del cromóforo verde azulado ABTS. + (2,2-azino-bis(3-ethylbenz- thiazoline-6-sulfonic acid)) al reaccionar con los agentes antioxidantes de la muestra.

Se realizó una mezcla 1:1 de ABTS (0,150 µM) con ABAP (10 mM) la cual fue incubada durante 30 minutos en un baño termostático a 45°C para su reacción, la cual fue agitada cada 10 minutos. Ésta mezcla se denomina “Solución A”. Pasado los 10 min, se debe enfriar bajo agua para detener la reacción.

Se mezclaron 990 µL del buffer PBS (NaCl 0,005 M, Na₂HPO₄ 0,01M, Na₂H₂PO₄ 0,01M ajustado a pH 7,4) con 10 µL de plasma sanguíneo almacenados previamente en tubos Eppendorf. A esta mezcla se le denomina muestra TRAP.

Finalmente se mezcló 1ml de Solución A, con 10 µL de muestra TRAP.

La mezcla resultante fue leída, en celdas de vidrio, por triplicado, en una cinética de espectrofotométrica a 734 nm durante 50 segundos con mediciones cada 10 segundos. Sin embargo, para iniciar la lectura de las muestras debió realizarse previamente la lectura de un blanco de 1ml ABTS. La absorbancia final de las muestras se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Absorbancia final} = \frac{\text{Absorbancia } 50'' - \text{Absorbancia } 10''}{\text{Absorbancia } 30''}$$

Cabe destacar que estimación de la capacidad antioxidante total, se expresa en TEAC (Trolox enzymatic activity equivalent).

11.2.6.3.5.- Daño Oxidativo

Para determinar el nivel de daño oxidativo en las muestras, se realizó el ensayo de TBARS para determinar daño a lípidos y el ensayo de Carbonilos para determinar daño a proteínas.

11.2.6.3.5.1.- TBARS

El ensayo TBARS descrito por Esterbauer y cols. (1982), evalúa la reacción del TBA (Ácido Tiobarbitúrico) con un producto final de lipoperoxidación: el MDA.

En un tubo de ensayo cónico, se mezclaron 2 ml del lisado de GR con 2 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 30% P/V, y se centrifugó por 15 minutos a 3000 r.p.m.; del cual se obtuvo un pellet (precipitado de proteínas) y sobrenadante, del cual se extrajo 1,5 ml.

En un tubo de ensayo de 20 ml, se agregaron el sobrenadante extraído más 1 ml de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0,67% P/V luego, esta solución fue llevada a ebullición en una placa calefactora por 20 minutos, y finalmente se enfrió bajo agua fría.

Para la lectura de las muestras se realizó un barrido espectrofotométrico entre 400-600 nm con el fin de determinar el peak de MDA a los 535 nm aproximadamente.

Posteriormente, se realizó la medición de un blanco con agua destilada en celdas de vidrio, para después continuar con la medición de las muestras, por triplicado.

Finalmente se analizó y se comparó la absorbancia con la base de datos previamente obtenidos para calcular la concentración final de MDA de cada muestra.

11.2.6.3.4.2.- Carbonilos

Este análisis se realizó como esta descrito en Levine y cols. (1990) con la muestra carbonilo guardada previamente. Este método está basado en la reacción de los grupos carbonilo generado por la oxidación de proteínas con 2,4 dinitrofenilhidracina (DNPH).

En 4 tubos Eppendorf se mezclan 100 μ L de muestra de eritrocitos más 300 μ L de TCA al 20% P/V, de los cuales tres serán para muestra y uno control. Esta solución fue mezclada en vórtex y dejada en hielo por 5 minutos, luego se centrifugó por 3 minutos a 11000 r.p.m., resultando un pellet y sobrenadante, este último fue eliminado.

En los tubos de muestra se agregan 500 μ L de DNPH 0,3% en HCl 2M, mientras que en el tubo control se agregó 500 μ L de HCl 2M; los cuales fueron mezclados en vórtex y almacenados en oscuridad durante una hora a temperatura ambiente, mezclando en vórtex cada 15 minutos.

Pasada la hora se agregó a cada tubo 500 μ L de TCA al 20% P/V, luego la mezcla fue agitada en vórtex, dejada en hielo por 5 minutos y posteriormente centrifugada durante 3 minutos a 11000 r.p.m., resultando un pellet y sobrenadante, este último fue eliminado.

El pellet fue resuspendido en 1 ml de etanol:acetato de etilo (1:1), agitado y posteriormente dejado en reposo durante 10 minutos. Pasado el tiempo, se centrifugó durante 3 minutos a 11000 r.p.m., y eliminado el sobrenadante. Este procedimiento se repitió 3 veces. Tras los pasos anteriores, el precipitado fue secado bajo campana.

Finalmente, se resuspendió y mezcló el precipitado en 600µL de urea 6M disuelta en buffer, la cual se dejó en incubación durante 15 minutos en un baño termorregulado a 37°C.

El producto de la reacción fue leído en espectrofotómetro a 370 nm, en celdas de cuarzo por triplicado; la absorbancia fue obtenida por la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de Carbonilo (moles)} = \frac{\text{Absorbancia}}{1 \times 22.000}$$

Siendo:

1: grosor de la celda.

22.000: factor para proteínas carboniladas

11.3.- Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo de las variables analizadas, reportando los datos promedio, su desviación estándar y error estándar. Para el análisis analítico se utilizó el software Statistica 10.0. Los datos fueron sometidos a una prueba de distribución paramétrica Shapiro-wilk. En el caso de los datos que presentaron una distribución paramétrica, se realizó análisis ANOVA de una vía.

En el caso de los datos que presentaron una distribución no paramétrica, se realizó el test de Mann-Wittney ya que los datos eran de muestras independientes.

Para establecer nivel de asociación entre HOMA-IR y las variables REDOX, se utilizó el Coeficiente de correlación de Spearman (R) por ser las variables no paramétricas.

Se considera un grado de correlación aceptable un R superior a 0,5 (correlación positiva) o inferior a -0,5 (correlación negativa).

En cualquiera de los análisis se consideró una diferencia estadísticamente significativa si el valor $p < 0,05$. (Zar, 1999)

12.- RESULTADOS

Posterior a la selección de sujetos basándose en los criterios de inclusión y exclusión antes descritos, la muestra total corresponde a 12 adultos distribuidos en dos grupos: Grupo Control (n=6) y Grupo Insulinorresistente (n=6). La caracterización de ambos grupos se detalla en la Tabla 6.

Las muestras sanguíneas de ambos grupos (GIR y GC) fueron sometidas a evaluación de glicemia basal e insulinemia basal, para determinar presencia de IR, además de determinación de parámetros REDOX.

12.1. Insulinorresistencia.

Para determinar el nivel de Insulinorresistencia de los sujetos muestrales, dado que no eran diabéticos, se utilizó el indicador HOMA (Homeostatic Model Assessment) (Matthews y cols., 1985). Del total de voluntarios (30), presentaron IR 6 de ellos, los que conformaron el Grupo experimental (GIR), mientras que los 24 restantes no presentaron dicha condición. De este último grupo, se seleccionaron aleatoriamente 6 de ellos, los que constituyeron el Grupo Control (GC), evidenciándose diferencias estadísticamente significativas entre indicador HOMA del GIR y del GC ($p=0,002165$).

Tabla N° 7. Resultados de la evaluación de Insulinorresistencia.

	GLICEMIA (Media \pm EE)	INSULINA (Media \pm EE)	HOMA (Media \pm EE)	HOMA p- value
GC	98,33 \pm 3,99	6,07 \pm 0,2	1,47 \pm 0,08	0,002165*
GIR	100,67 \pm 4,9	14,48 \pm 2,16	3,52 \pm 0,43	

Grupo Control (GC), Grupo Insulinorresistente (GIR), Error Estándar (EE) y Significancia estadística ($p<0,05$).

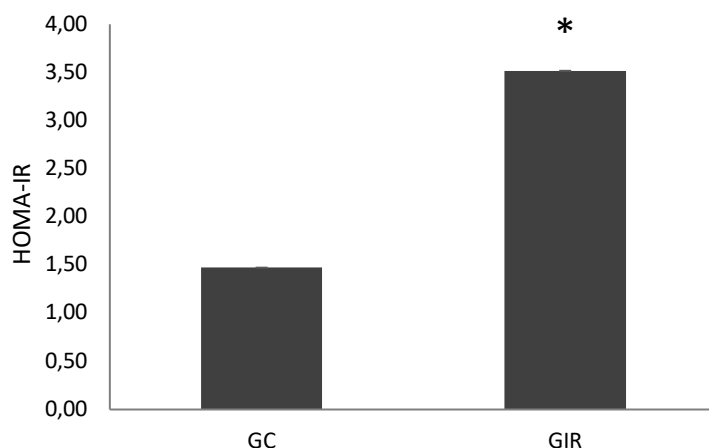


Figura N° 8. Diferencias de HOMA-IR entre GC y GIR.
(GC: Grupo Control; GIR: Grupo Insulinorresistente)

12.2.- Perfil REDOX

12.2.1.-Actividad Antioxidante

12.2.1.1 Enzimática.

12.2.1.1.1.- Actividad de SOD

La actividad de la enzima SOD, no presentó diferencias estadísticamente significativas entre los GIR y GC ($p= 0,521$).

Tabla N° 8. Resultados de Actividad de SOD

	ACTIVIDAD DE SOD (UEnz/mg proteína) (Media \pm EE)	p- value
GC	0,000600689 \pm 6,9856E-06	0,521
GIR	0,000592375 \pm 6,33984E-06	

Grupo Control(GC), Grupo Insulinorresistente(GIR), Error Estándar (EE) y Significancia estadística ($p<0,05$).

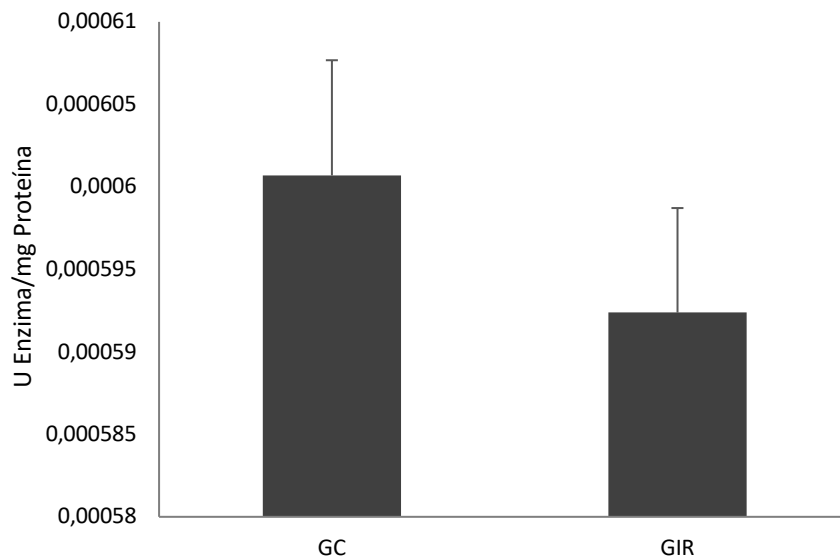


Figura N°9. Diferencias de Actividad de SOD entre GC y GIR. (GC: Grupo Control; GIR: Grupo Insulinorresistente)

12.2.1.1.2.- Actividad de CAT

En relación a la enzima CAT, se observan diferencias estadísticamente significativas ($p=0,0435$) entre GIR y GC, evidenciándose una mayor actividad de CAT en el GIR que en el GC.

Tabla N° 9. Resultados de Actividad de Catalasa.

	ACTIVIDAD CATALASA (UEnz/mg proteína) (Media \pm EE)	p- value
GC	0,000243849 \pm 1,7856E-05	0,0435*
GIR	0,000285225 \pm 1,07551E-05	

Grupo Control(GC), Grupo Insulinorresistente(GIR), Error Estándar (EE) y

Significancia estadística ($p < 0,05$).

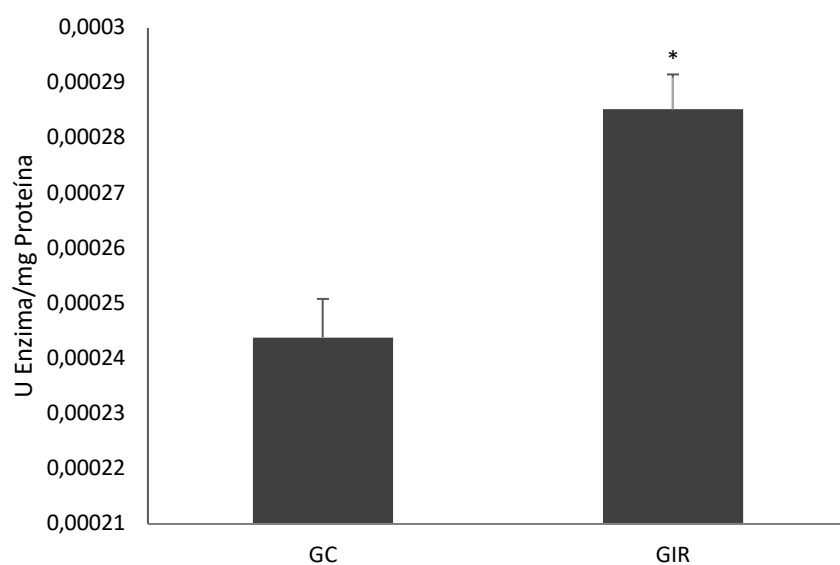


Figura N°10. Diferencias de Actividad de Catalasa entre GC y GIR. (GC: Grupo Control; GIR: Grupo Insulinorresistente)

12.2.1.2.- No Enzimática

12.2.1.2.1.- Capacidad Antioxidante Total (TRAP).

La Capacidad Antioxidante Total del plasma, no mostró diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,0684$) entre el GIR y el GC.

Tabla N° 10. Resultados de Capacidad Antioxidante Total.

	CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL (TEAC mM) (Media \pm EE)	p- value
GC	0,313674868 \pm 0,011296206	0,0684
GIR	0,28799173 \pm 0,007661326	

Grupo Control(GC), Grupo Insulinorresistente(GIR), Error Estándar (EE) y Significancia estadística ($p < 0,05$).

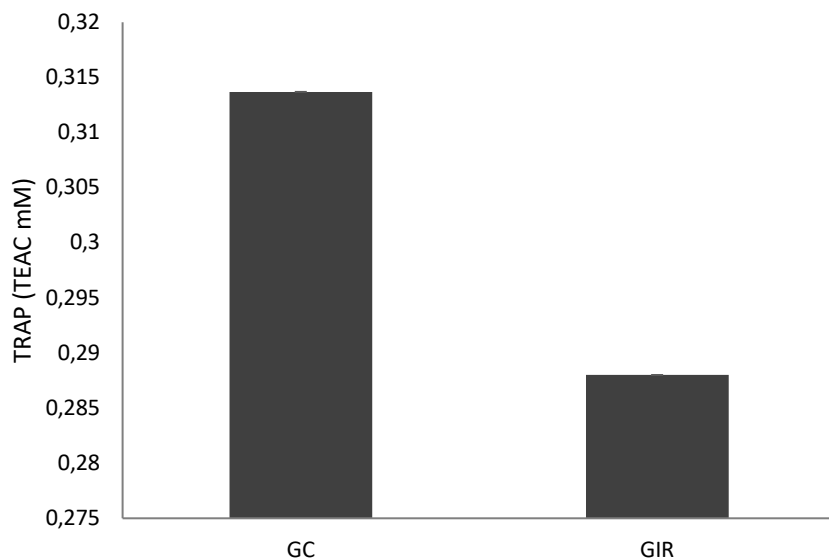


Figura N°11. Diferencias de Capacidad Antioxidante Total entre GC y GIR. (GC: Grupo Control; GIR: Grupo Insulinorresistente)

12.2.2.- Biomarcadores de Daño Oxidativo.

12.2.2.1.- Lipoperoxidación: MDA

Para la determinación del daño mediado por lipoperoxidación, se utilizó la prueba TBARS, la cual permite medir la concentración de MDA. Las concentraciones de MDA en el GIR fueron mayores que en el GC, pero esta diferencia no es estadísticamente significativa ($p=0,1135$).

Tabla N° 11. Resultados de Niveles de Lipoperoxidación.

	LIPOPEROXIDACION (nM MDA/ml) (Media \pm EE)	p- value
GC	1,160207296 \pm 0,110789482	0,1135
GIR	1,381147993 \pm 0,105847385	

Grupo Control(GC), Grupo Insulinorresistente(GIR), Error Estándar (EE) y Significancia estadística ($p<0,05$).

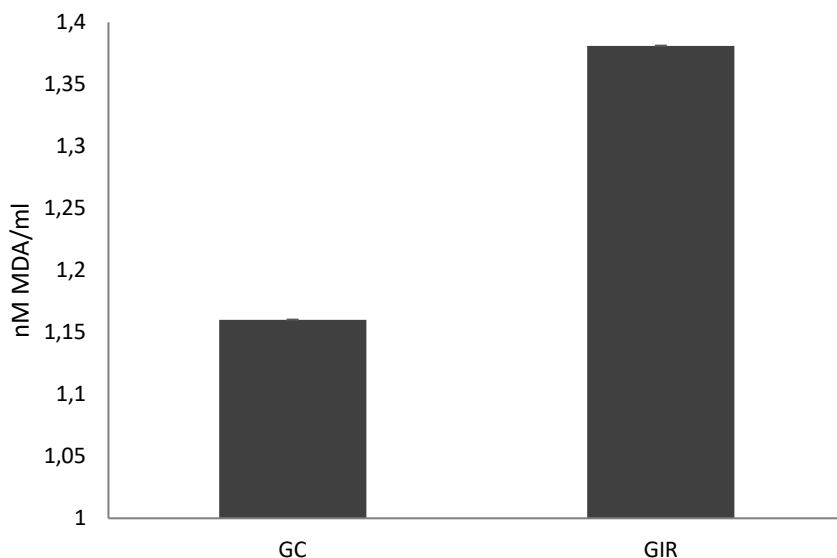


Figura N°12. Diferencias de Lipoperoxidación entre GC y GIR.
(GC: Grupo Control; GIR: Grupo Insulinorresistente)

12.2.2.2.- Oxidación de Proteínas: Carbonilo

La determinación del daño mediado por oxidación de proteínas se realizó mediante la cuantificación de la concentración de proteínas carboniladas. La concentración de éstas en el GIR fue menor que en el GC, no siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p=0,742$).

Tabla N° 12. Resultados de Niveles de Oxidación de Proteínas.

	OXIDACION PROTEINAS (carbonilo/mg proteína) (Media \pm EE)	p- value
GC	0,21449096 \pm 0,069044644	0,742
GIR	0,113990573 \pm 0,041705785	

Grupo Control(GC), Grupo Insulinorresistente(GIR), Error Estándar (EE) y Significancia estadística ($p<0,05$).

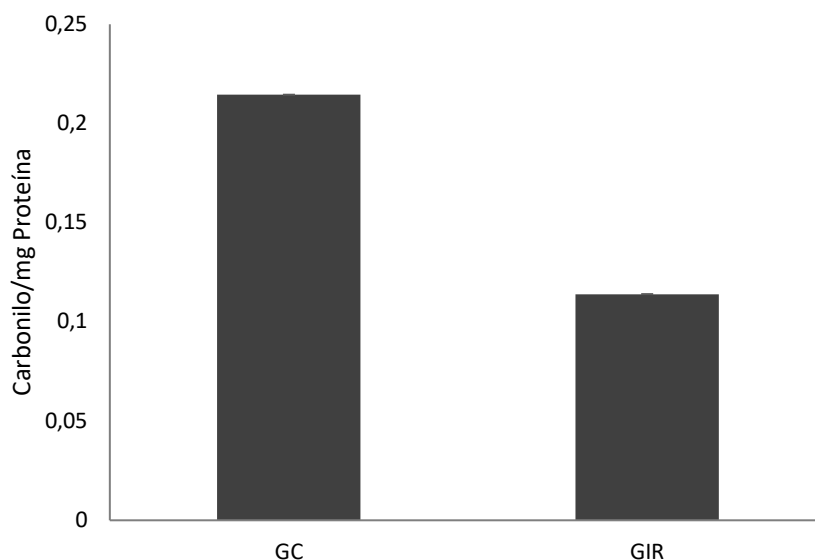


Figura N°13.- Diferencias de Oxidación de Proteínas entre GC y GIR.
(GC: Grupo Control; GIR: Grupo Insulinorresistente)

12.3.- Análisis Correlacional

Se realizó un análisis estadístico con el fin de establecer si existía correlación entre las variables y el Índice HOMA-IR, no encontrándose valores de correlación estadísticamente significativos ($p < 0,05$) para todos los análisis y un valor $R > 0,5$ ó $R < -0,5$, según corresponda.

Tabla N° 13. Resultados análisis correlacional

	Actividad de SOD (U Enz/mg Proteína)	Actividad de Catalasa (U Enz/mg Proteína)	Capacidad Antioxidante Total (TEAC mM)	Lipoperoxidación (nM MDA/ml)	Oxidación de Proteínas (Carbonilo/mg Proteína)
HOMA- IR	R = 0,1748 p- value = 0,586	R = -0,37762 p- value = 0,2262	R = 0,2727 p- value = 0,391	R = 0,433566 p- value = 0,1591	R = -0,18083 p- value = 0,56469

13.- DISCUSIÓN.

La diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) es un problema de salud pública que tiene alto impacto a nivel mundial y nuestro país no es la excepción. La última Encuesta Nacional de Salud (2016-2017), muestra un marcado aumento de la sospecha de DMT2 a nivel país, subiendo de un 4,2% en 2003, a un 9% en 2010 y a un 12,3% en 2017. Este mismo informe, demuestra además que el principal grupo etario de incremento en la sospecha de DMT2, fue precisamente el de adultos mayores, subiendo de un 25,7% en el año 2010 a un 30,6% en 2017 (MINSAL, 2017).

Este incremento progresivo de esta patología, se explica precisamente por la multifactorialidad de elementos que participan en la etiopatogenia de la DMT2, siendo la obesidad, el más importante predictor de ella (Ikemura y cols., 2010).

En términos fisiopatológicos, existen dos fenómenos que recorren la patogenia de la DMT2, incluso años antes que la enfermedad se establezca. Estos son: la disfunción de las células β del páncreas y la resistencia a la acción de la insulina (insulinorresistencia) por parte de los tejidos periféricos (Brownlee, M., 2001).

En esta última alteración, se ha descrito el rol del Estrés Oxidativo (EO) como agente causal de la disfunción en la captación de glucosa por alteración en la señalización de la insulina, así como también se considera al EO como consecuencia de un estatus permanente de IR (Mootha y cols., 2003).

El presente estudio, evaluó parámetros de defensa antioxidante y biomarcadores de daño oxidativo, en sujetos adultos mayores de ambos sexos no insulinorresistentes

y en adultos mayores con insulinoresistencia no diabéticos, ambos grupos con patologías crónicas controladas.

Los sujetos de ambos grupos (GC y GIR) presentaron similitudes en sus características generales, tales como edad, distribución por género, y talla (Tabla 6). No obstante, por ser la IR, consecuencia de una alteración metabólica sistémica, existieron diferencias importantes en el peso corporal y por consiguiente, diferencias también en el IMC (GC= 27,47 y GIR=31,38), constituyéndose el GC por sujetos con sobrepeso y el GIR por sujetos con Obesidad en estadio 1 (Nuttall, 2015).

La Insulinoresistencia, valorada a través del indicador HOMA-IR, muestra diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. El GC no presentó IR, mientras que el GIR demostró un valor de HOMA-IR que indica presencia de resistencia a la acción de la insulina en este grupo (Matthews y cols., 1985).

Cabe destacar que el indicador HOMA-IR, relaciona la glicemia basal con la concentración plasmática de insulina basal (insulinemia) (Wallace y cols., 2004). La diferencia en HOMA-IR entre ambos grupos se explica principalmente por la marcada hiperinsulinemia presente en el GIR y no por hiperglicemia, puesto que ambos grupos presentan concentraciones de glucosa plasmática similares (GC= 98,33 mg/dl y GIR=100,67 mg/dl). En otras palabras, los sujetos del GIR logran mantener la glicemia basal en niveles normales, gracias a un exceso de producción de insulina, lo cual conlleva a largo plazo a una disfunción de las células β pancreáticas, típicamente descrita en la DMT2 (Hollenbeck y cols., 1987).

Lo anteriormente descrito, evidencia que los sujetos del GIR se encuentran en la primera etapa de la patogenia de DMT2, la cual se denomina hiperinsulinismo, pudiendo mantenerse durante años, hasta pasar a la segunda etapa denominada intolerancia a la glucosa y aún más tiempo para constituir una DMT2 propiamente tal (Weir y cols., 2004).

En lo concerniente a los parámetros REDOX, se evaluó la actividad de las enzimas antioxidantes: Superóxido Dismutasa (SOD) y Catalasa (CAT).

En el presente estudio, los niveles de actividad de SOD entre los grupos control e insulinoresistente, no presentaron diferencias. Numerosos estudios relacionados con estas dos variables, han reportado cuantiosa evidencia respecto a la actividad de esta enzima, incluso en sujetos humanos normales, no existiendo a la fecha rangos de normalidad (Brownlee, 2001; Ziegler y cols., 2004; Kimura y cols., 2003). Además de lo anterior, hay que considerar el proceso de envejecimiento fisiológico. Andersen y cols. (1997), en una muestra de 220 humanos de ambos sexos, de edades entre 18 y 89 años, evidenciaron la disminución en la actividad de SOD con la edad tanto en plasma como en GR. Este hecho tiene múltiples hipótesis en la literatura. Una de ellas sería la mayor producción de ERO por disfunción mitocondrial en el envejecimiento, puesto que existiría un desacoplamiento de la cadena transportadora de electrones (especialmente en complejos I y IV), con el subsecuente aumento excesivo de $O_2^{\cdot-}$, el cual oxidaría SOD, inactivándola. Otra hipótesis es la disminución de la expresión de antioxidantes con el envejecimiento, hecho que estaría determinado genéticamente (como la expresión del factor transcripcional

NRF-2), además de factores epigenéticos de daño que se “acumularían” con la edad, disminuyendo aun más la expresión y actividad de enzimas antioxidantes.

De la actividad de SOD en sujetos con DMT2, en cambio, la evidencia no es concluyente. Maritim y cols. (2003) realizaron una revisión sistemática, incluyendo diferentes tejidos tales como riñón, hígado, corazón, cerebro, páncreas, retina, cristalino, plasma y eritrocitos. La conclusión a la que llegaron, es que la información es errática y no permite discernir un patrón basado en género, especie, duración de la DMT2 o tejido estudiado.

No obstante, en sujetos no diabéticos con IR, el cuerpo de evidencia es menor, pero indica que, en estos sujetos, la actividad de SOD no presentaría diferencias con los sujetos no diabéticos sin IR a largo plazo (Menon y cols. 2011).

Esto podría deberse a que en la etapa de Hiperinsulinemia en la que se encuentran los sujetos del GIR, se presenta IR, pero no existe hiperglicemia basal, siendo esta última la principal responsable de la disfunción mitocondrial (Saltiel y cols., 2001) y por tanto de la excesiva producción de anión radical superóxido, el cual es el sustrato de la enzima SOD (Rains y cols. 2011). Lo anterior podría ser una aproximación para explicar la no diferencia en la actividad de SOD entre los grupos del presente estudio, ya que ningún grupo (GC y GIR) presentaban hiperglicemia basal.

La actividad de CAT, en cambio, fue mayor en GIR que en el GC, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. La evidencia disponible en modelos en eritrocitos humanos, indica que no existiría variación en la actividad de CAT con el envejecimiento (Andersen y cols. 1997). Rizvi y cols. (2007), en cambio, en un

estudio con un modelo en plasma humano con una muestra de 80 sujetos de ambos sexos entre 18 y 85 años, muestran aumento de actividad de CAT con la edad.

Según Andersen y cols. (1997), esta divergencia mostrada en la literatura obedecería a que los métodos utilizados para medir CAT (Aebi, 1984), son menos sensibles a pequeñas variaciones en las concentraciones de reactivos.

En caso de estudios que relacionan la actividad de CAT con DMT2 (hiperglicemia e IR) y otros que relacionan la actividad de dicha enzima sólo con IR (estadios tempranos de DMT2), existen patrones muy diferentes para ambos casos (Eriksson, 2007).

En DMT2 existe una combinación entre Inflamación y EO, la cual se encuentra claramente establecida, explicada principalmente por la presencia de hiperglicemia (Morino y cols., 2006; Frank y cols., 2005). La inflamación y el EO se potencian mutuamente, generando un sistema de retroalimentación positiva que incrementa el daño de manera exponencial (Rains y cols. 2011). En este contexto, existe un notable incremento de mediadores inflamatorios séricos tales como IL-1beta/TNF-alfa e IL-6, las cuales señalizan para los factores transcripcionales NF-kB y AP-1, respectivamente, los cuales inhibirían la captación de glucosa, favoreciendo un medio extracelular glucotóxico, el cual aumenta el EO (Gil y cols. 2006). Por otro lado, en DMT2, existe un aumento en la formación de ERO (anión radical hidroxilo, anión radical superóxido y peróxido de hidrógeno) y de ERN, principalmente ONOO⁻ (Henriksen y cols. 2011). Sumado a lo anterior, los biomarcadores de daño a macromoléculas en DMT2 también aumentan, siendo el MDA (lipoperoxidación), proteínas carbonilo (oxidación de proteínas) y 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (oxidación

de ADN) las que mas sustento presentan (Talior y cols., 2003). Por otra parte, la inflamación crónica y el EO aceleran el proceso de senescencia celular, formando parte del proceso denominado Inflammaging (Giuliani y cols. 2018).

En el caso de los estudios que relacionan la actividad de CAT en sujetos con IR sin DMT2, éstos presentan hiperinsulinemia sin hiperglicemia, por lo cual los efectos deletéreos podrían ser explicados solamente por el primer fenómeno (Turner y cols., 2008). Cabe destacar que, en los sujetos del presente estudio, la hiperinsulinemia que presentaban era de tipo crónica, ya que existe evidencia que muestra disminución de EO, pero en sujetos sometidos a hiperinsulinemia aguda, principalmente por la disminución en la formación de ERO (Kyselova y cols., 2002).

Facchini y cols. (2000), promueve la tesis que sería la hiperinsulinemia presente en los pacientes con IR, uno de los mecanismos principales de envejecimiento independientes de los niveles de glicemia. Dentro de su hipótesis, el principal mecanismo efector de daño, lo constituiría el EO, principalmente por el aumento en las ERO y en menor medida, por el componente inflamatorio, el cual dependería principalmente de la hiperglicemia. Este hecho se fundamenta en que la inflamación propia del envejecimiento (inflammaging), generaría una alteración en la comunicación entre la mitocondria y el peroxisoma, lo cual provocaría un aumento de la producción de ERO además de disminución de la actividad de CAT (Deori, y cols., 2018), contrariamente a lo encontrado en este estudio, en el cual la actividad de CAT aumentó en el GIR, por lo que el mecanismo de aumento de actividad, podría ser la

señalización de insulina sostenida por hiperinsulinemia crónica en IR y no, el inflammaging.

Esta hipótesis además es sustentada por Kenyon y cols. (1993) quienes demostraron que la mutación en el gen DAF-2 en el invertebrado *C- Elegans* (símil del receptor de insulina en humanos), prolonga la vida de éste, retrasando el envejecimiento hasta 2 veces, es decir, que la hiperactividad del receptor de insulina promovería el envejecimiento, con el EO como principal mecanismo de daño. Estos autores indican además, que el exceso en la señalización de insulina provocaría un incremento sostenido de la actividad de AKT, lo cual conduce a inhibición de la actividad del factor transcripcional FoXO-3A quien es el principal responsable de la expresión de CAT y SOD, lo que traería consigo un incremento del EO (Bonnard y cols., 2008). Este estímulo oxidativo, generaría a nivel celular, activación de JUN-K, que hiperfosforilaría a IRS-1, generando mayor resistencia a la acción de insulina, compensándose por tanto, con una mayor liberación pancreática de esta hormona, produciéndose así un sistema de retroalimentación positiva con incremento sostenido en los niveles de EO y de daño a macromoléculas (Jain y cols., 1998).

Complementariamente a lo anterior, Xu y cols (1999), determinaron que la hiperinsulinemia sostenida, incrementaba el EO en el peroxisoma, generando una mayor producción de H₂O₂ y menor expresión e incremento en la degradación de CAT, por lo cual, la actividad de la enzima remanente aumentó. Esto concuerda con lo reportado por Kedziora-Kornatowska y cols. (1998), quienes demostraron un incremento en la actividad de GPx en eritrocitos humanos en sujetos diabéticos. Dado que GPx actúa sobre el mismo sustrato que CAT (H₂O₂), se establecería el hecho de que existiría un incremento sostenido de H₂O₂ en modelos con IR (Yip y cols., 1998).

Puesto que la evidencia indica que existe un incremento en las concentraciones celulares de H_2O_2 en sujetos no diabéticos con IR, surge como probable tratamiento, un incremento en la actividad y/o expresión de CAT. Lee y cols. (2010), demostraron que al inducir IR con H_2O_2 , la sobreexpresión de CAT, disminuyó la disfunción mitocondrial y la resistencia a la insulina en células musculares de rata. Este hallazgo es refrendado por Tiganis (2011), quien sostiene que los principales reguladores celulares en IR, serían las ERO y que CAT, cumpliría un papel central en la patogenia, determinando la sensibilidad a la insulina y la protección de la célula al EO.

Otro aspecto importante de destacar, es la relación entre la obesidad y la IR. En esta investigación se aprecian diferencias entre los IMC de ambos grupos. Mientras el GC está compuesto por sujetos con sobrepeso (IMC= 27,4), el GIR está compuesto por sujetos obesos (IMC= 31,4).

En este sentido es cuantiosa la evidencia que relaciona la obesidad con la IR, llegando incluso a señalar que la obesidad sería uno de los principales factores predictores de IR (Ikemura y cols., 2010). Este autor en un modelo de adipocitos de ratas obesas, reporta una baja concentración de H_2O_2 y una mayor actividad de CAT en relación a adipocitos de ratas no obesas. Este hecho, refrenda lo encontrado en el presente estudio en donde los sujetos del GIR eran obesos y presentaron mayor actividad de CAT.

La capacidad antioxidante total, no presentó diferencias entre los grupos. Esta variable incluye la defensa antioxidante exógena, principalmente la presencia de vitaminas con capacidad antioxidante (A, C y E), además de precursores de glutatión.

La evidencia muestra que en modelos humanos de DMT2, la concentración de GSH no presenta diferencias respecto a controles en plasma sanguíneo (Montilla y cols., 1998), por lo cual se podría inferir que el glutatión estaría determinado principalmente, (no exclusivamente), por fuentes exógenas, como la dieta, dado que en DMT2 la producción de antioxidantes disminuye notoriamente. No obstante lo anterior, cabe señalar que el glutatión es la principal molécula antioxidante en los mamíferos y está compuesta por tres aminoácidos: glutamato, cisteína y glicina. Es producido por prácticamente todos los tipos celulares, siendo las principales, las hepáticas, por lo cual, un adecuado metabolismo hepático es fundamental para su producción sumado al hecho que, una vez oxidado, el glutatión requiere de la enzima Glutatión Reductasa para volver a tener actividad antioxidante, por lo cual de todos modos tiene cierta dependencia de factores endógenos.

De igual modo, los niveles de vitamina E (tocoferol), no tienen un patrón definido en DMT2 en modelos humanos. Mientras algunos estudios muestran incrementos (Asayama y cols., 1994), otros muestran decremento (Cinar y cols, 2001), e incluso otros no muestran cambios respecto a controles (Martinoli y cols, 1993), por lo cual, al igual que el GSH, las concentraciones de tocoferol están determinadas principalmente por la dieta.

En modelos de IR sin DMT2, Kyselova y cols. (2002) no demostraron diferencias en Capacidad antioxidante total ni en concentración de GSH, lo cual indicaría que la hiperinsulinemia de la IR, no sería un factor de disminución en estos indicadores, lo cual coincide con lo encontrado en el presente estudio.

Los sujetos de ambos grupos en esta investigación son activos, puesto que son autovalentes, participan en distintos grupos sociales de su comunidad, realizan actividad física dos veces por semana, sumado al hecho de tener un nivel educacional alto. Estos factores podrían estar determinando un mayor conocimiento en alimentación saludable, tal como lo describe Järvinen y cols.,(1994), en donde muestra que la población con mayor nivel educacional y de ingresos, presentaba dieta rica en alimentos con capacidad antioxidante, siendo mayor que la de la población general. Sin embargo, el tipo de alimentación no fue evaluada en esta investigación. Por otra parte, los sujetos muestrales no presentaban DMT2, sino solamente IR, lo cual, sumado una posible alimentación rica en antioxidantes, podría ser un factor que explique la no diferencia en la capacidad antioxidante total, entre los grupos control (GC) e insulinoresistente (GIR).

En lo referente al daño oxidativo a lípidos, expresado como concentración de MDA, no se encontraron diferencias entre los grupos.

Está descrito ampliamente el daño a membranas en DMT2, y el consiguiente incremento de biomarcadores de lipoperoxidación. Maritim y cols.(1999), en un meta análisis, demuestra que los niveles de MDA en diferentes modelos celulares tanto en animales como humanos (riñón, hígado, corazón, cerebro, pulmón, páncreas, eritrocitos, entre otros) son altos. No obstante, existe mucho menor evidencia en IR sin DMT2, tanto en modelos animales, como humanos. Se ha demostrado en modelos animales que la hiperglicemia crónica estimula la lipoperoxidación, no obstante, la primera, debe ser alta y sostenida en el tiempo (Rains y cols., 2011). Por otro lado, Kyselova y cols. (2002) en un modelo de ratas insulinoresistentes no

diabéticas, generan estados de hiperinsulinemia sostenida de distinta duración y evalúan los niveles del biomarcador MDA en diferentes tiempos (0, 90 y 180 min), no observando diferencias con respecto a las ratas controles (solución salina), sino sólo en los de hiperinsulinemia de larga duración. Esto indicaría que no sólo debiesen existir niveles de insulina altos para generar lipoperoxidación, sino también sostenidos en el tiempo.

Los sujetos de este estudio se encuentran en el primer estadio de la patogenia de la DMT2, denominado hiperinsulinismo (Wright y cols., 2006). No obstante en el segundo período denominado intolerancia a la glucosa, la insulinemia es mayor aún que en la primera etapa, por lo cual la no diferencia entre los niveles de MDA encontrados entre los grupos GIR y GC, podrían atribuirse a este hecho: los pacientes del GIR presentan valores de insulina mayores al GC, pero aún no tan altos como para determinar diferencias significativas en los niveles de oxidación de lípidos entre ellos, es decir, el daño oxidativo a lípidos (principalmente a membranas), no lograría ser tan importante en esta etapa temprana (hiperinsulinismo), no siendo la IR un mecanismo capaz de generar por sí solo ese tipo de daño. (Dresner y cols., 1999; Jain y cols, 1998).

El daño oxidativo a proteínas, cuantificada como proteínas carbonilo, no mostró diferencias entre los GC y el GIR.

Hunt y cols. (1988), describieron que la hiperglicemia en DMT2 generaba glicación (glicosilación no enzimática) de proteínas y su posterior degradación por aumento de ERO. Además describieron que el exceso de proteínas glicadas, modulaba la capacidad de NOS y, por tanto, la posibilidad de generar peroxinitrito (ONOO^-), el

cual es una ERN que se forma a partir de O_2^- y $NO\cdot$. Kaul y cols.(1995) demostraron que esta alteración en las proteínas producida por EO, era irreversible, pues la utilización de antioxidantes no enzimáticos (probuco), no disminuía la concentración de proteínas glicadas. Este hecho es relevante para el presente estudio, puesto que no existieron diferencias de daño oxidativo en proteínas entre los sujetos controles y los insulinoresistentes, lo cual supone que dada la buena capacidad antioxidante de ambos grupos (dieta y enzimas), la no diferencia podría deberse a la escasa generación de carbonilo en los sujetos estudiados. Otra posible explicación de la no diferencia en las proteínas carbonilo, pudiese ser un problema técnico, como podría ser la insensibilidad de la técnica empleada. Además, Dong y cols. (2006) mostraron que la sobreexpresión de CAT en cardiomiocitos de ratas IR, disminuía los niveles de ERO y los biomarcadores de daño a macromoléculas, especialmente a proteínas, lo cual coincide con lo encontrado en este estudio, en donde la mayor actividad de CAT, podría estar impidiendo la oxidación de proteínas, explicando la no diferencia de proteínas carbonilo entre GC y GIR.

Finalmente, se analizó la asociación entre el indicador de insulinoresistencia HOMA-IR y las variables de balance REDOX evaluadas en este estudio, no encontrándose asociación con ninguna de ellas.

Este resultado contrasta con lo expuesto por Meigs y cols. (2007) quienes utilizaron una muestra de 2002 sujetos humanos no diabéticos pertenecientes al estudio de Framingham, y evaluaron como biomarcador la actividad plasmática de mieloperoxidasa y la concentración de 8-Isoprostanos (8-epi-PGF_2), el cual es otro biomarcador de lipoperoxidación, similar a MDA, el cual fue utilizado en este estudio.

Esta investigación arrojó que existía correlación entre HOMA-IR y 8-isoprostanos, pero no con mieloperoxidasa. En la presente investigación la inexistencia de asociación entre las variables REDOX y HOMA-IR, pudo verse afectada principalmente por el tamaño de la muestra, el cual es bajo y que, por tanto, no permite concluir el nivel de asociación entre las variables en estudio. No obstante un aumento de la muestra en investigaciones futuras podría determinar algún grado de asociación entre parámetros REDOX y HOMA-IR, como los mostrados por Korkmaz y cols. (2013) con una muestra de 55 sujetos.

Por encontrarse los sujetos del GIR en la primera etapa de la patogenia de la DMT2, no se encontraron diferencias en el nivel de daño a macromoléculas evaluadas (lípidos y proteínas), el que si está descrito ampliamente en los estadios terminales de esta enfermedad (Henriksen, 2011; Maritim. 1992). Además, como se describió anteriormente, por ser adultos mayores activos con un nivel educacional alto y con una posible dieta alta en antioxidantes, sería menos probable encontrar lipoperoxidación u oxidación de proteínas en ellos.

Es, por este mismo hecho (etapa temprana de DMT2), que la producción de O_2^- puede ser menor y esto determinó que no hubiese diferencias en la actividad de SOD en ambos grupos.

Sin embargo, la actividad de CAT si presentó diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, lo cual indicaría que, en el GIR de la presente investigación, hubo dos factores que determinaron la diferencia en la actividad de la enzima CAT: la hiperinsulinemia y la obesidad. Estos factores que ya fueron descritos ampliamente en la patogenia de la IR, determinarían un status prooxidante en el GIR, causado por EO, el cual podría deberse a la presencia de altos niveles de H_2O_2 , lo

que induciría una mayor actividad de CAT, degradando el peróxido y disminuyendo la formación de carbonilos, evitando así los efectos deletéreos del EO a nivel celular.

Las limitaciones del presente estudio fueron: el tamaño muestral reducido, principalmente por la dificultad en la adherencia al protocolo de la investigación. Además, los voluntarios no conocían su nivel de Insulinorresistencia (particularmente insulinemia), puesto que no está en las prestaciones garantizadas del Ministerio de Salud, por lo cual del total de voluntarios (30), solo 6 de ellos presentaron IR, constituyendo el GIR. Además, no se controlaron algunas variables intervinientes, tales como la ingesta de antioxidantes en la dieta.

Otra limitación fue la no cuantificación de sistema glutatión y de H_2O_2 , además de contar con un grupo control positivo, en este caso, sujetos con DMT2.

Finalmente, la inexistencia de valores referenciales de normalidad para determinaciones REDOX en humanos, la condición de adulto mayor, el control de las patologías crónicas y el tipo de farmacoterapia que utilizan, hace aún más limitado la posibilidad de análisis en esta área, pudiendo solamente comparar entre grupos similares o al mismo sujeto antes y después de algún tipo de intervención.

14. CONCLUSIÓN.

- La IR se asocia a un aumento de la actividad enzimática antioxidante de CAT en los sujetos adultos mayores estudiados.
- La IR no genera cambios de la actividad enzimática antioxidante de SOD en los sujetos adultos mayores estudiados.
- La IR no produce cambios en la capacidad antioxidante total, así como tampoco en los niveles de oxidación de lípidos y proteínas en adultos mayores estudiados.
- No se demuestra grado de asociación entre IR y las variables de defensa antioxidante enzimática, capacidad antioxidante total y biomarcadores de daño oxidativo a lípidos y proteínas en los sujetos estudiados.

Para el desarrollo de investigaciones futuras en este campo, se debe considerar las limitaciones antes declaradas, en especial, un mayor tamaño muestral, la consideración de otros parámetros REDOX, la presencia de un control positivo con DMT2, además de una intervención, como un protocolo de ejercicio, dieta o suplemento que permita determinar cambios en los parámetros REDOX e IR.

Finalmente, los resultados obtenidos en el presente estudio podrían aportar información adicional para establecer nuevos diseños metodológicos en el desarrollo de la investigación aplicada, para establecer la relación entre las alteraciones metabólicas sistémicas, el envejecimiento y el Estrés Oxidativo.

15.- BIBLIOGRAFÍA.

Adjimani, J. P., & Asare, P. (2015). Antioxidant and free radical scavenging activity of iron chelators. *Toxicology reports*, 2, 721-728.

Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Method Enzymol* 105:121–126.

Aguirre, V. Uchida T, Yenush L, Davis R, White MF. (2000). The c-jun NH2-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser₃₀₇. *J Biol Chem* 275: 9047– 9054.

Andersen, H, Nielsen, J, Nielsen, F, Grandjean, P. (1997). Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes. *Clinical Chemistry* 43:4562–568.

Arango Rincón, J. C., Gámez Díaz, L. Y., & López Quintero, J. Á. (2010). NADPH oxidase system: new challenges and perspectives. *Iatreia*, 23(4), 362-372.

Asayama K, Nakane T, Uchida N, Hayashibe H, Dobashi K, Nakazawa S. (1994). Serum antioxidant status in streptozotocin-induced diabetic rat. *Horm Metab Res*;26(7):313–315.

Bergman R., Arder, M. (2000). Free fatty acids and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Trends Endocrinol Metab*. 11(9):351–356.

Bonnard, C. A. D.; Peyrol, S.; Chanseaux, E.; Chauvin, M. A.; Morio, B.; Vidal, H.; Rieusset, J. (2008). Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice. *J. Clin. Invest*. 118:789–800.

Brownlee, M. (2001) “Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications,” *Nature*, vol. 414, no. 6865, pp. 813– 820.

Cefalu, W. (2017). Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care*. 40, S11-S24.

Cinar MG, Ulker S, Alper G, Evinc A. (2001). Effect of dietary vitamin E supplementation on vascular reactivity of thoracic aorta in streptozotocin-diabetic rats. *Pharmacology*;62(1):56–64.

Clavien PA. (1997). IL-6, a key cytokine in liver regeneration. *Hepatology*. 25(5):1294–1296.

Cohen, P. (1996). Dissection of protein kinase cascades that mediate cellular response to cytokines and cellular stress. *Adv Pharmacol* 36: 15–27.

Contreras, C., González-García, I., Martínez-Sánchez N, Seoane-Collazo P, Jacas J, Morgan DA, Serra D, Gallego R, Gonzalez F, Casals N, Nogueiras R, Rahmouni K, Diéguez C, López M. (2014). Central ceramide-induced hypothalamic lipotoxicity and ER stress regulate energy balance. *Cell Reports*, vol. 9, no. 1, pp. 366–377.

Davydov D. (2001). Microsomal monooxygenase in apoptosis: another target for cytochrome c signaling?. *Trends Biochem. Sci.*26:155-60.

Dedoussis G., Kaliora, A, Panagiotakos, D. (2007). Genes, diet and type 2 diabetes mellitus: a review. *Rev Diabet Stud*; 4: 13-24, 2007.

De Fronzo, R., Ferrannini E. (1991). Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* 14; 173–194.

Deori, N, Kale, A, Maurya, P, Nagotu, S. (2018). Peroxisomes: role in cellular ageing and age related disorders. *Biogerontology*. Volume 19; pp 303–324.

Dong, F., Fang CX, Yang X, Zhang X, Lopez FL, Ren J. (2006). Cardiac overexpression of catalase rescues cardiac contractile dysfunction induced by insulin resistance: Role of oxidative stress, protein carbonyl formation and insulin sensitivity. *Diabetologia* 49(6):1421-33.

Dresner, A.; Laurent, D.; Marcucci, M.; Griffin, M. E.; Dufour, S.; Cline, G. W.; Slezak, L. A.; Andersen, D. K.; Hundal, R. S.; Rothman, D. L.; Falk Petersen, K.; Shulman, G. I. (1999). Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J. Clin. Invest.* 103:253–259.

Dröge, W. (2003). Oxidative Stress and Aging. *Hypoxia*, 191–200.

Eriksson, J. W. (2007). Metabolic stress in insulin's target cells leads to ROS accumulation —a hypothetical common pathway causing insulin resistance. *FEBS Lett.* 581: 3734–3742.

Espinoza, S. E., Guo, H., Fedarko, N., DeZern, A., Fried, L. P., Xue, Q. L. y Walston, J. D. (2008). Glutathione peroxidase enzyme activity in aging. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 63(5), 505-509.

Esterbauer, KH., Cheeseman, MU., Dianzani, G., Slater, TF. (1982), Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by ADP-Fe²⁺ in rat liver microsomes. *Biochem J*, 208(1), 129–140.

Evans, J, Maddux, B, Goldfine, I. (2005). The Molecular Basis for Oxidative Stress - Induced Insulin Resistance. *Antioxidant and redox signaling*. Volume 7, Numbers 7- 8.

Facchini, F., Nancy, S., Hua, W., Reaven, G., Stoohs, R. (2000). Hyperinsulinemia: the missing link among oxidative stress and age-related diseases? *Free radical biology & medicine*, vol. 29, no. 12, pp. 1302–1306.

Frank, G. D.; Eguchi, S.; Motley, E. D. (2005). The role of reactive oxygen species in insulin signaling in the vasculature. *Antioxid. Redox Signaling* 7:1053–1061.

Fridovich, I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 64:97–112.

Gao Z., Hwang D, Bataille F, Lefevre M, York D, Quon MJ, Ye J. (2002). Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor kappa B kinase complex. *J Biol Chem*. 277(50):48115–48121.

García-Fuentes, E., Garrido-Sánchez, L., Tinahones, F. (2008). Homeostatic Model Assessment (HOMA). *Aplicaciones prácticas. Av Diabetol*. 24(4): 291-295.

Gil, L., Siems, W, Mazurek, B, Gross, J., Schroeder, P, Voss, P, Grune, T. (2006). Age-associated analysis of oxidative stress parameters in human plasma and erythrocytes. *Free radical research*, 40(5): 495–505.

Giuliani, C, Franceschi C, Parini P, Santoro A. (2018). Inflammaging: a new immune-metabolic viewpoint for age-related diseases. *Nature*; 14(10):576-590.

Gobierno de Chile, Ministerio de Salud. (2010). Estrategia Nacional de Salud. Para el cumplimiento de los Objetivos Sanitarios de la Década 2011-2020.

Gobierno de Chile, Ministerio de Salud. (2003). Resultados I Encuesta de Salud, Chile.

Gobierno de Chile, Ministerio de Salud. (2010). Resultados. Guía Clínica Diabetes Mellitus Tipo 2. Series Guías Clínicas MINSAL.

Gobierno de Chile, Ministerio de Salud. (2017). Resultados Encuesta de Salud, Chile. 2016-2017.

Greene, M. (2003). Modulation of insulin-stimulated degradation of Insulin Resistance and β -Cell Dysfunction. *Oxidative Medicine and Cellular J Biochem Molecular Toxicology*. Volume 17, Number 1.

Guo, S. (2014). Insulin signaling, resistance, and the metabolic syndrome: insights from mouse models into disease mechanisms. *J Endocrinol*. 2014.

- Heinecke JW, Li W, Francis GA, Goldstein JA. (1993). Tyrosyl radical generated by myeloperoxidase catalyzes the oxidative cross-linking of proteins. *J. Clin. Invest.* 91:2866-72.
- Henriksen, E, Diamond-Stanic M, Marchionne E. (2011). Oxidative stress and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes. *Free Radical Biology & Medicine.* 51 993–999.
- Hollenbeck, C.; Reaven, G. (1987). Variations in insulin stimulated glucose disposal in healthy individuals with normal glucose tolerance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 64:1169–1173.
- Hotamisligil G. (2003). Adipose expression of tumor necrosis factor- α : human insulin receptor substrate-1 by serine₃₁₂ phosphorylation. *J Biol Chem* 278: 8199–8211.
- Houstis, N, Rosen, E, Lander, E. (2017.) Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature*, Vol 44^o, 13 April 2006 .
- Hunt JV, Dean RT, Wolff SP. (1988) Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation. Glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing. *Biochem J.* 256(1):205–212.
- Jain, S. K.; Kannan, K.; Lim, G. (1998). Ketosis (acetoacetate) can generate oxygen radicals and cause increased lipid peroxidation and growth inhibition in human endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* 25:1083–1088.
- Järvinen, R, Knekt, P, Seppänen, R, Reunanen, A, Heliövaara, M, J Maatela, Aromaa, A. (1994). Antioxidant vitamins in the diet: relationships with other personal characteristics in Finland. *Journal of Epidemiology & Community Health.* 48:549-554.
- Jiménez, R. T., y Puig, J. G. (2002). Disfunción endotelial e hiperuricemia: papel de la enzima xantina oxidasa. *Revista Clínica Española*, 202(10), 549-551.
- Kahn C. Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes.(1994). *Diabetes*; 43: 1066-1084.
- Kaul N, Siveski-Illskovic N, Thomas TP, Hill M, Khaper N, Singal PK. (1995). Probuocol improves antioxidant activity and modulates development of diabetic cardiomyopathy. *Nutrition*, 11(Suppl 5):551–554.
- Kawamura M., Heinecke, J, Chaitl, A. (1994). Pathophysiological concentrations of glucose promote oxidative modification of low density lipoprotein by a superoxide dependent pathway. *J Clin Invest.* 94(2):771–778.

Keane, K, Cruzat V, Carlessi R, de Bittencourt P, Newsholme P. (2015). Molecular Events Linking Oxidative Stress and Inflammation to Insulin Resistance and β -Cell Dysfunction. *Oxid Med Cell Longev.*181643.

Kedziora-Kornatowska KZ, Luciak M, Blaszczyk J, Pawlak W. (1998). Effect of aminoguanidine on erythrocyte lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in experimental diabetes. *Clin Chem Lab Med.* 36:771–775.

Kenyon C, Chang J, Gensch E, Rudner A, Tabtiang R. (1993). *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature.* 366(6454):461-4.

Kimura, G. Hasegawa, H. Obayashi. (2003). Serum extracellular superoxide dismutase in patients with type 2 diabetes: relationship to the development of micro- and macrovascular complications," *Diabetes Care*, vol. 26, no. 4, pp. 1246–1250.

Kodydková, J. (2014). Human Catalase, Its Polymorphisms, Regulation and Changes of Its Activity in Different Diseases. *Folia Biologica (Praha)* 60, 153-167.

Komers R, Oyama T, Chapman J, Allison K, Anderson S. (2000). Effects of systemic inhibition of neuronal nitric oxide synthase in diabetic rats. *Hypertension.* 35(2):655–661.

Kopprasch, S, Srirangan D, Bergmann S, Graessler J, Schwarz P, Bornstein S. (2015). Association between systemic oxidative stress and insulin resistance/sensitivity indices – the PREDIAS study. *Clinical Endocrinology.* 0, 1–7.

Korkmaz, G, Altinoglu, E, Civelek, S, Sozer, V, Erdenen, F, Tabake, O, Uzunc, H. (2013). The association of oxidative stress markers with conventional risk factors in the metabolic syndrome. *Metabolism* Volume 62, Issue 6: 828-835.

Kowluru R, Engerman R, Kern T. (2000). Abnormalities of retinal metabolism in diabetes or experimental galactosemia VIII. Prevention by aminoguanidine. *Curr Eye Res.* 21(4):814–819.

Kubo, E., Chhunchha, B., Singh, P., Sasaki, H., y Singh, D. P. (2017). Sulforaphane reactivates cellular antioxidant defense by inducing Nrf2/ARE/Prdx6 activity during aging and oxidative stress. *Scientific Reports*, 7(1), 14130.

Kuyvenhoven JP, Meinders AE. (1999). Oxidative stress and diabetes mellitus. Pathogenesis of long-term complications. *Eur. J. Intern. Med.*10:9-19.

Kyselova, P., M. Ourek, Z. Ruäv, L. Trefil, J. (2002). Racek. Hyperinsulinemia and Oxidative Stress. *Physiol. Res.* 51: 591-595.

Lee, H, Choi, C, Birkenfeld, A, Alves, T, Jornayvaz, R, Jurczak, M, et al. (2010). Targeted Expression of Catalase to Mitochondria Prevents Age-Associated Reductions in Mitochondrial Function and Insulin Resistance. *Cell*. Volume 12, Issue 6: 668-674.

Lee, K. (2001). Oxidative stress markers in Korean subjects with insulin resistance syndrome. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 54 Suppl. 2 S29–S33, 2001.

Lei, X, Vatamaniuk, M. (2011). Two Tales of Antioxidant Enzymes on b Cells and Diabetes. *Antioxidants and Redox Signaling*. Volume 14, Number 3.

Levine, R, Garland, L, Oliver, D, Amici, C, Climent, A, Lenz, I, Stadtman, E. (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in enzymology*, 186, 464-478.

Liochev S.I., Fridovich I. (2002). The Haber-Weiss cycle - 70 years later: an alternative view, *Redox report*. 7: 55–57.

Llibre J., Guerra, M, Perera, E. (2015). Comportamiento de las enfermedades crónicas no transmisibles en adultos mayores. *Revista Cubana De Medicina General Integral*. 24(4).

Lowry, O, Rosebrough, N, Farr, A, Randall, R. (1951). Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *J Biol Chem* 193:265–275.

Marseglia, M, Manti, S, D'Angelo, G, Nicotera, A, Parisi, E y cols. (2015). Oxidative Stress in Obesity: A Critical Component in Human Diseases. *Int. J. Mol. Sci*. 16, 378-400.

Maritim AC, Moore BH, Sanders RA, Watkins JB III. (1999). Effects of melatonin on oxidative stress in streptozotocin- induced diabetic rats. *Int J Toxicol* 18:161–166.

Maritim, A, Sanders R, Watkins, J. (2003). Diabetes, Oxidative Stress, and Antioxidants: A Review. *J Biochem Mol Toxicol*. 17(1):24-38.

Martin, B, Warram J, Krolewski A, Bergman R, Soeldner J, Kahn C. (1992). Role of glucose and insulin resistance in development of type 2 diabetes mellitus: results of a 25-year follow-up study. *Lancet*; 340:925–929.

Martinoli L, Di Felice M, Seghieri G, Ciuti M, De Gior- gio LA, Fazzini A, Gori R, Anichini R, Franconi F. (1993). Plasma retinol and alpha-tocopherol concentrations in insulin-dependent diabetes mellitus: Their relationship to microvascular complications. *Int J Vitam Nutr Res*. 63(2):87–92.

Matthews, D, Hosker J, Rudenski A, Naylor B, Treacher D, Turner R. (1985). Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 28:412-9.

Meigs J, Larson M, Fox C, Keaney J, Vasan R, Benjamin E. (2007). Association of oxidative stress, insulin resistance, and diabetes risk phenotypes: the Framingham Offspring Study. *Diabetes Care*. 30(10):2529-35.

Mendez, J. I., Nicholson, W. J., y Taylor, W. R. (2005). SOD Isoforms and Signaling in Blood Vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25, 887-888.

Menon, V, Rudym, D, Chandra, P, Miskulin, D, Perrone, R, Sarnak, M. (2011). Inflammation, Oxidative Stress, and Insulin Resistance in Polycystic Kidney Disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 6: 7–13.

Montilla PL, Vargas JF, Tunez IF, Munoz de Agueda MC, Valdelvira ME, Cabrera ES. (1998). Oxidative stress in diabetic rats induced by streptozotocin: Protective effects of melatonin. *J Pineal Res*. 25(2):94–100.

Mootha, V, Lindgren CM, Eriksson K, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, Puigserver P, Carlsson E, et al. (2003). PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nature Genet*. 34, 267–273.

Morino, K.; Petersen, K. F.; Shulman, G. (2006). Molecular mechanisms of insulin resistance in humans and their potential links with mitochondrial dysfunction. *Diabetes* 55: S9–S15.

Nuttall, F. (2015). Body Mass Index: Obesity, BMI, and Health: A Critical Review. *Nutr Today*. 2015 May; 50(3): 117–128.

Organización Mundial de la Salud. Enfermedades no Transmisibles. 2017.

Palamanda, J, Kehrer, J. (1992). Inhibition of protein carbonyl formation and lipid peroxidation by glutathione in rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys* 293:103–109.

Park, K, Gross, M, Lee, D, Holvoet, P, Himes, J, Shikany, J, Jacobs, D. (2009). Oxidative Stress and Insulin Resistance. *Diabetes Care* 32:1302–1307.

Peraldi P, Hotamisligil G, Buurman W, White M, Spiegelman B. (1996). Tumor necrosis factor (TNF)- α inhibits insulin signaling through stimulation of the p55 TNF receptor and activation of sphingomyelinase. *J Biol Chem*. 271(22):13018–13022.

Rains, J. Sushil K. (2011). Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes Free Radical Biology & Medicine 50, 567–575.

Ramalho-Santos J, Amaral S, Oliveira P.(2008). Diabetes and the impairment of reproductive function: possible role of mitochondria and reactive oxygen species. Curr Diabetes Rev. Feb;4(1):46-54.

Reaven G. (2011). Insulin resistance: the link between obesity and cardiovascular disease. Med. Clin. North Am; 95: 875-892.

Reaven, G. (1988) Role of insulin resistance in human disease. Diabetes; 37, 1595-1607.

Rodrigo, R, (2009). Oxidative stress and antioxidants: their role in human disease. Published by Nova Science Publishers, Inc. New York. 2009013526

Romay C, Pascual C, Lissi A. (1996). The reaction between ABTS radical cations and antioxidants and its use to evaluate the antioxidant status of serum samples. Braz J Med Biol Res 29: 175-185.

Rui L, Aguirre V, Kim J, Shulman G, Lee A, Corbould A, Dunaif A, White M. (2001). Insulin/IGF-1 and TNF- α stimulate phosphorylation of IRS-1 at inhibitory Ser₃₀₇ via distinct pathways. J Clin Invest. 107(2):181–189.

Saltiel, A, Kahn, C. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. Nature 414:799–806.

Sapunar, J. (2016). Epidemiología de la Diabetes Mellitus en Chile, Revista Medicina Clínica Las Condes, 27(2), 146-151.

Solís C. (2008). Prevalencia de Diabetes Mellitus en Chile. Revista ALAD Vol. XVI(3), 2008.

Spiteller G. (2003). Are lipid peroxidation processes induced by changes in the cell wall structure and how are these processes connected with diseases? Med. Hypotheses. 60: 69–83.

Spiteller G. (2002). Are changes of the cell membrane structure causally involved in the aging process? Ann. N. Y. Acad. Sci. 959: 30–44.

Stohs S.J., Bagchi D. (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal-ions, Free Rad. Biol. Med. 18: 321–336.

Talior, I.; Yarkoni, M.; Bashan, N.; Eldar-Finkelman, H. (2003). Increased glucose uptake promotes oxidative stress and PKC- δ activation in adipocytes of obese, insulin resistant mice. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 285:E295–E302.

Tangvarasittichai, S. (2015). Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes*. April 15; 6(3): 456-480, 2015.

Tiganis T. (2011). Reactive oxygen species and insulin resistance: the good, the bad and the ugly. *Trends Pharmacol Sci*. 32(2):82-9.

Tseng, C. (2005). Waist-to-Height Ratio Is Independently and Better Associated With Urinary Albumin Excretion Rate Than Waist Circumference or Waist-to-Hip Ratio in Chinese Adult Type 2 Diabetic Women but Not Men. *Diabetes Care*. 28(9): 2249-2251.

Turner, N.; Heilbronn, L. (2008). Is mitochondrial dysfunction a cause of insulin resistance? *Trends Endocrinol. Metab*. 19:324–330.

Valera Mora, M, Scarfone A, Calvani, M, Greco, A, Mingrone, G. (2003). Insulin clearance in obesity. *J Am Coll Nutr*. 22(6):487–493.

Vasquez–Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, Tordo P, and Pritchard KA, Jr. (1998). Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95: 9220–9225.

Wallace T, Levy J, Matthews D. (2004). Use and Abuse of HOMA Modeling. *Diabetes Care* 2004 Jun; 27(6): 1487-1495.

Weir, Gordon C., Susan Bonner-Weir. (2004). Five Stages of Evolving Beta-Cell Dysfunction During Progression to Diabetes. *Diabetes*. 53(suppl 3): S16-S21.

Wright Jr., E.; Scism-Bacon, J. L.; Glass, L. (2006). Oxidative stress in type 2 diabetes: the role of fasting and postprandial glycaemia. *Int. J. Clin. Pract*. 60:308–314.

Xu, L, Badr, M. (1999). Enhanced Potential for Oxidative Stress in Hyperinsulinemic Rats: Imbalance Between Hepatic Peroxisomal Hydrogen Peroxide Production and Decomposition Due to Hyperinsulinemia. *Horm Metab Res*. 31: 278—2

Yang, H, Lee, T. (2015). Antioxidant enzymes as redox-based biomarkers: a brief review. *BMB Rep*. 48(4): 200-208.

Ye, J., McGuinness, O. (2012). Inflammation during obesity is not all bad: Evidence from animal and human studies. *Am J Physiol Endocrinol Metab*.

Ye, J. (2013). Mechanisms of insulin resistance in obesity. *Front Med*. March ; 7(1): 14–24.

Yip, J, Facchini, F, Reaven, G. (1998). Resistance to insulin mediated glucose disposal as a predictor of cardiovascular disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 83:2773–2776.

Zar, J. H. (1999). Biostatistical analysis. Pearson Education India.

Ziegler,D, H. Sohr,C, Nourooz-Zadeh, J. (2004). Oxidative stress and antioxidant defense in relation to the severity of diabetic polyneuropathy and cardiovascular autonomic neuropathy. Diabetes Care, vol. 27, no. 9, pp. 2178–2183.

16.- ANEXOS

Anexo 1: Consentimiento Informado



CONSENTIMIENTO INFORMADO

Información para adultos mayores pertenecientes a Agrupación de Adultos Mayores RENACER

El propósito del presente documento es invitarlo/a a participar en el estudio "Relación entre Insulinorresistencia y Estrés Oxidativo en adultos mayores" tesis de Magister en Ciencias de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso.

Usted ha sido seleccionado por pertenecer a la población de adultos mayores, que no presenten alguna enfermedad que genere incapacidad de entendimiento, problemas mayores de movilidad, enfermedades respiratorias o cardíacas crónicas no controladas. El investigador principal es Carlos Antonio Vargas Donoso. Para que usted pueda tomar una decisión informada, a continuación se le explicará cuáles serán los procedimientos involucrados en la ejecución de la investigación, así como en qué consistiría su participación:

La investigación se realizará durante el primer semestre del presente año en dependencias de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso (Angamos 655, Reñaca), y en el laboratorio clínico LABOCLIN (Los Fresnos 276, Miraflores Bajo), ambos ubicados en la comuna de Viña del Mar.

La relevancia de realizar esta investigación radica en que tanto la insulino resistencia (IR) como el Estrés Oxidativo (EO) son importantes predictores de enfermedades crónicas, ya que esta condición aumenta el riesgo de eventos cardíacos, cerebrovasculares y favorece la aparición de diabetes, lo cual, asociado a los cambios corporales propios del envejecimiento generan daño en la salud, disminuyendo de manera importante su calidad de vida.

Se espera que los resultados de la investigación logren determinar la relación entre insulino resistencia, y Estrés Oxidativo, para esto sólo se requiere una muestra de 10 ml de sangre venosa, procedimiento absolutamente seguro y de uso clínico habitual.

Procedimientos:

***Todos los procedimientos que se le realizarán, probablemente Ud. ya los conozca.**

1. Se aplicará una encuesta para conocer sus antecedentes médicos relevantes.
2. Medición de indicadores de Estrés Oxidativo: Se le tomará una muestra de sangre, para determinar su estado de oxidación y capacidad antioxidante. Para ello se le extraerán 10 ml de sangre, lo que se llevará a cabo en el laboratorio LABOCLIN, ubicado en Fresnos 276, Miraflores Bajo, Viña del Mar, sin costo para usted siendo enfermeros y técnicos en enfermería dependientes de este laboratorio quienes realizarán la toma de muestra de sangre venosa, siguiendo los protocolos de punción y medidas de seguridad correspondiente.
3. **Riesgos**
En el presente estudio se realizará una toma de muestra de sangre venosa simple, el cual constituye un procedimiento clínico habitual, que con seguridad, Ud. debe haberse hecho anteriormente. Este procedimiento rara vez presenta algún tipo de alteración para los pacientes. Cabe destacar que el laboratorio Clínico donde se le tomará la muestra (LABOCLIN) posee un Protocolo de toma de muestra en donde se especifica el manejo en caso de complicación.
En caso de encontrar alteración en su examen, se le informará inmediatamente a Ud.

4. **Beneficios**
El beneficio que usted obtendrá de esta investigación, será la entrega de un informe gratuito de todas las mediciones realizadas, en donde podrá ver su estado de salud. El investigador le



el EO antes del diagnóstico de diabetes, lo cual permitirá comenzar con el tratamiento de manera precoz.

5. Todo gasto que se considere dentro de la investigación será solventado por el equipo, incluyendo su traslado. Asimismo, se señala que no recibirá pago por su colaboración en el proyecto.

6. **Derechos del participante**

a) **A manifestar dudas, preguntas**

Los participantes de esta investigación pueden manifestar sus preguntas, ya sea antes, durante y después de la intervención, en caso de que requiera aclaraciones respecto a la investigación podrá contactarse con el investigador (+56962890340), carlos.vargas@uv.cl, (Carlos Vargas).

b) **A la participación voluntaria y a la revocación del consentimiento**

Ud. se puede retirar del estudio en cualquier momento si lo considera necesario, solo debe comunicarse con el investigador. En caso de retirarse no perderá ningún beneficio ni atención de su centro de salud o talleres participantes y sus datos recopilados hasta el momento le serán entregados íntegramente, además, no formarán parte de los resultados del estudio.

c) **A la atención y derivación oportunas en casos identificados de hallazgos a consecuencia de la investigación.**

Al finalizar las mediciones recibirá un informe completo de su estado de salud, en el caso que los resultados presenten alguna alteración, se le derivará a su CESFAM, para gestionar una atención médica y así pueda usted comenzar con el tratamiento adecuado para el hallazgo encontrado.

d) **A recibir información relevante derivada de la investigación que lo pueda beneficiar o hacer cambiar su opinión respecto de su participación.**

Ud. conocerá los resultados de la investigación de forma individual y acerca de la publicación posterior a la investigación.

7. **Confidencialidad**

a) **Reserva de la identidad del participante**

Su nombre será de información confidencial en todo momento y sus datos personales serán codificados, donde **SOLO** el investigador tendrá acceso a ellos.

b) **De los datos personales y sensibles**

Los resultados de la presente tesis podrán ser utilizados sólo por el investigador con el total resguardo de la identidad de los participantes, tanto en el proceso de recolección de datos como en el de publicación. Esta información permanecerá archivada por 5 años en dependencias de la Escuela de Kinesiología en el Campus de la Salud de la Universidad de Valparaíso.

8. Los resultados de esta investigación, posterior a la defensa de tesis, podrán ser publicados en medios de divulgación científica, o expuesta en seminarios, congresos u otras actividades científicas, preservando el total resguardo de la identidad de todos los participantes, tal como se consigna en el párrafo anterior.

9. Esta investigación ha sido evaluada y aprobada por el Comité de Bioética en Investigación (CBI) de la Facultad de Medicina (FAMED) de la Universidad de Valparaíso. Si usted lo requiriera, en caso de tener alguna duda acerca de este estudio o respecto de sus derechos como participante en esta investigación, puede contactar a su presidente en el teléfono 32 260 30 02 o E-mail: etica.facultadmedicina@uv.cl.



Anexo 2: Acta de Aprobación Comité de bioética Universidad de Valparaíso



FACULTAD DE MEDICINA
Comité de Bioética
para la Investigación

ACTA DE EVALUACIÓN BIOÉTICA No. 26/2018

I. El Comité de Bioética de la Facultad de Medicina, de la Universidad de Valparaíso en presencia de Jimena Le Roy, tecnólogo médico, Presidenta; Eva Sotelo, profesora de Castellano, Vice-presidenta; Paulina Hurtado, enfermera – matrona; Angelo Bartsch, kinesiólogo; Paula Eherenfeld, matrona, Claudia Calderón, psicóloga y María Lourdes Andrade, comunidad, en su sesión del día 28 de junio de 2018, declara haber evaluado el protocolo experimental del proyecto “Relación entre Insulinorresistencia y Estrés Oxidativo en adultos mayores”, presentado por el investigador responsable Carlos Vargas Donoso, adscrito a esta Facultad.

II. Para su evaluación el Comité de Bioética revisó los siguientes antecedentes:

1. Protocolo N° 33/2018 versión en español
2. Hoja Informativa de Consentimiento Informado y Acta de Consentimiento Informado, versión en español, cuyos destinatarios son participantes de investigación.
3. *Currículum Vitae* del investigador responsable.
4. Manual toma de muestras de LABOCLIN.
5. Carta Autorización Agrupación Renacer.

III. En la valoración bioética del proyecto, el Comité consideró que dicha propuesta cumple con los principios éticos necesarios para su realización, entre otros, los de beneficencia y atención a potenciales riesgos; se concluyó que su pertinencia fundamental radica en:

1. El diseño se ajusta a las Normas de Investigación en Seres Humanos.
2. El estudio propuesto podrá determinar cambios en el balance REDOX en pacientes insulinorresistentes, con el fin de prevenir el estrés oxidativo y el desencadenamiento de diabetes mellitus tipo 2, lo cual permitirá además comenzar el tratamiento para esta patología de manera precoz y revertir el status prooxidante de los pacientes.
3. El Consentimiento Informado da cuenta de la finalidad de la investigación en forma clara; explícita y respeta la voluntariedad del posible participante, además de ofrecerle la oportunidad de retirarse en cualquier momento sin que ello le revista algún perjuicio; asegura la confidencialidad de los datos y de la identidad del sujeto;



COMITÉ DE BIOÉTICA PARA LA INVESTIGACIÓN - FACULTAD DE MEDICINA
Angamos #655 Reñaca, Viña del Mar | Teléfono: 32 260 30 02 | E-mail: etica.facultadmedicina@uv.cl

se precisa que no existen riesgos, ni costos involucrados como tampoco remuneración por participar; especifica en qué consistirá la colaboración del sujeto, señalando tiempo que involucrará la aplicación de los instrumentos, y explicitando el compromiso de activar un protocolo de contención y posterior derivación si se detectara alguna sintomatología que así lo requiriese en los participantes; así también, el investigador da a conocer su teléfono e E-mail de contacto para ubicarlo en caso de cualquier consulta o duda.

4. Los antecedentes curriculares del Investigador Principal garantizan la ejecución del estudio dentro de los marcos éticos y técnicos aceptables.
5. Los miembros del Comité declararon no tener conflicto de interés.

IV. Por lo anterior, el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina aprueba el presente protocolo de investigación, que se llevará a cabo en la Universidad de Valparaíso, en colaboración con laboratorio LABOCLIN, durante el año 2018, bajo la supervisión del investigador responsable, Carlos Vargas Donoso. Las eventuales modificaciones que pudiera sufrir el protocolo al que serán sometidos los participantes deberán ser evaluadas por este Comité y aprobadas previo a su aplicación. El investigador responsable deberá transmitir informe de estado de avance del estudio al término de cada año de ejecución o el informe final, si correspondiere.

Firma en representación del Comité de Bioética de la Facultad de Medicina,



JIMENA LE ROY BARRÍA
Presidenta

Viña del Mar, 04 de julio de 2018



C/C.

- Secretaría CBI-FAMED.
- Comisión de Investigación Facultad de Medicina.

AGRADECIMIENTOS

Primero, quiero agradecer a Dios por Su infinita generosidad para conmigo.

A mis hijos, Tomás, Florencia y Agustín, por hacer que cada día valga la pena.

A mis padres y hermanos, por su incondicional apoyo y cariño, siempre.

A mi Director de Tesis, Profesor Juan Cristian Rojas, por su amistad de tantos años, confianza y ayuda permanente.

A la Profesora Marilyn Paz Araos, por la confianza en los momentos difíciles, sinceridad a toda prueba e infinita paciencia para conmigo.

Al Profesor Carlos Jara, jefe del Laboratorio de Estrés Oxidativo de la Escuela de Kinesiología, por su amistad sincera, su paciente guía en lo procedimental y la generosidad con sus tan amplios conocimientos.

Y a mis amigos, compañeros y colegas que hicieron más llevadero este caminar por mis estudios de magíster.