



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA

SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**“EFECTOS DE METFORMINA SOBRE LOS NIVELES DE NITROOXIDACIÓN
EN PACIENTES HIPERTENSOS CON SÍNDROME METABÓLICO”**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN FARMACOLOGÍA

PRESENTA

MÉDICO CIRUJANO: CRISTINA JUDITH AGUILAR RAMÍREZ

DIRECTORES DE TESIS:

DRA. ALEJANDRA MEANEY MARTÍNEZ

DR. ÁNGEL IVÁN ORLANDO RUBIO GAYOSSO

MÉXICO, D.F

NOVIEMBRE 2011



SIP-14-BIS

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México, D.F. siendo las 12:00 horas del día 30 del mes de Mayo del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la E.S.M. para examinar la tesis titulada:

"Efectos de metformina en niveles de nitrooxidación en pacientes hipertensos con síndrome metabólico"

Presentada por el alumno:

Aguilar
Apellido paterno

Ramírez
Apellido materno

Cristina Judith
Nombre(s)

Con registro:

B	0	9	1	7	8	6
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Farmacología

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis


Dra. Alejandra Meaney Martínez


Dr. Angel Ivan Orlando Rubio Gayosso

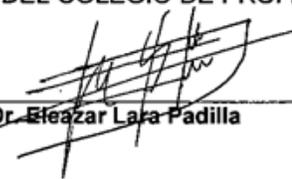

Dra. Ivonna María Olivares Corichi


Dr. Eduardo Meaney Mendiola


Dra. Ruth Mery López-Mayorga


Dra. Guadalupe Cueva Villanueva López

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


Dr. Eleazar Lara Padilla



SECCIÓN DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D.F., el día 30 de Mayo del año 2011, el que suscribe **Cristina Judith Aguilar Ramírez** alumna del Programa de Maestría en Ciencias en Farmacología con número de registro B09178, adscrito a la Escuela Superior de Medicina, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Ángel Iván Orlando Rubio Gayosso y de la Dra. Alejandra Meaney Martínez cede los derechos del trabajo titulado: "Efecto de metformina en niveles de nitrooxidación en pacientes hipertensos con síndrome metabólico", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión con fines académicos y de Investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del tutor y/o director del trabajo. Éste puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección cjudithramirez@gmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

CRISTINA J. AGUILAR R

CRISTINA JUDITH AGUILAR RAMÍREZ
registro B091786

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas especiales a las que me gustaría agradecer su amistad, apoyo, ánimo, compañía en las diferentes etapas de mi vida. Algunas están a mi lado, otras en mis recuerdos y en mi corazón. Sin embargo, sin importar en donde estén o si algún día llegan a leer esta dedicatoria quiero darles las gracias por formar parte de mí, por todo lo que me han brindado, compartido y enseñado.

A mis asesores, un sincero agradecimiento por su paciencia, confianza y apoyo para la realización de este trabajo.

Cristina Aguilar

ESTA TESIS SE REALIZÓ EN:

1. Laboratorio Multidisciplinario de Investigación. Sección graduados. Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional de D.F. México
2. Unidad de Investigación del Servicio de Cardiología del Hospital Regional 1º. De Octubre ISSSTE del D.F. México

CON EL APOYO DEL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA
(CONACYT)

1. Beca Maestría 331505 Agosto/ 2009 a Julio 2011.

ÍNDICE

	Página
Lista de abreviaturas.....	12
Resumen.....	13
Abstract.....	14
1. INTRODUCCIÓN.....	15
1.1. Antecedentes.....	15
2. GENERALIDADES.....	16
2.1. Síndrome Metabólico.....	16
2.1.1. Definiciones.....	16
2.1.1.1. Definición de la OMS.....	16
2.1.1.2. Definición del GERI.....	17
2.1.1.3. Definición del ATP III.....	17
2.1.1.4. Definición de la AAEC.....	18
2.1.1.5. Definición de la IDF.....	18
2.1.2. Aspectos Epidemiológicos.....	21
2.1.3. Fisiopatología.....	23
2.1.4. Elementos.....	25
2.1.4.1. Obesidad Abdominal.....	25
2.1.4.2. Dislipidemia.....	26
2.1.4.3. Elevación de cifras de glucosa en ayuno.....	28
2.1.4.4. Hipertensión arterial sistémica.....	29
2.1.5. Síndrome metabólico como una condición de riesgo.....	31
2.1.5.1. Enfermedad cardiovascular.....	32
2.1.5.2. Diabetes mellitus tipo 2.....	33
2.1.6. Tratamiento.....	33
2.1.6.1. Dieta y Ejercicio.....	33
2.1.6.2. Farmacológico.....	34
2.1.6.2.1. Medicamentos antihipertensivos.....	34

	Página
2.1.6.2.2. Medicamentos Hipolipemiantes.....	35
2.1.6.2.3. Medicamentos Antiagregantes Plaquetarios.....	36
2.1.6.2.4. Medicamentos Sensibilizantes a la Insulina.....	36
2.2. Estrés oxidativo vascular.....	38
2.2.1. Radicales Libres.....	38
2.2.2. Clasificación de Radicales Libres.....	38
2.2.3. Producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.....	39
2.2.4. Acción del óxido nítrico en el endotelio.....	40
2.2.5. Patología: Disfunción Endotelial.....	41
2.2.6. Métodos diagnósticos de disfunción endotelial.....	42
2.2.7. Patología: Daño oxidativo a biomoléculas: lípidos, proteínas y carbohidratos.....	44
2.2.7.1. Peroxidación de lípidos.....	44
2.2.7.2. Oxidación de proteínas.....	45
2.2.7.3. Oxidación de carbohidratos.....	46
2.3. Metformina.....	47
2.3.1. Farmacocinética.....	48
2.3.2. Farmacodinamia.....	49
2.3.2.1. Hígado.....	50
2.3.2.2. Ovario.....	51
2.3.2.3. Músculo Esquelético.....	51
2.3.2.4. Tejido Adiposo.....	52
2.3.2.5. Endotelio.....	52
2.3.3. Ventajas del uso de metformina en Síndrome metabólico.....	53
3. JUSTIFICACIÓN	56
4. OBJETIVOS	57

4.1. Objetivo general.....	57
4.2. Objetivos particulares.....	57
5. METODOLOGÍA.....	58
5.1. Diseño y población de estudio.....	58
5.2. Variables del estudio.....	58
5.3. Tamaño de muestra.....	60
5.4. Criterios de inclusión, no-inclusión y eliminación.....	62
5.5. Aleatorización.....	62
5.6. Procedimiento en visita de seguimiento.....	63
6. METODOLOGÍA ANALÍTICA.....	63
6.1. Medición del grosor íntima-media carotídeo.....	63
6.2. Vasodilatación mediada por flujo.....	65
6.3. Determinación de proteínas.....	66
6.4. Determinación de carbonilos.....	67
6.5. Determinación de nitritos.....	68
6.6. Determinación de peroxidación de lípidos.....	68
6.7. Determinación de S-nitrosilación de proteínas.....	69
7. ANALISIS ESTADÍSTICO.....	70
8. RESULTADOS.....	70
8.1. Características basales de la población estudiada.....	70
8.2. Comparaciones antropométricas en ambos grupos de estudio.....	75
8.3. Comparaciones bioquímicas en ambos grupos de estudio.....	76
8.4. Comparaciones de cifras de presión arterial en ambos grupos de estudio.....	78

	Página
8.5. Comparación de variables de función endotelial en ambos grupos de estudio.....	79
8.6. Correlación de los marcadores de estrés ON con GIMC.....	85
8.7. Correlación de los marcadores de estrés ON con valores de función endotelial.....	86
8.8. Correlación de los marcadores de estrés ON con cifras de presión arterial.....	94
8.8.1. Cifras de presión sistólica	98
8.8.2. Cifras de presión diastólica.....	98
9. DISCUSION.....	106
10. LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....	109
11. CONCLUSIONES.....	110
12. PERSPECTIVAS.....	110
13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111
14. ANEXOS.....	125
14.1. Reactivos utilizados.....	119
14.2. Técnica para determinación de carbonilos.....	120
14.3. Técnica para determinación de nitritos.....	121
14.4. Técnica para determinación de proteínas.....	122
14.5. Técnica por método metil-fenil-indol.....	123
14.6. Técnica para determinación de S-nitrosilación.....	124

LISTA DE FIGURAS

Fig.1 Fisiopatología del síndrome metabólico.....	24
Fig. 2 Efectos cardiometabólicos de los productos del adipocito	26
Fig. 3 Mecanismos de dislipidemia en síndrome metabólico.....	27

	Página
Fig. 4 Mecanismos de daño vascular por hiperglucemia	29
Fig. 5 Mecanismos de hipertensión arterial sistémica por resistencia a la insulina.....	31
Fig. 6 Mecanismos de lipoperoxidación.....	44
Fig. 7 Estructura química de metformina.....	48
Fig. 8 Valoración de función endotelial por medición de GIMC.....	64
Fig. 9 Valoración de función endotelial por medio de VMF	65
Fig. 10 Esquema de la reacción de Lowry.....	66
Fig. 11 Esquema de la reacción de formación de osazonas.....	67
Fig. 12 Esquema de la reacción de Griess.....	68
Fig. 13 Esquema de la reacción de MPI.....	69
Fig. 14 Esquema de la reacción de S-nitrosilación.....	69

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Prevalencia de FRCM en adultos mexicanos.....	21
Gráfica 2. No. de pacientes que cumplen con el criterio señalado.....	71
Gráfica 3. Valores de MDA de tres visitas en ambos grupos de estudio.....	81
Gráfica 4. Valores de carbonilos de tres visitas en ambos grupos de estudio.....	82
Gráfica 5. Valores de nitritos de tres visitas en ambos grupos de estudio.....	83
Gráfica 6. Valores de s-nitrosilación de tres visitas en ambos grupos de estudio	84
Gráfica 7. Correlaciones de MDA con GIMC derecho.....	86
Gráfica 8. Correlaciones de valores de carbonilos con GIMC derecho.....	87
Gráfica 9. Correlaciones de valores de nitritos con GIMC derecho.....	88
Gráfica 10. Correlaciones de valores de s-nitrosilación con GIMC derecho.....	89
Gráfica 11. Correlaciones de valores de MDA con GIMC izquierdo.....	90
Gráfica 12. Correlaciones de valores de carbonilos con GIMC izquierdo.....	91
Gráfica 13. Correlaciones de valores de nitritos con GIMC izquierdo.....	92
Gráfica 14. Correlaciones de valores de s-nitrosilación con GIMC izquierdo.....	93

Gráfica 15. Correlaciones de valores de % diámetro con valores de MDA.....	94
Gráfica 16. Correlaciones de valores de % diámetro con valores de carbonilos.....	95
Gráfica 17. Correlaciones de valores de % diámetro con valores de nitritos.....	96
Gráfica 18. Correlaciones de valores de % diámetro con valores de s-nitrosilación.....	97
Gráfica 19. Correlaciones de valores de presión sistólica con valores de MDA.....	98
Gráfica 20. Correlaciones de valores de presión sistólica con valores de carbonilos.....	99
Gráfica 21. Correlaciones de valores de presión sistólica con valores de nitritos	100
Gráfica 22. Correlaciones de valores de presión sistólica con valores de s-nitrosilación.....	101
Gráfica 23. Correlaciones de valores de presión diastólica con valores de MDA.....	102
Gráfica 24. Correlaciones de valores de presión diastólica con valores de nitritos.....	103
Gráfica 25. Correlaciones de valores de presión diastólica con valores de carbonilos.....	104
Gráfica 26. Correlaciones de valores de presión diastólica con valores de s-nitrosilación.....	105

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Definiciones más aceptadas para diagnóstico de síndrome metabólico.....	20
Tabla 2. Metas de tratamiento de síndrome metabólico.....	37
Tabla 3. Criterios de IFD para el diagnóstico de síndrome metabólico.....	61
Tabla 4. Variables antropométricas de población total.....	72
Tabla 5. Variables bioquímicas de población total.....	73
Tabla 6. Cifras de presión arterial de población total.....	73
Tabla 7. Variables de función endotelial en población total.....	74
Tabla 8. Marcadores de estrés oxidativo/nitrooxidativo en población total.....	74
Tabla 9. Comparación de variables antropométricas en tres visitas en ambos grupos.....	75
Tabla 10. Comparación de variables bioquímicas en tres visitas en ambos grupos.....	77
Tabla 11. Comparación de cifras de presión arterial en tres visitas en ambos grupos.....	78
Tabla 12. Comparación de cifras de marcadores de estrés oxidativo/nitrooxidativo en 3 visitas.....	79
Tabla 13. Comparación de variables de función endotelial en tres visitas en ambos grupos.....	85

LISTA DE ABREVIATURAS

OMS: Organización Mundial de la Salud	AGEs: Productos finales de glicosilación avanzada
SM: Síndrome metabólico	PKC: proteína cinasa C
HAS: Hipertensión arterial sistémica	SOD: Superóxido dismutasa
DM2: Diabetes mellitus tipo 2	NO: Óxido nítrico
FRCV: Factores de riesgo cardiovascular	SNS: Sistema Nervioso Simpático
HOMA: Homme Model Assesment	RI: Resistencia a la insulina
PA: Presión arterial	DE: Disfunción endotelial
PAS: Presión arterial sistólica	EO: Estrés oxidativo
PAD: Presión arterial diastólica	HMG CoA: hidroximetilglutaril coenzima A
EGSIR: Grupo Europeo para el estudio de la Resistencia a la Insulina	ERO: Especie reactiva de oxígeno
c-HDL: Colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad	RL: Radical Libre
NCEP-ATP III: National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III	ERN: Especie reactiva de nitrógeno
CA: Cintura abdominal	NADP: Fosfato dinucleótido de nicotiamida
IMC: Índice de Masa Corporal	eNOS: Sintasa de óxido nítrico endotelial
AACE: Asociación Americana de Endocrinólogos Clínicos	ENO: Estrés nitrooxidativo
IDF: International Diabetes Federation	VCAM-1: Vascular cell adhesión molecule 1
SRAA: Sistema renina-angiotensina-aldosterona	ICAM-1: Inter-cellular adhesión molecule 1
IECA: Inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina	ox-LDL: Lipoproteína de baja densidad oxidada
ARA II: Antagonista de los receptores de angiotensina II	VMF: Vasodilatación mediada por flujo
NCEP-ATP: National Cholesterol Program Adult Panel Treatment	GIMC: Grosor íntima media carotideo
c-HDL: Colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad	LPO: Lipoperoxidación
c-LDL: Colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad	AGP: Ácido graso polinsaturado
ENSANUT: Encuesta Nacional de Salud y Nutrición	4-HNE: 4-hidroxinonenal
SICA: Síndrome isquémico coronario agudo	MDA: Malondialdehído
HVI: Hipertrofia ventricular izquierda	3-NT: Nitrotirosina
AGL: Ácidos grasos libres	TBARS: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TNF α : Factor de necrosis tumoral	SOP: Síndrome de ovario poliquístico
c-VLDL: Colesterol unido a lipoproteínas de muy baja densidad	AMP-K: Cinasa acoplada a AMPc
TG: Triglicéridos	PI-3: Fostadilinositol-3
c-LDL: Colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad	LH: Hormona luteinizante
PCR: Proteína C Reactiva	ERK: Extracellular signal regulated kinase
LPL: Lipoprotein lipasa	ET-1: Endotelina-1
CETP: Proteína transportadora de ésteres de colesterol	PAI-1: Inhibidor del activador del plasminógeno-1
	UKPDS: Estudio de diabetes del Reino Unido
	AOPP: Productos avanzados de oxidación proteica
	FDA: Food Drug Administration
	DNPH: Dinitrofenilhidrazina
	MPI: metilfenilindol
	SH: sulfhidrilo
	ANOVA: Análisis de varianza

RESUMEN

Introducción. El síndrome metabólico (SM) es un conjunto de factores de riesgo para el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y enfermedad cardiovascular, caracterizado por resistencia a la insulina e hiperinsulinismo compensador, asociados con trastornos del metabolismo de los carbohidratos y lípidos, hipertensión arterial y obesidad.

Objetivo. Observar el efecto de metformina sobre los niveles séricos de los marcadores de estrés oxidativo-nitrosativo en pacientes hipertensos con SM que reciben tratamiento con metformina y los que no reciben el tratamiento.

Métodos. Se aleatorizaron 50 pacientes entre 35 y 60 años, diagnosticados con hipertensión arterial y SM según criterios de la Federación Internacional de Diabetes (IDF), en dos grupos: control (n: 25) y metformina 850 mg/día (n: 25). Además se valoraron peso, cintura abdominal, IMC, glucosa en ayuno, CT, c-HDL, algunos marcadores de estrés oxidativo/ nitrooxidativo: malonaldehído, carbonilos, nitritos, s-nitrosilación y se valoró la función endotelial por medio de la técnica vasodilatación mediada por flujo (VMF) y medición del grosor íntima-media carotídeo (GIMC). Ambos grupos recibieron orientación nutricional y valoración médica cada 6 meses, se les dio seguimiento durante un año. Con los resultados obtenidos se realizó la evaluación de los parámetros de cada grupo (metformina y control), análisis de varianza de un factor siendo significativo $p < 0.05$.

Resultados. Ambos grupos presentaron disminución de peso, IMC, CA colesterol total, hipertrigliceridemia, cifras de presión arterial, GIMC. El grupo con metformina presentó disminución en las cifras de glucosa (1.9mg/dl) y carbonilos (0.44 nmol/mg) así como un aumento de c-HDL (4.9mg/dl) y una tendencia a la mejoría en la función endotelial. El grupo sin metformina presentó elevación en marcador de S- nitrosilación.

Conclusiones. Metformina mejoró los niveles de carbonilos, precursores de los AGEs responsables de la inflamación y daño vascular. Son necesarios estudios adicionales a largo plazo para determinar si la metformina es un medicamento útil en la disminución del riesgo cardiovascular en SM.

ABSTRACT

Introduction. Metabolic syndrome (MS) is a cluster of risk factors for developing type 2 diabetes and cardiovascular disease characterized by insulin resistance and compensatory hyperinsulinemia associated with disorder of metabolism of carbohydrates and lipids, hypertension and obesity.

Objective. To observe the effect of metformin on serum biomarkers of oxidative stress in hypertensive patients with MS who are treated with metformin and those not treated with metformin.

Methods. Were randomized 50 patients of both sexes between 35 and 60 years diagnosed with hypertension and MS by IDF criteria in two groups: control (n=25) and metformin 850mg per day (n=25). Weight, abdominal circumference, BMI, fasting glucose, total cholesterol, HDL-c, malonaldehyde, carbonyls, nitrates, s-nitrosylation and endothelial function were assessed. Vasodilatation mediated flux (VMF) and measurement of carotid intima-media thickness (CIMT) were also assessed. Both groups received nutritional and exercise counseling and were evaluated every 6 months during one year. An analysis of variance was done with a significant $p < 0.05$.

Results. Both groups reduced weight, BMI, total cholesterol, abdominal circumference, triglycerides, blood pressure, CIMT. Only the metformin group showed significant decrease in glucose levels (1.9 md/dl), carbonyls (0.44 nmol/mg protein) and increased HDL-c (4.9 mg/dl). An improvement in endothelial function was observed in metformin group without statistics significance. The control group showed an elevation in the biomarker s-nitrosylation.

Conclusions. Metformin improved levels of carbonyls precursors of AGES responsible for the endothelial activation, inflammation and vascular damage. Long term studies are needed to determine whether metformin is a useful drug to ameliorate the cardiovascular risk in patients with MS.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes.

En los últimos años, se describieron una serie de alteraciones metabólicas y su asociación con el riesgo cardiovascular. En particular, obesidad abdominal, dislipidemia aterogénica, diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e hipertensión arterial sistémica (HAS). ^[1]

El término síndrome metabólico se ha propuesto con la idea de identificar pacientes con un elevado riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular y DM2. ^[2]

Conocido como síndrome plurimetabólico, la primera descripción que se tiene data de 1923, publicada por Kylin ^[3], en la que da a conocer estudios clínicos en los que el nexo de unión era la hipertensión arterial, la hiperglucemia y la hiperuricemia.

En 1947, Vague informa que la obesidad corporal superior se asocia con ciertas anormalidades metabólicas. ^[4] En 1963 *Reaven y cols.* describieron en pacientes no diabéticos con infarto de miocardio previo, mayores glicemias basales, tolerancia a la glucosa alterada e hipertrigliceridemia comparados con controles. ^[5] En 1988, definieron esta asociación como síndrome X, estableciendo que la alteración de la acción de la insulina se podía considerar el elemento etiopatogénico que conducía al desarrollo de las alteraciones metabólicas, independientemente que presentarán o no obesidad. ^[6] Ferranini y cols en 1991, publicaron que la HAS esencial se trataba *per se* de un estado de resistencia a la acción de la insulina, por lo que decidieron denominarlo “síndrome de insulino-resistencia”. Parecía entonces que “síndrome metabólico”, “síndrome X” y “síndrome de insulino-resistencia” se referían al mismo conjunto de factores de riesgo asociados a enfermedades cardiovasculares. ^[7] Posteriormente en 1998, la OMS publicó los criterios necesarios para el

diagnóstico del SM, a la que se unieron la de varios organismos internacionales, que serán descritos con detalle posteriormente. ^[7]

La epidemia mundial de obesidad debido al aumento en la ingestión calórica y la reducción de la actividad física, ha incrementado la prevalencia del SM. Ésto, representa un serio problema de salud, debido al aumento de la prevalencia de DM2 y las enfermedades cardiovasculares. ^[8] Por lo que es importante realizar estudios clínicos que propongan estrategias terapéuticas óptimas para el tratamiento farmacológico y no farmacológico de los pacientes que ya han desarrollado SM.

2. GENERALIDADES

2.1 Síndrome Metabólico (SM)

2.1.1 Definiciones

Desde la definición de *Reaven*, el conjunto de factores de riesgo cardiometabólico que confluyen en una persona ha recibido varios nombres, siendo el más aceptado SM. ^{[5][10]} Así también los criterios empleados para identificar a los pacientes con SM han sido modificados durante los últimos años.

2.1.1.2 Definición de la OMS

La definición de la OMS, publicada en 1998 reconoció al SM como una alteración metabólica con alto riesgo para el desarrollo de enfermedad cardiovascular, siendo el componente etiopatogénico fundamental la resistencia a la insulina, definida por alguna de las siguientes condiciones: DM2, glucemia alterada de ayuno o bien un HOMA (Homeostasis Model Assessment) por debajo del cuartil inferior para la población de estudio. Además de la resistencia a la insulina, se requiere de al menos dos de los siguientes criterios: dislipidemia

aterogénica determinada por una cifra de triglicéridos en plasma $>150\text{mg/dl}$, c-HDL $\leq 35\text{mg/dl}$ en varones y $\leq 39\text{mg/dl}$ en mujeres; obesidad determinada por un índice de masa corporal (IMC) $>30\text{kg/m}^2$ y/o un índice cadera-cintura de >0.9 en varones y >0.85 en mujeres; microalbuminuria determinada por una excreción urinaria de albúmina $>20\mu\text{g/min}$ o un cociente albúmina/creatinina urinario $>30\text{mg/g}$; HAS definida por una presión arterial sistólica (PAS) $\geq 140\text{mmHg}$ y/o presión arterial diastólica (PAD) $\geq 90\text{ mmHg}$ o recibir medicación antihipertensiva.^{[8][Fig.1]}

Sin embargo, posteriormente se identificaron varias limitaciones a esta definición, la más importante de las cuales se refería a la necesidad de la técnica de pinzamiento euglicémico para determinar el HOMA. Esta complicada técnica hizo que fuera prácticamente imposible el uso de esta definición tanto en la práctica clínica diaria como en los estudios epidemiológicos.
[8]

2.1.1.2. Definición del Grupo Europeo para el Estudio de la Resistencia a la Insulina (EGSIR)

El EGSIR en 1999, desarrolló una versión modificada, basada en la presencia de resistencia a la insulina, definida como un incremento del 25% de los valores de insulina en ayuno entre los individuos no-diabéticos, más por lo menos dos de los siguientes criterios: obesidad central $\geq 94\text{ cm}$ en hombres, $\geq 80\text{ cm}$ en mujeres; hipertriglicéridos $\geq 2.0\text{ mmol/L}$ y/o c-HDL $< 1.0\text{ mg/dl}$ o ser tratado por dislipidemia; HAS definida por cifras $\geq 140/90\text{ mmHg}$, o estar bajo tratamiento antihipertensivo y una glucosa plasmática de ayuno $\geq 6.1\text{ mmol/L}$.^[11]

2.1.1.3. Definición de la National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (NCEP- ATP III).

En 2001 el NCEP -ATP- III, propuso una definición más clínica con la idea de mejorar la detección de pacientes que pudieran desarrollar enfermedad cardiovascular. Se precisan 3

de los 5 criterios propuestos para cumplir el diagnóstico de SM: hipertrigliceridemia >150mg/dl, c-HDL <40mg/dl en varones y <50mg/dl en mujeres, glucemia de ayuno \geq 110mg/dl, HAS definida con cifras \geq 130/85 mmHg, circunferencia abdominal (CA) \geq 102 cm en varones y \geq 88 cm en mujeres. Esta definición alcanzó una gran popularidad debido a su sencillez, ya que sus componentes se pueden determinar fácilmente en la práctica clínica diaria y en estudios de investigación. ^[12] No obstante, esta definición no incorporaba variables proinflamatorias ni protrombóticas como la definición de la OMS. ^[Fig.1]

2.1.1.4 Definición de la Asociación Americana de Endocrinólogos Clínicos (AACE)

En 2003, la AACE efectuó una modificación de la definición del ATP-III, ésta basada en la consideración de que la resistencia a la insulina constituía el problema básico. Consideró cuatro factores para el diagnóstico de SM: hipertrigliceridemia, disminución de las concentraciones de c-HDL, incremento de la presión arterial y aumento de la concentración de glucosa. Diversos factores como obesidad, hipertensión, edad superior a los 40 años, estilo de vida sedentario fueron considerados como elementos que incrementaban la probabilidad del SM, más que factores de riesgo. ^[13] Además, el AACE excluyó a la obesidad como un componente del SM, debido a que consideró que era un factor que contribuía a la aparición de resistencia a la insulina, más que una consecuencia de ésta, por lo cual ésta definición generó numerosas críticas, dada la gran cantidad de datos que sugieren que la obesidad es un factor de riesgo importante para el desarrollo de DM2 y enfermedad cardiovascular. ^[13]

2.1.1.5 Definición de la International Diabetes Federation (IDF)

La publicación de la IDF pretende ofrecer una herramienta diagnóstica accesible de forma global, siendo el elemento más novedoso la necesidad de cumplir la condición de obesidad

abdominal como criterio imprescindible para catalogar a un paciente con SM. De esta manera la obesidad abdominal tiene una importancia fundamental y depende de las características étnicas de cada población, de ahí que para México los puntos de corte se establecieron en hombres ≥ 90 cm y en mujeres ≥ 80 cm. Para realizar el diagnóstico se requiere obesidad abdominal y al menos 2 de los siguientes 4 criterios: hipertrigliceridemia ≥ 150 mg/dl o recibir tratamiento específico; c-HDL < 40 y < 50 mg/dl en hombres y mujeres respectivamente, glucemia de ayuno ≥ 100 mg/dl o recibir tratamiento específico o un diagnóstico previo de DM2; hipertensión arterial definida como cifras $\geq 135/80$ mmHg o recibir tratamiento específico. ^[14] [Tabla 1]

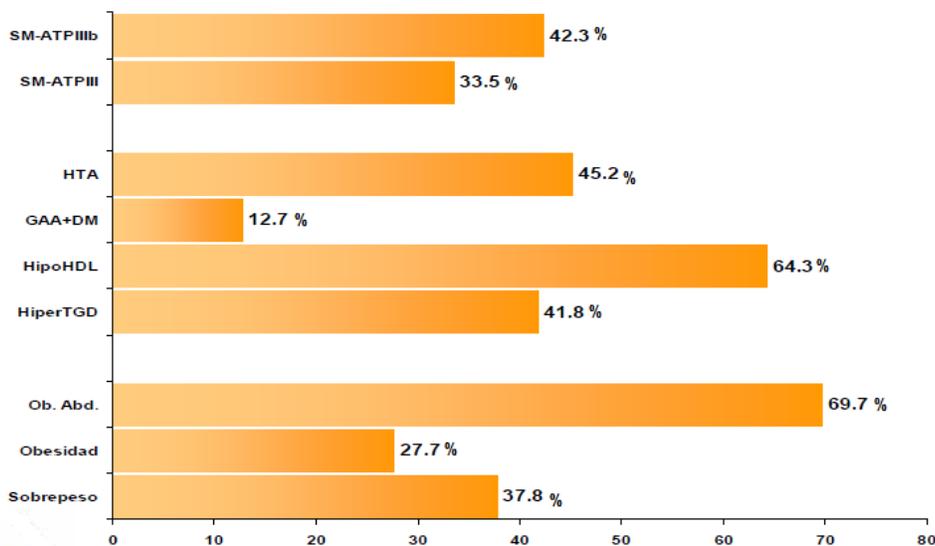
ELEMENTOS	OMS (1998)	NCETP-ATP III (2001)	IFD (2005)
INSULINA	Cifras de insulina disminuidas	Ninguna	Ninguno
OBESIDAD ABDOMINAL	ICC H> 0.90 M>0.85 IMC>30kg/m ²	CA H≥102 cm M≥88 cm	PA de acuerdo a la etnia Sud asiáticos ≥ 90 H ≥80M
LÍPIDOS	TG≥ 150 mg/dl y/o c-HDL H<35mg/dl o M<39 mg/dl	TG ≥150 mg/dl c-HDL H <40mg/dl M<50mg/dl	TG≥150mg/dl c-HDL H<40mg/dl M <50mg/dl
PRESIÓN ARTERIAL	≥140/90 mmHg	≥ 130/85	≥ 130 mmHg sistólica ≥ 85 mmHg o tratamiento para HAS
GLUCOSA	Intolerancia glucosa o DM2	≥110 mg/dl	≥100mg/dl incluida DM2
DIAGNÓSTICO	Intolerancia a glucosa o DM2 + 2 elementos más	Tres o + de los elementos	Obesidad abdominal + 2 elementos

Tabla 1. Definiciones más aceptadas para el diagnóstico de SM

2.1.2 Aspectos epidemiológicos

El aumento de la prevalencia de la obesidad a nivel mundial incrementa de forma paralela los portadores de SM, convirtiéndose en un problema de salud pública. ^[15] Se calcula que el 42% de la población mexicana mayor de 20 años lo padece, ^[9] de acuerdo a la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006 (ENSANUT 2006) el 70% de los mexicanos tiene sobrepeso u obesidad, la prevalencia de HAS fue del 30.8% y de obesidad con HAS del 46.8%, elevándose hasta el 50% en personas mayores de 50 años. ^[9][Gráfica 1]

En México, 17 millones de la población adulta (20-69 años) padece HAS, más de 14 millones tienen diagnóstico de dislipidemias, más de 6 millones son diabéticos y más de 35 millones de adultos tienen sobrepeso u obesidad. ^[9]



Gráfica 1. Prevalencia de los factores de riesgo cardiometabólicos en adultos mexicanos

El grupo de *Aguilar-Salinas* reportó una prevalencia del 26.6% de SM en un grupo de pacientes de entre 20 y 69 años, con un promedio de 40 años, de acuerdo a los criterios del

NCETP III. De acuerdo a estos datos se calcula que entre 6 y 14 millones de mexicanos están afectados por este síndrome. ^[15]

La presencia de HAS en el SM eleva el riesgo de daño a órgano blanco asintomático, como la hipertrofia del ventrículo izquierdo, la rigidez arterial y la aparición de microalbuminuria. ^{[16][17]}

La importancia del diagnóstico del SM radica en que estas patologías son factores de riesgo primordiales para el desarrollo de DM2, enfermedad arterial coronaria y cerebrovascular por aterosclerosis, principales causas de morbilidad y mortalidad en nuestro país. ^{[9][16][17]}

En el estudio de *Lakka*, ^[18] donde se evaluaron 1209 hombres de entre 42 a 60 años con diagnóstico de SM sin DM2 o enfermedad cardiovascular clínica, los cuales fueron seguidos durante 11 años, se observó un riesgo relativo para enfermedad cardiovascular de 2.8, en comparación con el grupo control. En el Prospective Cardiovascular Munster study (PROCAM) ^[19] se demostró igualmente, el incremento en el riesgo de enfermedad coronaria en caso de ser portador de DM2 o SM. La prevalencia del SM en los pacientes con síndromes isquémicos coronarios agudos (SICA): angina inestable e infarto con o sin elevación del ST, es aproximadamente del 48%. ^[20] Además, algunos meta-análisis recientes, que incluyeron 170000 sujetos, indican que la presencia de SM se correlaciona con un riesgo relativo de 1.78 en varones y 2.63 en mujeres para desenlaces cardiovasculares incluyendo la muerte. ^[21]

2.1.3 Fisiopatología

El SM constituye una condición patológica asociada a un estado de resistencia a la insulina e hiperinsulinemia secundaria, que presenta un riesgo múltiple para el desarrollo de enfermedad cardiovascular de origen ateroscleroso y DM2. [22][23][Fig. 3]

Los componentes del SM son obesidad central, dislipidemia aterogénica, hipertensión arterial y alteración en las cifras de glucosa de ayuno. [14] La obesidad y la inactividad física pueden ser consideradas como las desencadenantes del SM, sin embargo para que se manifieste, dependerá de factores genéticos, ambientales, raciales y el envejecimiento. [24][25][26]

Entre los factores ambientales, la falta de actividad física, el tabaquismo, y la dieta rica en carbohidratos, se han asociado de manera individual con cada uno de los componentes del SM. [25][26][Fig. 1]

El SM se asocia frecuentemente a otras patologías como son: alteraciones del sueño, depresión, esteatosis hepática, gota, osteoartritis, poliquistosis ovárica y arritmias. [26]

El SM favorece el desarrollo de enfermedad aterosclerosa en arterias de gran y mediano calibre, la elevación de lipoproteínas ricas en ApoB promueven la aterogénesis con el desarrollo de lesiones en el árbol vascular. [27] El desarrollo y evolución de la placa de ateroma se encuentra acelerado en la presencia de niveles bajos de c-HDL, HAS, elevación de citocinas proinflamatorias y elevación de glucosa plasmática. [27][28]

En general, los elementos que definen el SM se caracterizan por un alto grado de interacción, de manera que cada uno de ellos contribuye a la anormalidad del otro. [29]

SÍNDROME METABÓLICO

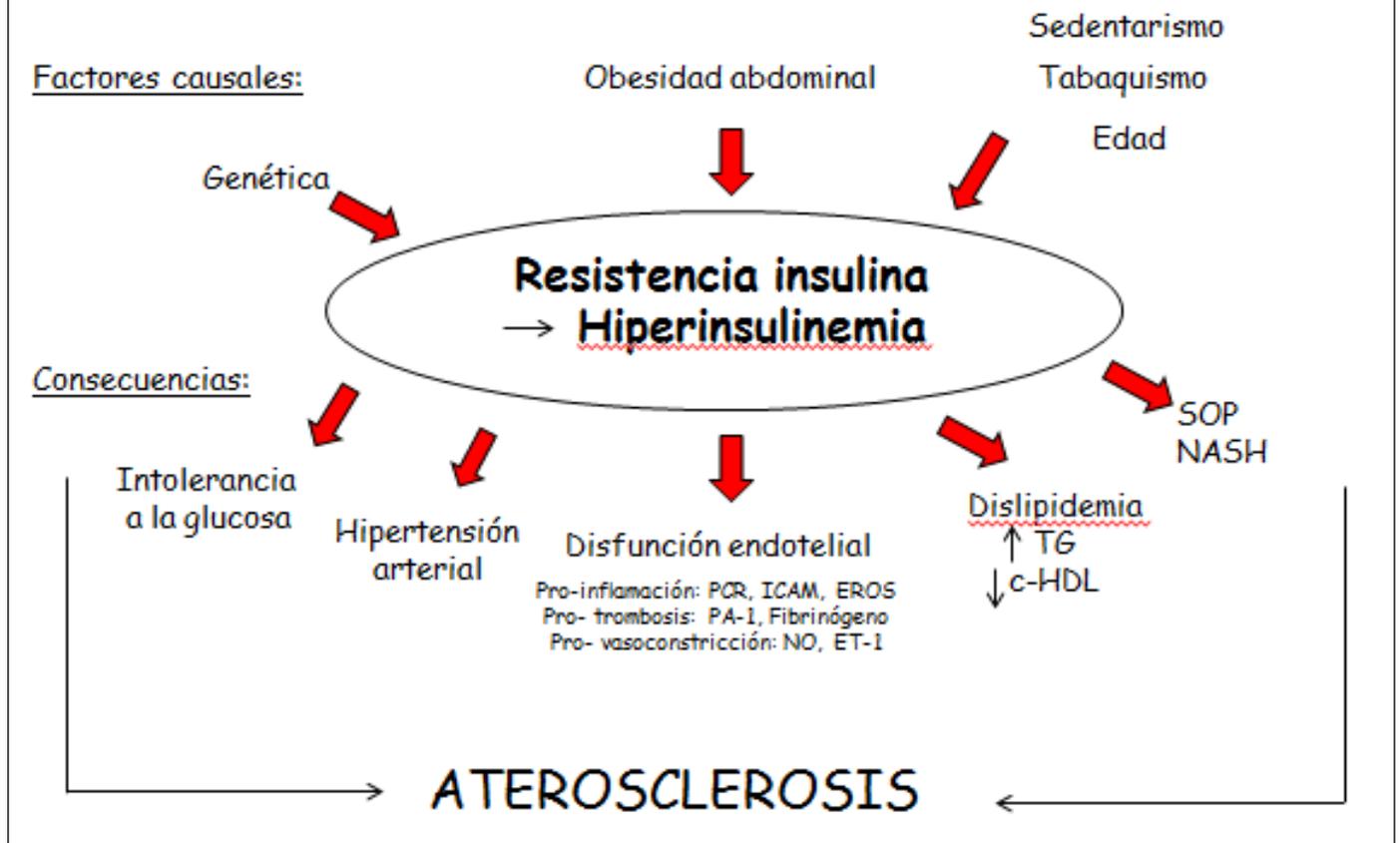


Fig. 1 Fisiopatología del Síndrome Metabólico

(SOP: Síndrome de ovario poliquístico; NASH: Esteatohepatitis no alcohólica; TG: Triglicéridos ; c-HDL colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad; PCR: proteína C reactiva; ICAM: moléculas de adhesión intercelular; EROS: especies reactivas de oxígeno; PAI: inhibidor activador del plasminógeno; NO: óxido nítrico; ET-1: endotelina 1)

2.1.4 Elementos del Síndrome Metabólico

2.1.4.1 Obesidad Abdominal. Es el tipo de obesidad que tiende a acumularse predominantemente en la cintura y en los órganos intraabdominales, ^[24] tiene la mayor correlación con condiciones tales como, DM2, ^[30] HAS, ^[31] dislipidemia aterogénica, ^[32] hipertrofia ventricular izquierda (HVI) ^[33] y muerte súbita. ^[34] La obesidad abdominal o visceral promueve el metabolismo de los ácidos grasos no esterificados o libres (AGL), lo que contribuye al estado de resistencia a la insulina. Los adipocitos hipertróficos intraabdominales se caracterizan por un estado de lipólisis que se torna resistente al efecto antilipolítico de la insulina. ^[35] El flujo resultante de AGL hacia la vía hepática genera un aumento de la gluconeogénesis. ^{[35][36]} La resistencia a la insulina en el hígado se asocia con una degradación de las moléculas ApoB y un aumento de la producción de lipoproteínas ricas en triglicéridos. ^[36] Diversas evidencias han demostrado que el tejido adiposo no solo tiene como función el almacenamiento y movilización de grasas sino que se considera como un órgano endocrino que tiene la capacidad de liberar numerosas citocinas proinflamatorias como interleucina 6 (IL-6), ^[37] el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), ^[37] adipocinas como la adiponectina, ^[38] la resistina ^[39] y la leptina; ^[40] las cuales se han relacionado de manera directa con la aparición de HAS y dislipidemia aterogénica en el SM. ^{[39][40][Fig.2]}

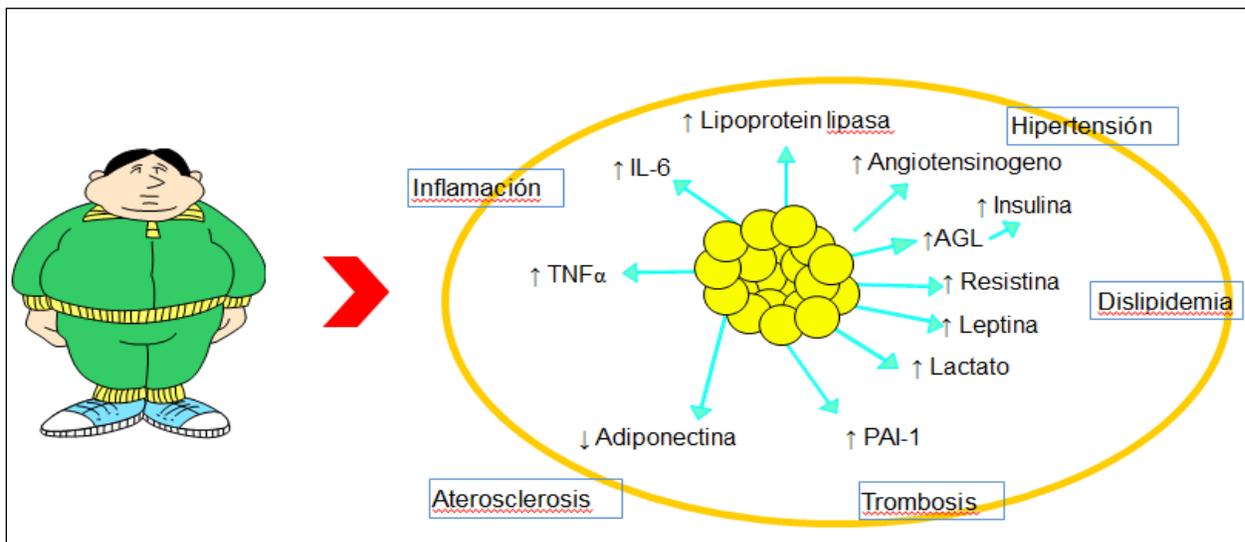


Fig. 2 Efectos cardiometabólicos de los productos del adipocito

(AGL: ácidos grasos libres; PAI-1: inhibidor del activador del plasminógeno-1; TNF α : factor de necrosis tumoral α ; IL-6: interleucina-6)

2.1.4.2 Dislipidemia aterogénica.

Las dislipidemia aterogénica se define por hipertrigliceridemia, niveles reducidos de c-HDL y concentraciones elevadas de c-LDL. La hipertrigliceridemia y la disminución de c-HDL están relacionados con la resistencia a la insulina. ^[41] Estudios recientes para corroborar estas asociaciones, demuestran que existe una alteración a nivel molecular en la vía de señalización de la insulina, con sobreexpresión de fosfatasa y activación de las proteinasas que conduce a una situación mixta de hipersensibilidad y resistencia a la insulina. ^[42] Éstas alteraciones provocan lipogénesis, estimulación de la producción hepática de c-VLDL ricas en Apo B100, transferencia de triglicéridos (TG) al c-LDL y al c-HDL provocando un circuito inverso que genera más c-VLDL. Esto lleva a la generación de pequeñas moléculas aterogénicas debido a que las LDL ricas en TG son lisadas por la lipasa hepática y se producen partículas de LDL más pequeñas y densas. Por otro lado, las HDL ricas en TG son

lisadas en pequeñas partículas fácilmente excretadas por vía renal, disminuyendo la concentración de HDL en plasma. [43][Figura 3]

Las c- LDL densas y pequeñas son más aterogénicas porque atraviesan más fácilmente el endotelio, una vez oxidadas en el subendotelio son reconocidas por receptores “scavengers” de los macrófagos que inician una respuesta inflamatoria, fenómeno inicial de aterogénesis. [28][43][44] El descenso de c-HDL, por otro lado, determina una menor extracción del colesterol de la pared arterial [43].

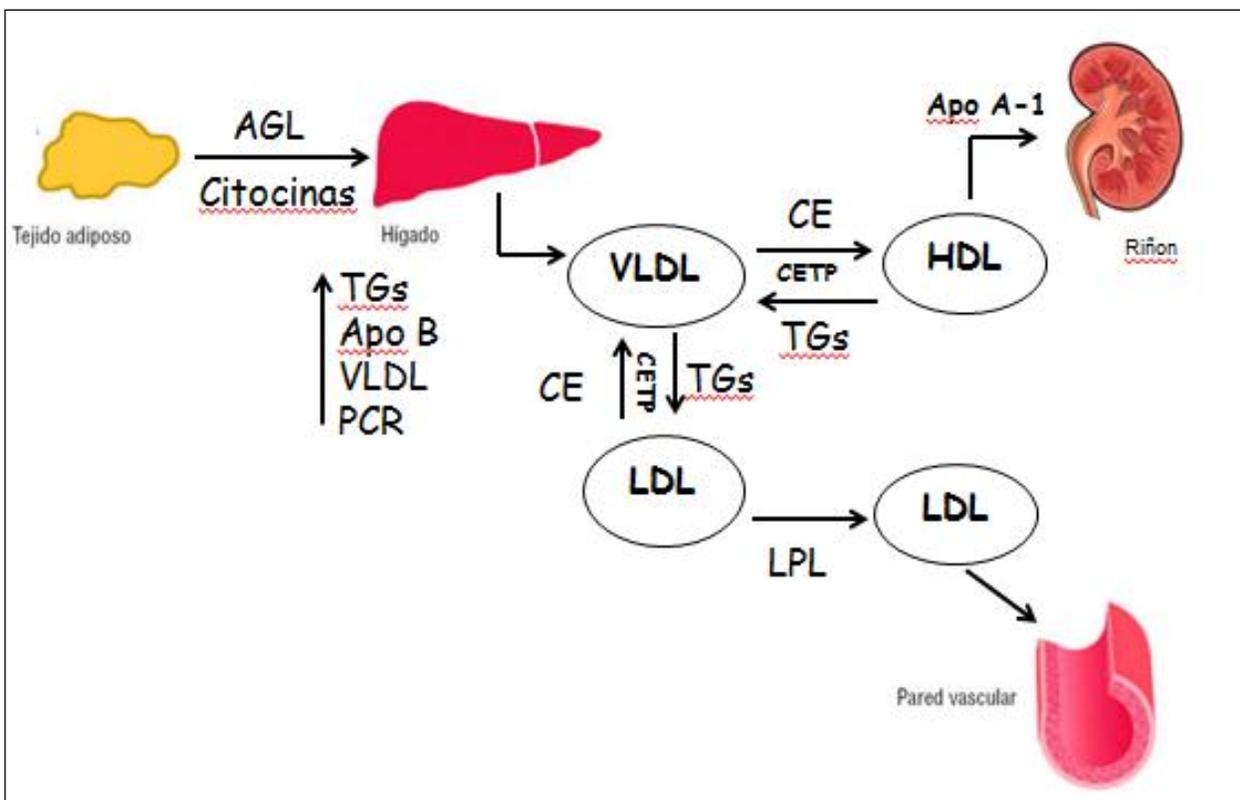


Fig. 3 Mecanismos de Dislipidemia en Síndrome Metabólico

(AGL: ácidos grasos libres; TGs: triglicéridos; PCR: proteína C reactiva; VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad; LDL: lipoproteínas de baja densidad; LPL: lipoprotein lipasa; CE: ésteres de colesterol; CETP: proteína transportadora de ésteres de colesterol)

2.1.4.3 Elevación en cifras de glucosa en ayuno.

La glucosa es el principal regulador de la producción y secreción de insulina. ^[45] El exceso de AGL, glucosa, o de ambos, entorpece la incorporación tisular de glucosa mediada por el transportador GLUT4, la regulación hepática de glucosa y la secreción de insulina. ^[46]

Existen cuatro mecanismos propuestos a través de los cuales la hiperglucemia induce disfunción endotelial:

1. El incremento de la actividad de la vía de los polioles; 2. El aumento en la tasa de productos finales de la glicación avanzada (AGEs); 3. La activación de diversas isoformas de la proteína-quinasa C (PKC); y 4. La hiperactividad de hexosaminas. Estos cuatro mecanismos se vinculan entre sí, ya que convergen en una sobreproducción mitocondrial de superóxido.

^[45] La hiperglucemia induce un incremento del potencial transmembrana en la mitocondria, con el bloqueo del transporte a nivel del complejo III de la cadena respiratoria, lo que aumenta la vida media de radicales libres de oxígeno y favorece la reducción a superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$). ^[45] El O_2^- al interactuar con el óxido nítrico (NO) forma peroxinitrito. Éste altera la estructura de las proteínas de la cadena mitocondrial, la superóxido-dismutasa (SOD) y los canales dependientes de voltaje; éstos eventos conducen a suprimir la actividad de la cadena de transferencia de electrones, dificultan la detoxificación del superóxido y desvían la glucosa hacia vías metabólicas posiblemente tóxicas que inducen la glicación de proteínas, aumento de la apoptosis y disfunción en el endotelio vascular. ^[47][Fig. 4]

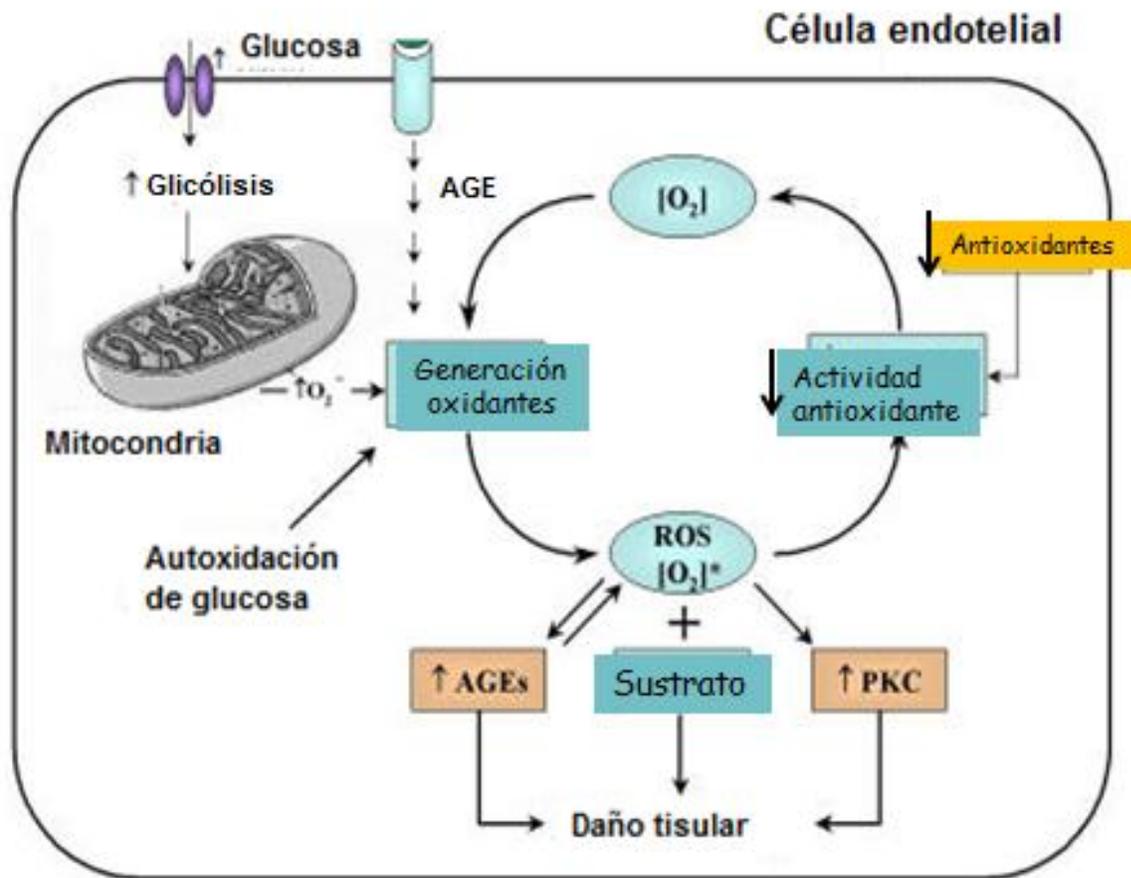


Fig. 4 Mecanismos de daño vascular por hiperglucemia

(AGEs: productos de glicosilación avanzada; ROS: especies reactivas de oxígeno; PKC: proteína cinasa C)

2.1.4.4 Hipertensión arterial sistémica

La mayoría de los estudios coinciden en que los pacientes que presentan HAS tienen mayor frecuencia de alteraciones del metabolismo de los carbohidratos, ^[48] dislipidemia ^[49] y sobrepeso u obesidad. ^[50] La obesidad abdominal ocasiona que la grasa retroperitoneal comprima extrínsecamente al riñón y la grasa intrarrenal comprima a la médula renal, lo que origina un aumento en la reabsorción de sodio y estimula la liberación de renina en el sistema yuxtaglomerular. ^{[48][50]} Como se mencionó anteriormente, el tejido adiposo se comporta como un órgano endócrino muy activo, en donde las adipocinas como la resistina

se ha relacionado de manera directa con la disfunción endotelial; ^[40] la adiponectina se ha asociado con la aparición de HAS, sobrepeso, hipertrigliceridemia, disminución de c-HDL;^[39] y la leptina estimula el sistema nervioso simpático. ^[40] Todas estas acciones se han propuesto como los mecanismos generadores de la elevación de la presión arterial en el SM. ^{[40][49]}

Uno de los mecanismos por el cual el estado de resistencia a la insulina se ha relacionado con HAS es la activación del sistema nervioso simpático y el sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), los cuales originan retención de volumen y Na⁺, disfunción endotelial y alteración en la función renal. ^{[51][52]} La hiperinsulinemia estimula la activación de SRAA en vasos sanguíneos y en corazón, generando la producción de angiotensina II (Ang II), la cual actúa en el receptor tipo 1 de Ang II. La Ang II inhibe los efectos vasodilatadores de la insulina, al bloquear la acción de la insulina en las 3- fosfatidilinositol cinasas y la beta-proteína, lo que promueve la producción de oxígeno libre y origina una disminución en la producción de NO en células endoteliales y vasoconstricción en células de músculo liso. ^{[53][54]} Estos efectos promueven y mantienen el estado hipertensivo, favoreciendo además un estado de estrés oxidativo, disfunción endotelial y en forma crónica el aumento del grosor de la íntima y la rigidez de la pared arterial, procesos iniciales de la aterogénesis. ^{[54][55][56]} [Fig. 5]

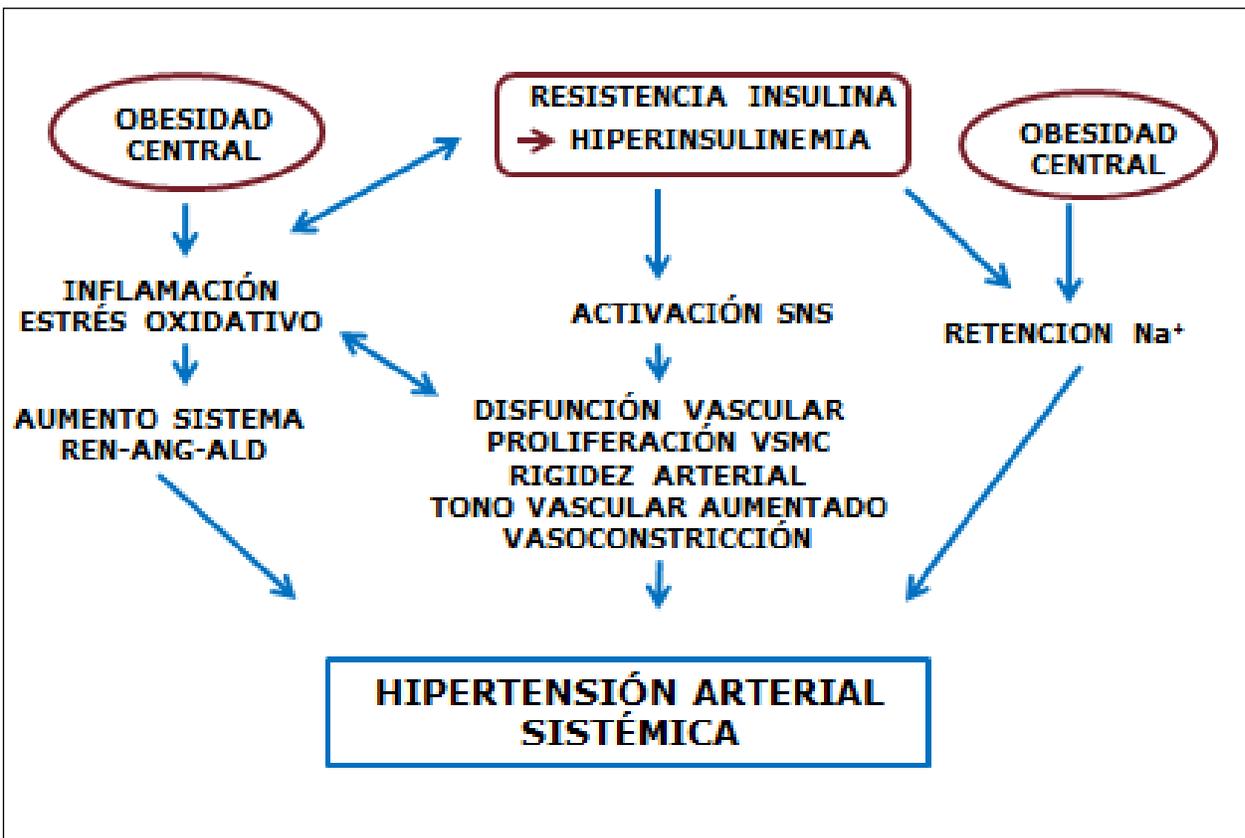


Fig.5 Mecanismos de hipertensión arterial sistémica por resistencia a la insulina

2.1.5 Síndrome metabólico como una condición de riesgo

El SM es reconocido como la asociación de factores de riesgo que pueden aparecer de manera simultánea o secuencial en un mismo individuo, causados por factores genéticos y ambientales, asociados al estilo de vida y en los que la resistencia a la insulina se considera el componente patogénico fundamental. ^{[22][23][26]} La presencia de SM se relaciona con un incremento significativo de riesgo de DM2 y enfermedad cardiovascular. ^{[22][23][57][58]}

2.1.5.1 Síndrome metabólico como predictor de enfermedad cardiovascular

En el estudio INTERHEART, distintos componentes del SM, como la dislipidemia aterogénica, la HAS y la obesidad abdominal fueron reconocidos como factores de riesgo cardiovascular (FRCV) independientes y su asociación determinó un riesgo cardiovascular mucho mayor. ^[59]

De manera similar, un informe del Framingham Heart Offspring Study, mostró que la contribución del SM al riesgo de enfermedad cardiovascular y enfermedad coronaria era del 34% y el 29%, respectivamente en los varones y del 16% y el 8% en las mujeres. ^[60] En este análisis, los componentes del SM que más contribuyeron al riesgo de enfermedad cardiovascular fueron la HAS (33%) y el c-HDL bajo (25%). En un metaanálisis realizado en el año 2007, que incluyó 37 estudios longitudinales con un total de 172,573 pacientes, se observó un aumento del riesgo del 78% de accidentes cardiovasculares y muerte entre sujetos con SM. ^[61]

El estudio del corazón de San Antonio Texas, que incluyó un alto porcentaje de mexicanos, demostró que el SM en mujeres (4.6) tiene un riesgo mayor de mortalidad que en hombres (1.8). ^[62]

El incremento del riesgo cardiovascular asociado a SM puede deberse a la suma de sus partes ya que cada uno de sus componentes constituye un factor de riesgo independiente. ^[63]

La combinación de dislipidemia aterogénica, HAS, obesidad y RI por los efectos que conducen: disfunción endotelial (DE) y estrés oxidativo (EO), puede terminar en engrosamiento de la íntima-media, aterosclerosis, ruptura de la placa aterosclerosa y finalmente eventos cardiovasculares. ^{[35][41][50][52][55]}

2.1.5.2 Síndrome metabólico como predictor de DM2

La DM2 es una enfermedad compleja, causada por factores genéticos y ambientales, caracterizada por concentraciones elevadas de glucosa en sangre, lo cual se genera por alteraciones en la producción o acción de la insulina o una combinación de ambas. ^[64]

Muchos pacientes antes de presentar DM2, presentan RI y SM. En realidad la RI, la hiperinsulinemia secundaria, la dislipidemia y la obesidad preceden a la aparición de la DM2 en un 75-85% de los casos. ^[60]

En pacientes que cumplen los criterios de SM, pero que no tienen DM, el riesgo de desarrollar esta enfermedad es de 5 veces. ^[65] Siendo el estado de hiperinsulinemia el factor predominante. ^[60]

2.1.6. Tratamiento de síndrome metabólico

El tratamiento del SM debe orientarse a mejorar la resistencia a la insulina y al control integral de las patologías asociadas que se relacionan a un mayor riesgo del desarrollo de DM2 y enfermedad cardiovascular. ^{[57][58]} La terapéutica se basa en el control de cada uno de los factores, siendo las metas establecidas las que se muestran en la Tabla 2. ^[66] Sin embargo, el tratamiento debe individualizarse dependiendo de los componentes que cada paciente presente.

2.1.6.1 Dieta y Ejercicio

Los cambios conductuales saludables en el estilo de vida, especialmente la reducción del peso y el aumento de la actividad física, son la estrategia central, pues no solo corrigen los factores de riesgo cardiovascular sino que han demostrado prevenir el desarrollo de DM2, si se inician en la infancia o la adolescencia. ^[67]

Al respecto el estudio Diabetes Prevention Program 2 (DPP-2) demostró que una intervención dietaria y de ejercicio en individuos intolerantes a la glucosa reducían la progresión a DM2 en un 60%.^[68]

La pérdida de peso debe ser lenta y sostenible, una meta adecuada es la pérdida del 7-10% del peso corporal en 6 a 12 meses; la utilización de una dieta con una reducción modesta de calorías,^[66] contribuye a la disminución en los niveles de triglicéridos y en el aumento de las concentración de c-HDL, lo que influye favorablemente en la función cardiovascular.^[69] El aumento en la actividad física de forma crónica disminuye las cifras de PA, mejora la sensibilidad a la insulina, incrementa el c-HDL, mejora el control glucémico y ayuda a mantener el peso perdido por la dieta. Además, debe suspenderse el hábito tabáquico y moderar la ingestión de alcohol.^{[66][69][70]}

Además de los cambios conductuales, se debe tratar farmacológicamente cada uno de los componentes del SM.^[71]

2.1.6.2 Tratamiento Farmacológico

Las estrategias farmacológicas para el tratamiento del SM incluyen el uso de agentes antihipertensivos, hipolipemiantes y agentes que inducen la sensibilidad a la insulina.^[66]

a. Fármacos Antihipertensivos

La prescripción del fármaco antihipertensivo debe ir siempre acompañado de medidas no farmacológicas: reducción del peso y del consumo del alcohol, abandono del hábito tabáquico, restricción de sal a menos de 6 g/día y educación sobre la importancia de la adherencia al tratamiento y control frecuente de la medición de la presión arterial.^{[66][67][70][72]}

Los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECAs) y los antagonistas del receptor tipo 1 de angiotensina (ARAs), se recomiendan como antihipertensivos de primera línea en pacientes con SM (excepto en mujeres embarazadas y en periodo de lactancia en quienes están contraindicados). Estos medicamentos son vasodilatadores, disminuyen los niveles de noradrenalina circulantes (efecto simpatolítico), son sensibilizantes de la insulina y tiene un efecto antiaterogénico. [73][74]

Si la cifras de PA no se controla se adiciona al tratamiento un calcio antagonista, el cual bloquea los canales de calcio tanto en las células cardiacas como en el músculo liso arteriolar, por tanto disminuyen las resistencias periféricas produciendo vasodilatación (fundamentalmente las dihidropiridinas como nifedipino) o bien un diurético tiazídico a dosis bajas, pues a dosis altas tienen efectos metabólicos desfavorables sobre la glucemia, el ácido úrico y el perfil lipídico. [75][76]

b. Fármacos Hipolipemiantes

El tratamiento farmacológico de la dislipidemia aterogénica en el SM debe iniciarse con estatinas y si es necesario agregar un fibratos o derivados del ácido nicotínico. [66]

Las estatinas, inhiben la síntesis de colesterol al inhibir a la 3-hidroxi-3 metil glutaril coenzima A (HMG Coa) reductasa, lo que aumenta la expresión de receptores para c-LDL en los hepatocitos. [77] Sus efectos secundarios son las alteraciones hepáticas (precisan control de las transaminasas) y musculares (miopatías y rabdomiolisis). [66][77]

Cuando los niveles de triglicéridos son ≥ 500 mg/dl, se debe considerar el manejo farmacológico para evitar el desarrollo de pancreatitis. [77] Los fibratos son agonistas de los receptores PPAR- α , por lo que disminuyen los niveles de TG y aumentan los niveles de c-

HDL. Además, estimulan a la LPL, aumentando de esta forma la hidrólisis de quilomicrones y de VLDL. Sus efectos secundarios son molestias gastrointestinales y litiasis biliar.^[78]

El ácido nicotínico disminuye los niveles de TG pero sobre todo incrementa los niveles de c-HDL, mediante la inhibición de la lipólisis en los adipocitos, disminuye la síntesis de TG en el hígado, disminuye los niveles de VLDL y de c-LDL. Sus efectos secundarios son rubor cutáneo y prurito.^[79]

La combinación de fibratos o ácido nicotínico con estatina ha demostrado ser la mejor opción terapéutica en el SM, al disminuir c-LDL, los TG y aumentar el c-HDL.^[80]

c. Fármacos Antiagregantes

El ácido acetilsalicílico a bajas dosis (75-100mg/día) ha demostrado reducir el riesgo de eventos cardiovasculares en prevención secundaria. Sin embargo, en la actualidad no está indicado en prevención primaria debido al incremento en la incidencia de hemorragias que supera los beneficios.^[81]

d. Fármacos Sensibilizantes a la acción de la insulina

El tratamiento con fármacos en los pacientes que presentan cifras de glucosa en ayuno ≥ 100 mg/dl es un tema controvertido,^[82] a pesar de que el uso de tiazolidinedionas,^[66] acarbosa^[83] y metformina^[68] podrían disminuir el riesgo del desarrollo de DM2, no existe aún evidencia clínica suficiente que documente el uso de hipoglucemiantes orales para disminuir el riesgo de eventos cardiovasculares o el retraso en el desarrollo de DM2 en el contexto del SM.

FACTORES DE RIESGO DE ESTILO DE VIDA	META
OBESIDAD ABDOMINAL	Disminuir 7-10% del peso durante un año de terapia. Conseguir IMC<25
ACTIVIDAD FÍSICA	Realizar 30-60 minutos de actividad aeróbica continua o intermitente, por lo menos 5 días por semana.
FACTORES RIESGO METABÓLICOS	META
NIVELES ELEVADOS C-LDL	Alcanzar concentraciones 70-100 mg/dl
NIVELES ELEVADOS NO-HDL	Alcanzar concentraciones <130 mg/dl
NIVELES DISMINUÍDOS C-HDL	Enfatizar en cambios en el estilo de vida Terapéutica farmacológica fibratos o ácido nicotínico una vez logradas las metas de c-LDL
HIPERTENSIÓN ARTERIAL	PA > 120/80mmHg: iniciar modificación en el estilo de vida: control de peso, actividad física, ingesta de alcohol moderada, reducción en la dieta de Na ⁺ PA ≥ 130/80 iniciar tratamiento farmacológico para lograr meta de <130/80
GLUCOSA ≥100mg/dl	Disminuir el peso y aumento de la actividad física

Tabla 2. Metas de tratamiento de SM

2.2 Estrés oxidativo vascular

En los organismos aerobios, el uso del oxígeno en la mitocondria como último aceptor de electrones en la cadena respiratoria constituye una ventaja energética, sin embargo, su principal desventaja es su alta potencialidad citotóxica, ya que el oxígeno celular es aprovechado de un 97-98% para la síntesis de agua y el 2-3% restante, genera continuamente especies reactivas de oxígeno (ERO), que pueden dañar las estructuras celulares. ^[84]

El estrés oxidativo (EO) se origina al presentarse un desbalance entre la generación de radicales libres (RL) y ERO generados en los procesos metabólicos del organismo y los sistemas antioxidantes. ^[85]

2.2.1 Radicales Libres (RL)

Los RL son moléculas que contienen en su último orbital un electrón no apareado, mientras que las ERO son moléculas que contienen oxígeno en su estructura y pueden o no tener electrones apareados. ^[86] Ambos tipos de moléculas actúan en varios procesos como son la fecundación, activación de genes, procesos de defensa inmunológica, procesos de oxidación del citocromo P-450, entre otros. ^{[85][86][87][88]}

2.2.1.1 Clasificación de RL

Diversos autores han clasificado a los RL de acuerdo con el grupo funcional presente en la molécula. ^[88] El tipo más frecuente de RL es el del oxígeno. De menor importancia son los radicales tioles, que se caracterizan por contener azufre como grupo reactivo. Otros radicales contienen carbono, fósforo o nitrógeno como centro reactivo. ^[88]

Debido a la relevancia del oxígeno en los procesos aeróbicos, los RL con oxígeno reactivo son los más comunes, la mayoría de ellos proceden de las reacciones metabólicas normales y se pueden incrementar por efecto de factores exógenos. Éste grupo está constituido por el anión superóxido, el radical hidroxilo y los derivados de compuestos orgánicos peróxilo y alcoxilo. También se incluyen los compuestos reactivos tales como el peróxido de hidrogeno y el singlete de oxígeno. ^{[87][88]}

El grupo de RL con nitrógeno reactivo están constituidos por NO y dióxido de nitrógeno, también se incluyen los compuestos reactivos tales como el peroxinitrito y trióxido de nitrógeno. ^{[87][88]}

Esto último ha llevado a preferir la denominación general de “Especies Reactivas del Oxígeno (EROs) o de Nitrógeno” (ERNs) con el fin de incorporar aquellas especies químicas que se comportan como oxidantes (peróxido de hidrógeno, ácido hipocloroso, hidroperóxido, ácido nitroso, catión nitrosilo, trióxido de nitrógeno, peroxinitrito, ácido peroxinitroso) y que no son RL. ^[85]

2.2.2 Producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (EROs/ERNs) en vasos sanguíneos

El principal generador de EROs/ERNs en los vasos sanguíneos es el complejo enzimático de la oxidasa dinucleótido nicotinamida fosfato (NADH/NAD(P)H) asociado a la membrana, ^[89] el cual cataliza la reducción de oxígeno molecular utilizando a la NAD(P)H como donador de electrón y generando anión superóxido, reacción que es regulada por la angiotensina II, el TNF- α y el factor de crecimiento derivado de las plaqueta. Éstos factores están asociados con el aumento del grosor íntima-media de las arterias, por lo que la actividad de la NAD(P)H representa un potencial marcador temprano de aterosclerosis. ^[90]

Otro generador de EROs, es el sistema de la enzima xantina oxido-reductasa, la cual cataliza la oxidación de hipoxantina a xantina durante el metabolismo de las purinas. ^[89] Un tercer generador de EROs es la sintasa de NO endotelial (eNOS), que cataliza la oxidación de L-arginina a citrulina y $\cdot\text{NO}$. La eNOS está formada por dos monómeros que presentan un dominio de reductasa para enlazar 3 de sus 4 cofactores al NADPH, la flavina mononucleótido, y la flavina adenina dinucleótido, mientras el cofactor tetrahidrobiopterina ^[89] está unido a un dominio oxigenasa. En ausencia de sus cofactores, los electrones donados por el NADPH no fluyen del dominio oxigenasa al dominio reductasa y se genera anión superóxido. ^{[89][91]}

2.2.3 Acción del $\cdot\text{NO}$ en el endotelio

El $\cdot\text{NO}$ tiene diversas funciones biológicas, la más conocida es la modulación del tono vascular por su acción vasodilatadora. ^[92] También inhibe la agregación plaquetaria, la proliferación de las células musculares lisas y la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio. Su síntesis se favorece principalmente por estímulos físicos como la fuerza de rozamiento. Al tener un electrón desapareado el $\cdot\text{NO}$ puede actuar como RL, reaccionando rápidamente con el oxígeno y con otras ERO e inhibir sus funciones biológicas. ^{[93][94]}

La combinación de anión superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) con óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$) genera peroxinitrito (ONOO^-), un intermediario altamente reactivo y citotóxico el cual está en equilibrio con su forma protonada, el ácido peroxinitroso (ONOOH), pero al sufrir una ruptura homolítica genera radicales hidroxilos ($\cdot\text{OH}$) y dióxido de nitrógeno ($\cdot\text{NO}_2$), quienes en ausencia del sistema de defensa antioxidante endógeno, causan daño colateral de manera directa oxidando, nitrando y nitrosilando proteínas o bien oxidando lípidos, lo que en conjunto se denomina estrés nitrooxidativo (ENO). ^{[93][94]}

Los efectos biológicos del ON están mediados en gran parte por la S-nitrosilación (unión a grupos sulfuro o tioles de residuos de cisteína) de péptidos y proteínas para producir grupos S-nitrosotioles bioactivos. ^[95] En la sangre, la S-nitrosoalbúmina y la S-nitrosohemoglobina constituyen los transportadores más importantes del NO bioactivo circulante. Defectos en la síntesis y/o catabolismo de estos productos pueden afectar la presión arterial. ^[96]

2.2.4 Patología: Disfunción Endotelial

En condiciones de ENO los niveles de EROs tales como $\cdot\text{O}_2^-$, H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$, se encuentran elevados e inactivan al $\cdot\text{NO}$, reduciendo su biodisponibilidad. Así, una reducida biodisponibilidad del $\cdot\text{NO}$, altera el mecanismo de relajación vascular. ^[96] Al mismo tiempo las EROs y RL estimulan al factor nuclear κB (NF- κB) que da lugar a la transcripción de citocinas proinflamatorias como el TNF α y moléculas de adhesión como la P-selectina, E-selectina, VCAM-1 e ICAM-1. Esta cascada de señales en conjunto aumenta la lipoperoxidación, la inflamación y propician lesión endotelial ^{[96][97]}

La función vasodilatadora del endotelio se observa notablemente disminuida en individuos con factores de riesgo como: la hipercolesterolemia, el tabaquismo, la DM2, la HAS y la insuficiencia cardiaca, entre otros. La biosíntesis de NO es normal, pero su biodisponibilidad esta reducida debido a una inactivación oxidativa por la producción excesiva de $\cdot\text{O}_2^-$ en la pared vascular. ^[97] *Eposito y cols.*, observaron una asociación entre el incremento de EO y la disfunción endotelial (DE) en el SM y la RI, que amplifica el conjunto de alteraciones metabólicas y vasculares. ^[98]

En un estado de EO, el incremento de colesterol y especialmente de c-LDL es un factor de riesgo importante en el desarrollo de la aterosclerosis. ^[99] Las EROs propician la oxidación de las LDL (ox-LDL), convirtiéndolas en RL que actúan sobre las células y las células y la matriz

extracelular. En la íntima, los macrófagos al fagocitar las ox-LDL se transforman en células espumosas y secretan factores quimioattractantes que reclutan leucocitos, los cuales se acumulan en la íntima y junto con otros componentes celulares se inicia la formación de la placa ateromatosa.^[100]

2.2.5 Métodos diagnósticos de disfunción endotelial

El endotelio como mayor regulador de la homeostasis vascular, mantiene el balance entre la vasodilatación y la vasoconstricción, la inhibición y la estimulación del crecimiento, la migración de las células del músculo liso, la trombogénesis y la fibrinólisis.^{[101][102]} Cuando este balance se altera se origina DE, marcador temprano para aterosclerosis, potencialmente reversible.^[102] Una de las características principales de la DE es la incapacidad de vasodilatación de los vasos, la cual es mediada por el ON. Se ha propuesto que un defecto en la producción o en la actividad de ON como ocurre en las patologías causadas por ERO, son determinantes en el mecanismo de DE.^{[102][103]}

La función endotelial puede ser evaluada de manera invasiva por angiografía coronaria, utilizando acetilcolina, la cual induce la dilatación dependiente de colina y constricción mediada por el músculo liso.^[103] En arterias coronarias sanas, predomina la dilatación dependiente de endotelio. En presencia de daño endotelial, predomina la vasoconstricción. Los diámetros de las arterias coronarias son comparados por angiografía antes y después de la infusión de acetilcolina.^[103]

La pletismografía en la oclusión venosa es otro método invasivo, se utiliza para medir las respuestas de resistencias vasomotoras del antebrazo durante la infusión de acetilcolina en la arteria braquial.^{[104][105]}

Un método no invasivo de detección de DE es el uso de ultrasonido de alta resolución para medir la vasodilatación mediada por el flujo (VMF) de la arteria braquial. Este método está basado en el hallazgo que altas fuerzas de rozamiento debidas al incremento del flujo estimulan la producción de NO en células endoteliales. Cuando el flujo a través de la arteria braquial se incrementa más del 10%, ocurre la VMF debido a la producción de NO y refleja la respuesta vasodilatadora en las arterias coronarias. ^[106]

La posibilidad de realizar mediciones de función endotelial en forma rápida, segura y reproducible de éste método permite su aplicación en la práctica clínica como un elemento para muestreo de riesgo cardiovascular. ^[104]

Otro método no invasivo, que ha demostrado tener valor diagnóstico y pronóstico por su asociación con los FRCV es la medición del grosor intima-media carotídeo (GIMC), que además es de bajo costo y fácil aplicación. ^[107]

La medición del GIMC y la presencia de placas ateromatosas en las arterias carótidas se valora a nivel de la bifurcación carotídea debido a que tiene una situación hemodinámica similar a la del árbol coronario (separación de flujo y disminución de la fuerza de rozamiento), por lo que en éstas zonas de conflicto hidráulico es más frecuente localizar placas aterosclerosas. ^[108]

La medición del GIMC y la evaluación de la función endotelial, permiten realizar una evaluación diagnóstica y pronóstica de la enfermedad aterosclerótica así como valorar las intervenciones terapéuticas. ^{[107][108]}

2.2.6 Patología: Daño oxidativo a biomoléculas: lípidos, proteínas y carbohidratos

La mayoría de las macromoléculas biológicas pueden ser oxidadas por los RL sin embargo, las biomoléculas más lábiles son los lípidos. [85]

2.2.6.1 Peroxidación de lípidos (LPO)

La LPO es particularmente destructiva, ya que se desarrolla como una reacción autopropagante.

[109] Se inicia cuando un radical ($\cdot\text{OH}$) ataca un ácido graso poliinsaturado (AGP) y le quita un átomo de hidrógeno al grupo metileno adyacente al doble enlace, lo que da lugar a un RL peroxilo ácido, el cual induce una reacción en cadena al tomar átomos de hidrógeno de otros lípidos de forma similar a como lo hace el hidroxilo.

[109]

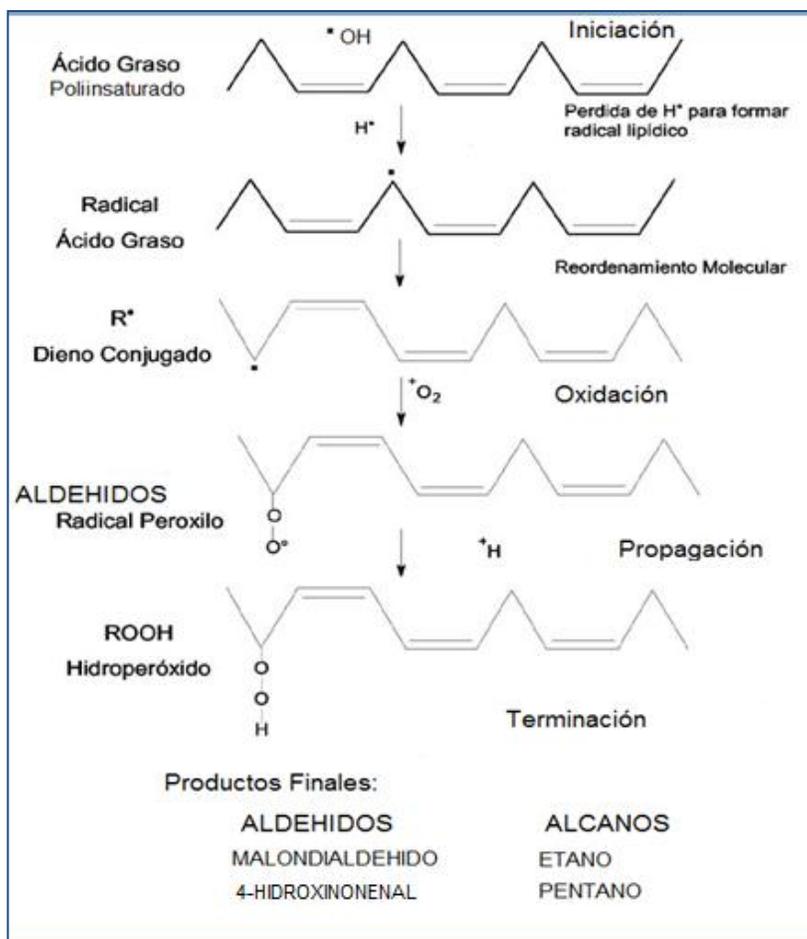


Fig. 6 Mecanismos de LPO

La adición de un hidrógeno al peroxilo genera un hidroperóxido el cual es estable, pero algunos compuestos de hierro reducido catalizan su descomposición para dar origen a radicales alcóxido lipídicos, que también estimulan la cadena de reacciones de la peroxidación lipídica, al extraer átomos de hidrógeno de otros ácidos grasos no saturados.

Los productos finales de la LPO se degradan, originando nuevos RL y una amplia variedad de compuestos citotóxicos como los aldehídos entre ellos 4-hidroxinonenal (4HNE) y el malondialdehído (MDA). Las consecuencias del daño en la estructura molecular de AGP son más evidentes cuando estos lípidos forman parte de las membranas celulares, ya que se altera su cohesión, fluidez y perfusión metabólica. ^{[109][Fig.6]}

2.2.6.2 Oxidación de proteínas

Si bien las proteínas también constituyen un blanco para las ERO, su acción es menos dramática que la de los lípidos, debido al progreso lento de las reacciones. ^[110] Se ha observado que cantidades significativas de aminoácidos aromáticos o sulfurados en una estructura proteínica la tornan más vulnerables a los RL. ^[111]

La oxidación de proteínas puede ser reversible o irreversible. La oxidación reversible de proteínas consiste en la activación o desactivación de una proteína, como en el caso de la S-nitrosilación, donde se forman puentes disulfuro entre grupos tioles de cisteínas por medio de la unión con trióxido de nitrógeno. ^[111]

La oxidación irreversible se da por medio de cuatro mecanismos: la formación de enlaces proteína-proteína, ruptura de enlaces peptídicos, carbonilación y nitración. ^[112]

La formación de enlaces proteína-proteína y la ruptura de enlaces peptídicos se origina por el ataque oxidativo al esqueleto de carbono de un polipéptido. ^[111] Este inicia cuando un radical ($\cdot\text{OH}$) toma un átomo de hidrógeno del carbono α de un residuo de aminoácido dejando en la proteína un radical alquilo en el carbono, el cual reacciona con oxígeno para formar un radical alquiloperoxilo y un radical alcoxilo. Ambos pueden generar reacciones con otros aminoácidos en la misma proteína o en otra, lo que produce un nuevo radical, capaz de conducir reacciones similares.

La oxidación por generación de grupos carbonilos se lleva a cabo químicamente por cuatro rutas principales. ^{[111][112]} La primera es la oxidación directa de prolina, lisina, arginina y treonina por reacción con EROs. La segunda involucra la ruptura de la cadena polipeptídica por medio de la ruta de la α -amidación o por la oxidación de residuos de ácido glutámico. Las dos rutas de oxidación restantes implican reacciones secundarias con moléculas que presentan grupos carbonilos reactivos como son los productos de la peroxidación lipídica (MDA, 4-hidroxi-2nonenal) con el grupo sulfhidrilo de cisteína y/o por reacción de los productos de la oxidación de azúcares (cetoaminas, cetoaldehídos) con el grupo amino de residuos de lisina. ^[112]

La nitración de los residuos de tirosina de diversas proteínas por el **ONOO⁻**, se da de manera indirecta, al reaccionar con sus derivados como $\cdot\text{OH}$ y el $\cdot\text{NO}_2$ con el aminoácido tirosina convirtiéndola en 3-nitrotirosina (3-NT), el cual se ha utilizado como marcador, por encontrarse en numerosos modelos experimentales de enfermedad. ^{[95][111][113]}

El **ONOO⁻** causa también la nitración de tirosinas de diversas proteínas, substratos de tirosina-quinazas que participan en mecanismos de transducción de señales de crecimiento y de diferenciación celular a través de la formación de fosfotirosinas. La nitración de tirosinas se da de manera indirecta por una modificación covalente que impide la fosforilación de ese residuo y la inhibición de cascadas de transducción generándose 3-NT, el cual ha sido propuesto como uno de los mecanismos centrales para los fenómenos de apoptosis inducidos por peroxinitritos ^[95] La nitración de tejidos expuestos a niveles patológicos de $\cdot\text{NO}$ constituye una huella de que el peroxinitrito fue formado y reaccionó en el compartimiento celular estudiado ^{[95][113]}

2.2.6.3 Oxidación de carbohidratos

Los carbohidratos, como la glucosa y otros monosacáridos relacionados, sufren peroxidación bajo ciertas condiciones y forman compuestos dicarbonílicos y peróxido de hidrógeno. ^[114] La importancia de este hecho radica en que estas biomoléculas una vez activadas pueden interactuar con otras moléculas. ^[114]

El ADN también constituye un blanco de ataque por parte de las EROs, principalmente el ADN mitocondrial. Cuando esto sucede el ADN sufre mutaciones y puede derivar en la muerte celular. ^[95]

El EO desempeña un papel fundamental en cualquier patología crónica como la DM2, la angiogénesis, las neuropatías y las nefropatías, entre otras. ^{[89][91]}

Como indicadores químicos de daño oxidativo normalmente se determinan los productos de reacción de radicales libres oxidativos con las biomoléculas, como el MDA o sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) que son productos de la LPO, la 8-OH-deoxiguanosina, producto de la oxidación de los ácidos nucleícos y los grupos carbonilo de las proteínas oxidadas. ^{[95][113]}

2.3 Metformina

La metformina es un fármaco del grupo de las biguanidas. ^[115] El efecto hipoglucemiante de este grupo fue observado en 1918 y desde 1956 se utiliza en la clínica. ^[116]

Dentro del grupo de las biguanidas, las primeras fueron la fenformina y la butformina, las cuales fueron retiradas del mercado en la década del 70 debido al riesgo elevado de acidosis láctica. ^{[115][116][117]} En la figura 7 se muestra la estructura química de la metformina.

La metformina es considerada un “insulino sensibilizador”, dado que disminuye los niveles de glucosa sin aumentar la secreción de insulina. ^[118] Reduce la producción hepática de glucosa y aumenta la acción de la insulina en el músculo y la grasa. ^{[115][116][117]}

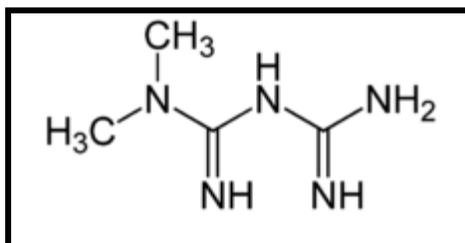


Fig. 7 Estructura química metformina

También disminuye la absorción intestinal de glucosa e indirectamente aumenta la respuesta de las células β pancreáticas, al reducir la oxidación de ácidos grasos libres, ^[117] reduce la producción de andrógenos y aumenta el estradiol en el Síndrome de Ovario Poliquístico (SOP). ^[117]

Tiene gran cantidad de efectos beneficiosos adicionales en portadores de DM2, incluyendo la disminución de la hiperinsulinemia, mejoría del perfil lipídico, aumento de la fibrinólisis y la reducción de peso. ^{[117][119]}

2.3.1 Farmacocinética

La metformina tiene una biodisponibilidad del 50-60%. No se une a proteínas plasmáticas. Tiene una vida media de 3 horas. Su absorción es principalmente en el intestino delgado. Se distribuye rápida y ampliamente en todo el organismo. Su excreción es urinaria en un 90% como medicamento sin cambio, posiblemente por secreción tubular. Su uso debe ser restringido solamente a aquellos pacientes con funcionamiento renal normal (creatinina sérica < 1.5mg/dl en hombres y <1.4mg/dl en mujeres). ^{[115][119]}

Otras contraindicaciones incluyen disfunción hepática, deshidratación, acidosis metabólica aguda o crónica y alcoholismo. Deberá ser suspendida temporalmente en cualquier paciente que sea sometido a una intervención quirúrgica o que reciba medios de contraste. ^{[117][118]}

Algunos medicamentos como cimetidina y furosemide, incrementan su concentración plasmática y otros como digoxina, morfina, ranitidina, trimetropim y vancomicina presentan competencia por presentar todos ellos excreción vía renal. ^{[115][119][120]}

Su presentación es en tabletas de clorhidrato de metformina de 500, 850 y 1000mg. La dosis se puede incrementar en una tableta cada 1 o 2 semanas, hasta un máximo de 2500 mg para el tratamiento de la DM2. ^[115]

Las reacciones adversas más frecuentemente mencionadas son: náuseas y vómitos en un 6-25%, diarrea en un 10-53%, flatulencia en un 12%, disminución de vitamina B12 en un 7% y cefalea en un 6%. ^{[115][116][117][119]} La tasa de incidencia de acidosis láctica es de 5 por 100,000 pacientes tratados. ^[115]

2.3.2 Farmacodinamia

La metformina es ampliamente utilizada para el manejo de DM2 como sensibilizador de la insulina. ^[119] Ejerce sus principales acciones metabólicas y regulación de la glucosa en el hígado sin embargo, metformina actúa sobre una otros tejidos, es decir, músculo esquelético, tejido adiposo, endotelio, y ovario. ^{[115][117][119]}

2.3.2.1 Hígado

a. Efecto regulador de la glucemia

Metformina induce un efecto regulador de la glucosa en hígado por medio de:

- 1) Incremento de actividad enzimática de la glucógeno sintetasa en la vía de la glucogenogénesis, disminuyendo de esta manera las concentraciones de glucosa a nivel intracelular, y de esta forma la glucemia. ^[117]
- 2) Activación de la AMP-Cinasa, enzima de reguladora de la homeostasis energética para las rutas metabólicas de carbohidratos y lípidos. Esta AMP-Cinasa, posee una actividad fosforilativa sobre un conjunto de factores nucleares que disminuyen su actividad de promotores de la transcripción (Hepatocyte Activity Mediated Promoters) de diversos genes. Entre estos genes se encuentran el gen de la glucosa- 6 fosfatasa, enzima involucrada en la regulación de la neoglucogénesis. ^{[121][122]}

b. Efecto hipolipemiante

- 1) Disminución de la lipogénesis.

La activación de la AMPK, genera la fosforilación y al mismo tiempo la inactivación de la enzima Acetil CoA carboxilasa (ACC), lo que provoca una disminución en la concentración de AG de origen endógeno; disminuyendo de esta manera los triglicéridos y las lipoproteínas. ^{[123][125]}

- 2) Aumento de la oxidación de ácidos grasos.

La inactivación de la ACC produce una disminución de la concentración de malonil CoA; estas bajas concentraciones de malonil CoA modulan de manera alostérica y

positiva a una enzima denominada Acil Carnitin-Transferasa 1 (enzima principal en la regulación de la oxidación de AG disminuyendo la concentración de ácidos grasos.

[124]

3) Disminución síntesis de colesterol

La activación de la MAPK, genera fosforilación y al mismo tiempo inactivación de la HMG Co-A reductasa, enzima principal en la regulación del metabolismo de colesterol,

[124] [125] por lo que la metformina disminuye los niveles de colesterol.

2.3.2.2 Ovario

La metformina puede actuar sobre el ovario, ya sea directamente o indirectamente mediante la inhibición de la hiperinsulinemia. [119] En las células de la teca, la metformina inhibe la

actividad del CYP17 a través de la reducción de los niveles de insulina inducida por la actividad de PI3K. [126] Al reducir los niveles de insulina, metformina inhibe la expresión del

receptor de la hormona luteinizante (LH), HSD3-b y CYP11A1 en células de la granulosa. [127]

Estos mecanismos inhiben la producción excesiva de esteroides sexuales y de la luteinización prematura, y por consiguiente, atenúan el exceso de andrógenos y promueven

la ovulación. [126][127]

2.3.2.3 Músculo esquelético

En el músculo esquelético la metformina mejora la captación periférica de glucosa, en presencia de insulina, por medio de la activación de AMPK la cual promueve la translocación

a la membrana plasmática de los transportadores de glucosa-4 (GLUT 4), permitiendo de esta manera la entrada de glucosa al espacio intracelular. [117] Además de inhibir la

lipogénesis, mientras se aumenta la oxidación de ácidos grasos. [123]

2.3.2.4 Tejido adiposo

La metformina al inhibir la fosforilación de ERK ½ en adipocitos inhibe la lipólisis, ^[121] este efecto se puede contrarrestar debido a la expansión del tejido adiposo a través de la estimulación de la oxidación de ácidos grasos y la inhibición de la lipogénesis en la grasa subcutánea. ^[124] Este efecto antiadipogénico contribuye a reducir la masa grasa. La acción antilipolítica de la metformina podría contribuir a la sensibilización de la insulina a través de la disminución de los niveles sistémicos de AGL. ^[117] Un mecanismo dependiente de la AMPK es mejorar la captación de glucosa por el tejido adiposo visceral. ^[129]

2.3.2.5 Endotelio

La acción de la metformina sobre la vasculatura, depende de la inhibición de la glucotoxicidad, de la reducción de los niveles circulantes de los AGEs, así como la disminución de la resistencia a la insulina. ^[128] A nivel molecular, estos mecanismos tienen sinergia para establecer un equilibrio favorable entre las cascadas dependientes de PI3K y AMPK. ^{[119][121][130]} El tratamiento con metformina puede suprimir al NF-κB, lo que disminuye la producción de citocinas pro-inflamatorias, vasoconstrictores como la endotelina (ET-1), protrombóticos como el activador de plasminógeno 1 (PAI-1) y moléculas de adhesión; ^[131] aumentando la producción de eNOS y de NO en células endoteliales. ^{[131][132]} A través de estos mecanismos la metformina puede contribuir a la mejora de la función endotelial y la desaceleración de la lesión aterosclerosa. ^{[129][130][132][133]}

2.3.3 Ventajas del uso de metformina en SM

Metformina, se ha utilizado en el tratamiento de pacientes con DM2 desde 1995 en nuestro país. ^[132] A continuación describiremos el efecto de metformina en los diferentes elementos del SM y el enfoque de esta tesis, el sistema cardiovascular.

a. Disminución de la glucosa

El estudio UKPDS ^[135] demostró que la adición de metformina a la dieta resultó en una mejoría muy importante del control glucémico en comparación con la dieta sola. La evidencia también sugiere que las propiedades hipoglucemiantes de la metformina son dependientes de la dosis, por lo que 2000 mg es considerada la dosis óptima diaria, con un cambio en la HbA1c respecto al valor basal de 0.7% después de 14 semanas de tratamiento. ^[135]

b. Peso corporal

Hay una considerable variabilidad entre los estudios sobre el efecto de metformina en la pérdida de peso, pero la reducción del peso corporal se observa a menudo. Dos meta-análisis de estudios controlados, concluyeron que no hubo diferencia en el uso de metformina comparada con placebo o la dieta sobre el peso corporal o el IMC en los pacientes con DM2. ^{[136][137][138]} Esta conclusión se ve reforzada por el estudio UKPDS, ^[135] donde después de 10 años, el peso no fue significativamente diferente entre la metformina y placebo.

c. Perfil lipídico

La metformina se ha asociado con mejoras modestas en el perfil lipídico. ^[117] Esto se refleja generalmente en reducciones en el colesterol total, c-LDL y triglicéridos mientras que c-HDL no suele verse afectado por metformina. ^{[139][140]}

El tratamiento con metformina en pacientes con DM2 suele asociarse a la disminución modesta del peso corporal, una mejoría leve de los parámetros lipídicos, especialmente triglicéridos y c-LDL y mejoría de la función endotelial. ^{[134] [139] [141] [142]}

A pesar de que los efectos beneficiosos de la metformina sobre el perfil lipídico, los beneficios globales sobre el riesgo cardiovascular del UKPDS ^[135] son modestos.

d. Presión arterial

En algunos modelos animales, la metformina parece tener una acción vascular. En ratas espontáneamente hipertensas, se ha reportado disminución de la PA media, frecuencia cardiaca, posiblemente a través de la modulación del tono adrenérgico. ^[143] La disminución de la PA se ha observado en humanos tratados con metformina. ^{[187] [188]} Los mecanismos de acción antihipertensivos propuestos para metformina son complejos e incluyen acciones vasodilatadoras independientes y dependientes de insulina. ^[189] En células de músculo liso vascular de ratas, la metformina disminuye la vasoconstricción por aumento de la actividad de la bomba Na^+/K y producción de NO lo que ocasiona una disminución de la concentración de calcio intracelular (Ca_i^{2+}). ^[190] A pesar de estas evidencias los resultados de los estudios clínicos no son concluyentes.

e. Función Endotelial

Estudios *in vitro* han mostrado que la metformina disminuye las EROs en células endoteliales de aorta por inhibición de la NAD(P)H oxidasa, ^[146] del NFκB, ^[131] un aumento en las enzimas antioxidantes y disminución de marcadores de lipoperoxidación en modelos de ratas diabéticas. ^[133]

Existe evidencia de que la metformina mejora la función endotelial. En un estudio controlado con placebo en 44 pacientes con DM2 tratados con metformina, se evaluó la función endotelial por medio de pletismografía con infusión de acetilcolina. Se observó una mejoría en la vasodilatación dependiente de endotelio, ^[147] y una reducción significativa en las moléculas de adhesión celular VCAM-1 y Selectina E, ^[148] lo que refleja la supresión de la activación endotelial no explicada por los cambios en la glucosa. Estos resultados también se han reportado en pacientes con SM, ^[134] síndrome de ovario poliquístico (SOP), ^[149] así como en familiares de primer grado de pacientes con DM2. ^[150]

Sin embargo, también existe evidencia contradictoria que no muestra mejoría sobre la función endotelial con metformina. ^[151]

El estudio MEFISTO, ^[152] realizado en población mexicana del ISSSTE con SM, mostró que el tratamiento con metformina disminuyó los niveles de carbonilos, los niveles de productos avanzados de la oxidación proteica (AOPP), los niveles de PCR y aumento los niveles de nitratos-nitritos, disminuyendo así los niveles de nitrooxidación e inflamación.

3. JUSTIFICACIÓN

El SM es un tema de debate en la comunidad médica, y es un factor de riesgo para las enfermedades que causan mayor mortalidad a nivel mundial. Existe una alta prevalencia de SM en nuestro país, se estima que el 40% de los afectados son menores de 40 años.

Con el fin de disminuir la morbilidad y mortalidad de los pacientes con SM, líneas recientes de investigación se han enfocado en la modificación de la dinámica vascular, pues se considera a la hiperinsulinemia como el factor etiopatogénico clave para el desarrollo de disfunción endotelial, aterosclerosis y un estado aumentado de estrés oxidativo y nitrosativo.

El interés en el uso terapéutico de la metformina, medicamento utilizado desde 1995, como sensibilizador de la insulina, ha sido impulsado por el reconocimiento de sus efectos pleiotrópicos en varios tejidos que se ven afectados por la resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia secundaria.

Convencidos que debemos aportar un nuevo conocimiento científico que pueda utilizarse como herramientas preventiva, este trabajo plantea la posibilidad que el uso de dosis bajas de metformina en pacientes con SM, cambie las concentraciones plasmáticas de los marcadores de estrés oxidativo y nitrooxidativo. Estas modificaciones redundarán en una mejoría de las cifras de presión arterial y de la función endotelial, representando un aporte trascendente en el área clínica para el manejo del paciente hipertenso con SM.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Observar el efecto de metformina sobre los niveles séricos de los marcadores de estrés oxidativo y nitrosativo en pacientes hipertensos con SM que reciben tratamiento con metformina.

4.2 Objetivos Particulares

1. Determinar las concentraciones plasmáticas de MDA en pacientes hipertensos con SM tratados y no tratados con metformina.
2. Determinar las concentraciones plasmáticas de Carbonilos en pacientes hipertensos con SM tratados y no tratados con metformina.
3. Determinar las concentraciones plasmáticas de Nitritos en pacientes hipertensos con SM tratados y no tratados con metformina.
4. Determinar las concentraciones plasmáticas de S-nitrosilación en pacientes hipertensos con SM tratados y no tratados con metformina.
5. Evaluar la reducción IMC y cintura abdominal en pacientes hipertensos con SM tratados y no tratados con metformina.
6. Evaluar la función endotelial en pacientes hipertensos con SM tratados y no tratados con metformina.
7. Medir el GIMC en pacientes hipertensos con SM tratados y no tratados con metformina.

8. Correlacionar los niveles de nitrooxidación con el GIMC en pacientes hipertensos con SM tratados y no tratados con metformina.
9. Correlacionar los niveles séricos de los marcadores de nitrooxidación con la función endotelial en pacientes hipertensos con SM tratados y no tratados con metformina.
10. Correlacionar los niveles séricos de los marcadores de nitrooxidación con las cifras de PA en pacientes hipertensos con SM tratados y no tratados con metformina.

5. METODOLOGÍA

5.1 Diseño y Población de Estudio

Se realizó un estudio prospectivo longitudinal comparativo, de asignación aleatoria. Los pacientes incluidos, fueron reclutados durante el periodo de Enero 2010 a Enero 2011, en el servicio de Cardiología del Hospital Regional 1o de Octubre ISSSTE en el Distrito Federal, las muestras sanguíneas para marcadores de nitrooxidación obtenidas se procesaron en el Laboratorio Multidisciplinario de Bioquímica-Graduados en la Escuela Superior de Medicina (ESM) del Instituto Politécnico Nacional.

5.2 Variables del Estudio

Las variables independientes son las concentraciones séricas de marcadores de nitrooxidación determinado por MDA, carbonilos, nitritos, nitrotirosinas y S-nitrosilación, para los cuales no existe un parámetros de referencia, por lo cual cada paciente será su control antes y después de la intervención farmacológica y la comparación entre el grupo tratado con metformina y el grupo control (no tratado con metformina). Las muestras sanguíneas se tomaron con un periodo de ayuno de 8 horas.

Las variables dependientes que se manejaron durante el estudio fueron:

Cifras de presión arterial sistólica y diastólica en unidades de mmHg, utilizando los criterios de la Federación Internacional de Diabetes (IFD 2005) ^[14] la cual establece el diagnóstico de hipertensión en el contexto de SM con cifras de PA $\geq 130/85$, de reciente diagnóstico o bien cualquier cifra de PA si el paciente recibe tratamiento antihipertensivo.

Para la medición de la presión arterial sanguínea se utilizó un esfigmomanómetro digital, modelo Omron 705IT validado por FDA (Food Drug Administration) para estudios clínicos. Se determinó la PA en el brazo derecho del paciente mientras éste se encontraba en posición sedente después de cinco minutos de reposo. Se midió tres veces la PA con un minuto de diferencia y se obtuvo el valor promedio de las tres mediciones.

El tratamiento de esta condición clínica se estableció en base a las recomendaciones de la guía de tratamiento farmacológico mexicano 2009 (Addendum a la NOM 030). ^[153] Iniciando con un IECA, en caso de presentar intolerancia al IECA se cambió el tratamiento a un ARAII, en caso de no lograrse la meta de control de la HAS se agregó al manejo un calcio antagonista. La cifra meta para los pacientes fue de $\leq 130/85$ mmHg.

La medición del GIMC se realizó por medio de un equipo de ultrasonido cardiovascular marca AcusonTM CV70 Siemens y un transductor vascular L10-5. Las mediciones se efectuaron a un cm de la bifurcación de la carótida primitiva de forma bilateral. Se consideraron valores patológicos un GIMC ≥ 0.9 mm. ^[108]

La medición de la función endotelial se realizó mediante la evaluación de la VMF de la arteria humeral, de acuerdo con el procedimiento señalado por las Guías del Colegio Americano de Cardiólogos. ^[106] Se consideró disfunción endotelial a la respuesta de vasodilatación $\leq 10\%$ en el diámetro de la arteria humeral.

Ambas pruebas ecocardiográficas fueron realizadas por un mismo investigador cegado al estudio, para evitar variabilidad inter-observador. Los instrumentos de medición se mantuvieron en mantenimiento preventivo cada tres meses.

5.3 Tamaño de muestra

Para calcular el tamaño de la muestra del estudio se utilizó el método estadístico inferencial de diferencia de proporciones y de acuerdo a los cambios en las concentraciones plasmáticas de AOPP, ^[200] mediante la siguiente fórmula:

$$n = \left[\frac{Z\alpha / 2P(1-P) + Z\beta / P1(1-P1) + P2(1-P2)}{P1-P2} \right]^2 = 21.6 \approx 22$$

Donde $Z\alpha$ es 1.96, $Z\beta$ es 0.842, $p1$ es .11, $p2$ es .49, p es 3. Esta estimación permitirá un nivel α de 0.05 y una potencia de 80%. Se tomará un 10% adicional por posible pérdida, por lo que el tamaño de muestra fue de 25 sujetos en cada grupo.

5.4 Criterios de Inclusión, No-inclusión y Eliminación

Se seleccionaron pacientes del estudio Lindavista del Servicio de Cardiología del Hospital Regional 1o de Octubre del ISSSTE del Distrito Federal, el cual había sido aprobado por el comité de ética. Se obtuvo previamente el consentimiento informado de cada paciente al momento de ser seleccionado.

Los pacientes cumplían con el criterio de HAS además de cumplir con al menos 2 criterios más de los establecidos por la IFD. ^[15] [Tabla 3]

ELEMENTO	PARÁMETROS
Cintura abdominal	≥80 cm mujeres y ≥90 cm en hombres
Glucemia en ayuno	≥100mg/dl
Presión arterial	≥130/85 mmHg
Triglicéridos	≥150 mg/dl
c-HDL	≤50 mg/dl en mujeres ≤40 mg/dl en hombres

Tabla 3. Criterios de IFD para el diagnóstico de SM

Los pacientes seleccionados fueron de ambos géneros, con un rango de edad de 30 a 65 años, sin antecedentes de DM, complicación vascular coronaria, cerebral o periférica, enfermedades estructurales del corazón, insuficiencia cardiaca, hepatopatías, neuropatías, nefropatías, falla renal, SIDA y alcoholismo.

Se utilizaron como criterios de eliminación de los pacientes, la falta de cumplimiento a las visitas programadas o eventos adversos serios causados por la metformina, los cuales fueron notificados al Comité de Ética y se mantuvieron en seguimiento a los individuos aun a pesar de ser eliminados del estudio.

5.5 Aleatorización

Para la distribución de los pacientes se utilizó una tabla de números aleatorios y la primera asignación fue al grupo de metformina posteriormente se asignó 1:1, quedando conformados 25 pacientes en cada grupo:

Grupo problema: pacientes con HAS y SM, que recibieron tratamiento con metformina vía oral en la dosis de 850 mg cada 24 horas, modificaciones al estilo de vida y tratamiento para patologías asociadas del SM.

Grupo control: pacientes con HAS y SM que recibieron modificaciones al estilo de vida y tratamiento para patologías asociadas del SM.

5.5 Procedimiento para seguimiento de pacientes

En cada visita se realizó una revisión clínica, la cual consistió en un interrogatorio directo con énfasis en hábitos alimenticios, ejercicio, tabaquismo, antecedentes cardiovasculares, hepáticos y renales. Exploración física donde se realizaron las siguientes acciones: medidas antropométricas como peso, talla, cálculo del IMC, perímetro abdominal y toma de presión arterial. Además, se realizó la medición del GIMC bilateral por medio de ultrasonido y medición de la función endotelial.

Se tomó una muestra sanguínea con 8 horas de ayuno para valorar la función hepática, renal, perfil de lípidos y concentraciones séricas de los marcadores de nitrooxidación.

El plan de alimentación consistió en una dieta de reducción con 20% de proteínas 50% de carbohidratos y 30% de lípidos.

El tratamiento para la dislipidemia se inició con una estatina, estableciendo la meta terapéutica inicial de c-LDL < 100 mg/dl y el manejo con fibratos se añadió e los casos de TG \geq 400mg/dl o en la visita de 6 meses valores \geq 250mg/dl.

Se realizaron visitas de seguimiento a los 6 y 12 meses, las cuales consistieron en interrogatorio directo realizando énfasis en datos descritos previamente así como en eventos adversos serios y no serios, comparación de resultados de laboratorio, ajuste de tratamientos, valoración de las variables antropométricas peso, talla, IMC, perímetro abdominal, toma de muestra sanguínea con 8 horas de ayuno para evaluar la función hepática y renal, así como la medición de concentraciones séricas de los marcadores de nitrooxidación, medición del GIMC bilateral y VMF por ultrasonido.

Las muestras sanguíneas obtenidas de los pacientes para medir las concentraciones plasmáticas de nitrooxidación se procesaron en el Laboratorio Multidisciplinario de Bioquímica de Graduados de la Escuela Superior de Medicina (ESM), para ello se utilizó las técnicas de los marcadores de oxidación de lípidos, proteínas y biodisponibilidad de NO, MDA, carbonilos, nitritos y S-nitrosilación.

6. METODOLOGÍA ANALÍTICA

6.1 Medición del grosor íntima-media carotideo (GIMC)

Se determinó el GIMC mediante la obtención de la imagen de ultrasonografía de la arteria carótida común derecha e izquierda, con un aparato de ecografía de alta resolución (ultrasonógrafo Siemens modelo Acuson CV70) y un transductor vascular L10-5.

Se colocó al paciente en posición decúbito dorsal, el cuello en hiperextensión, se identificó el pulso carotideo en ambos lados del cuello, se observó la imagen de la arteria carótida común. Se define el GIM como la distancia entre las 2 líneas ecogénicas que se observan en la pared arterial, a un cm de la bifurcación, la cual se toma como punto de referencia. Un centímetro por detrás de la bifurcación se realiza la medición del primer y segundo puntos del comienzo de la capa íntima, hasta el final de la capa media, el punto uno será el anterior y el punto dos el posterior; a nivel de la bifurcación se realizó la medición del tercer y cuarto puntos, en la capa anterior el tercero y en la posterior el cuarto; se calculó el promedio de los cuatro puntos para obtener el valor de referencia. [Fig. 8] Se consideró un aumento patológico a un valor $\geq 0.9\text{mm}$. [108]

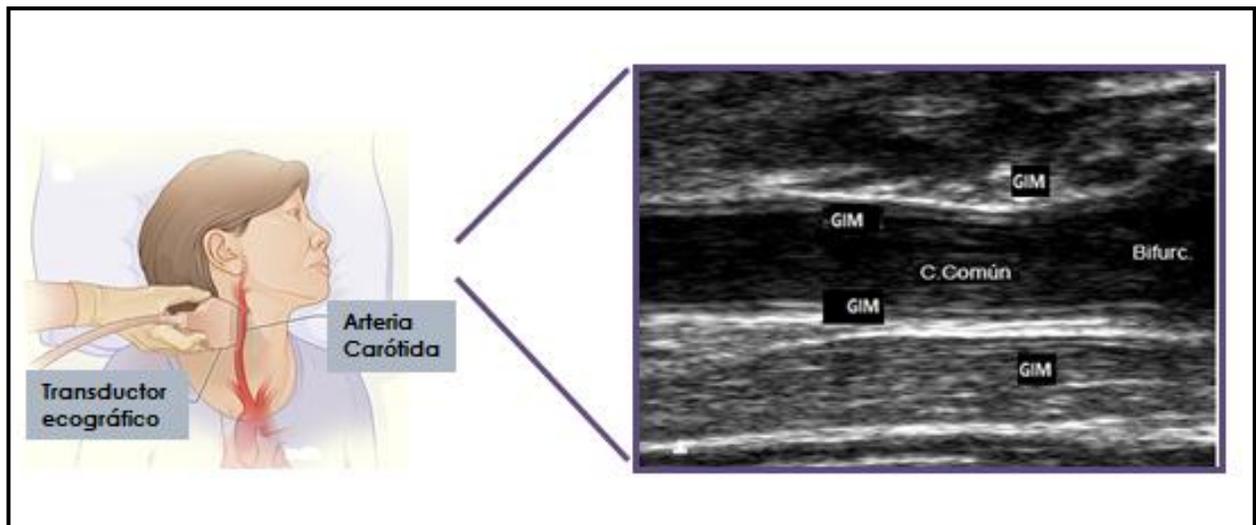


Fig.8 Valoración de función endotelial por medición de GIMC

6.2 Vasodilatación Mediada por Flujo (VMF)

Este método se basa en que existen varios estímulos que pueden hacer que la célula endotelial libere sustancias vasodilatadoras y uno de ellos es la fuerza de rozamiento o impacto que se produce al liberar el aire del manguito después de una etapa de isquemia.

[203] Para realizar esta prueba el paciente se colocó en posición de decúbito dorsal, el brazo derecho en extensión, se localizó el pulso humeral, se colocó el transductor lineal del ultrasonido para medir el diámetro de la arterial humeral y mediante doppler pulsado se obtuvo el espectro del flujo, para así, medir la velocidad del mismo. Posteriormente se realizó la compresión con el manguito del esfigmomanómetro a nivel del antebrazo derecho hasta una presión de 220mmHg, permaneciendo así durante 5 minutos después de los cuales se liberó la presión y se realizó nuevamente la medición del flujo en la arteria humeral. [Fig. 9] Se tomó como parámetro el porcentaje del cambio de diámetro. Cuando el cambio fue $< 10\%$ se consideró con disfunción endotelial. [106]

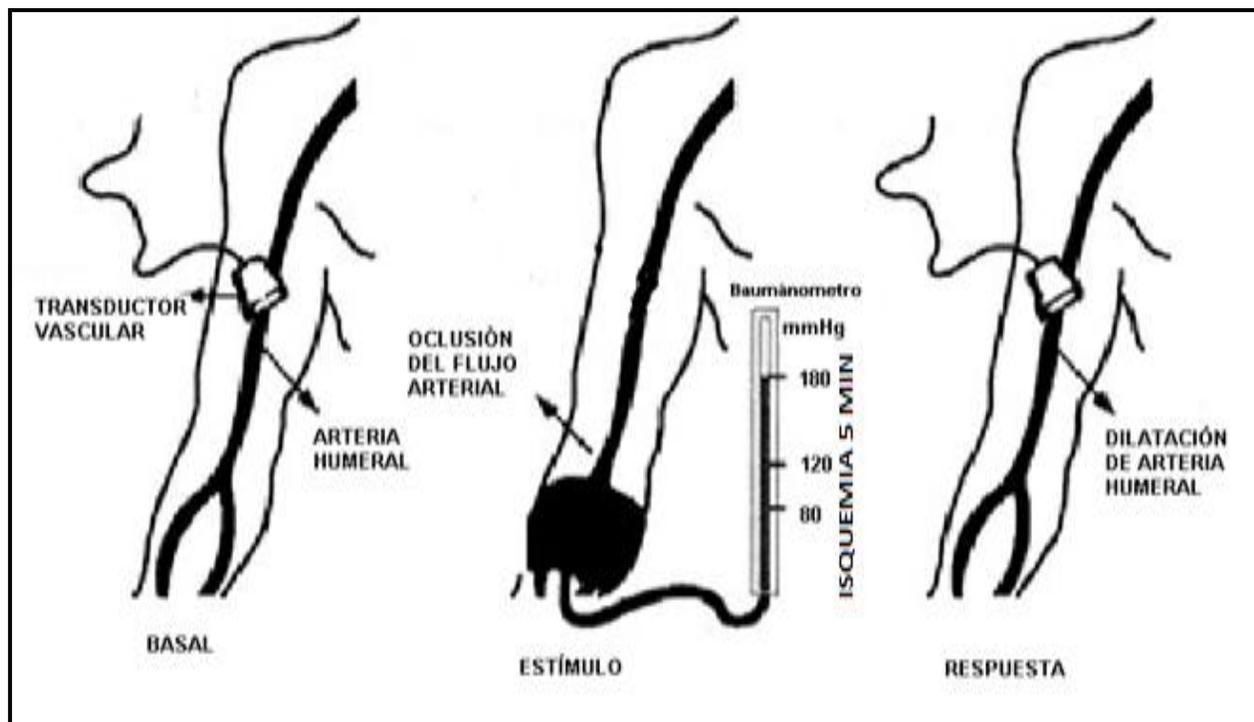


Fig. 9 Valoración de función endotelial por medio de VMF

6.3 Determinación de proteínas

Para la determinación de proteínas utilizamos el método de Lowry, el cual se basa en la reacción de las proteínas con el reactivo de Follín, que da un complejo con color. Este reactivo es una disolución de tungstato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico y ácido clorhídrico. El mecanismo del proceso es el siguiente: el Cu^{2+} , en medio alcalino, forma un complejo con los enlaces peptídicos de las proteínas reduciéndose a Cu^+ este ion, así los residuos de tirosina y triptófano de las proteínas, reaccionan con el reactivo de Follin, produciendo inicialmente un producto inestable, que se reduce para formar un compuesto coloreado. [Fig. 10] La intensidad del color depende de la cantidad presente en las proteínas de estos aminoácidos aromáticos y será proporcional a la concentración de proteínas en la disolución. Se cuantifica la absorbancia en un espectrofotómetro a 550 nm. [154]

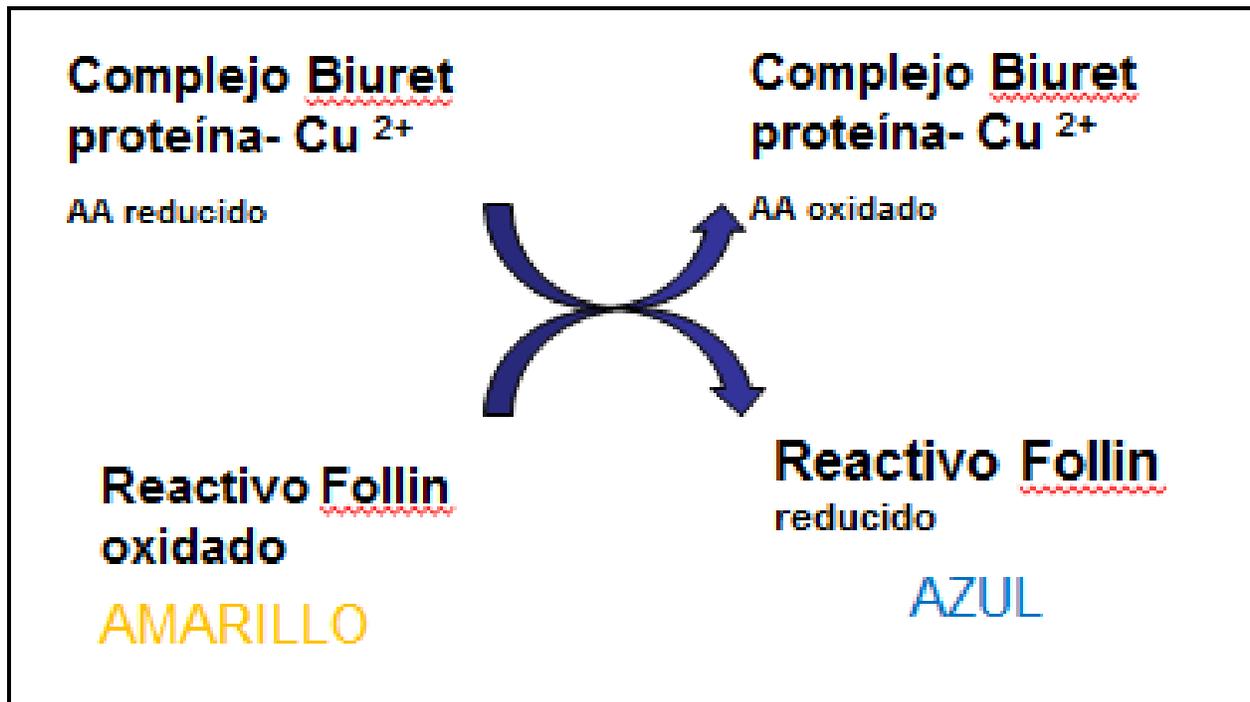


Fig. 10 Esquema de la reacción de Lowry

6.4 Determinación de carbonilos

Para la determinación de carbonilos se utilizó el método de la formación de osazonas, en el cual los grupos carbonilos expuestos unidos a 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) forman un aducto estable o hidrazona la cual absorbe la luz ultravioleta. Se cuantifica la absorbancia por espectrofotometría a 375 nm. ^{[155][Fig. 11]} El coeficiente de extinción molar de la dinitrofenilhidrazina se utiliza para calcular la concentración de carbonilos, donde C es la concentración de dinitrofenilhidrazina (osazona/ml): $\epsilon=22,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}= 22,000/10^6\text{nmol/ml}$

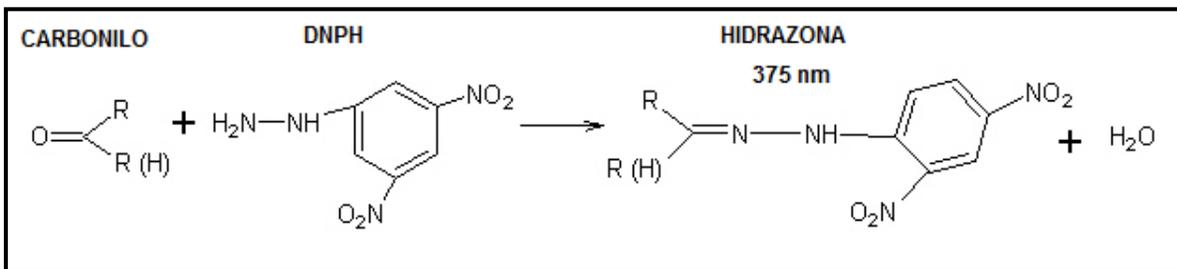


Fig. 11 Esquema de la reacción de formación de osazonas

6.5 Determinación de Nitritos

Los productos finales de NO *in vivo* son nitritos NO^{2-} y nitratos NO^3 la proporción relativa de NO^{2-} y NO^3 es variable y no puede ser determinada con certeza. El mejor índice para la producción total de NO es la determinación de ambos NO^{2-} y NO^3 . [156]

Para ello utilizaremos una técnica sencilla de dos pasos: el primer paso consiste en la conversión de nitrato a nitrito por la enzima nitrato reductasa, presente en la cepa *E. coli* 17775; el segundo paso es la adición del reactivo de Griess (N-sulfanilamida+ N-naftiletilendiamida) que convierte el nitrito en un producto azoado de color púrpura el cual es medible por espectrofotometría a 554 nm determinando así la concentración de NO^{2-} . [156] [Fig.

12]

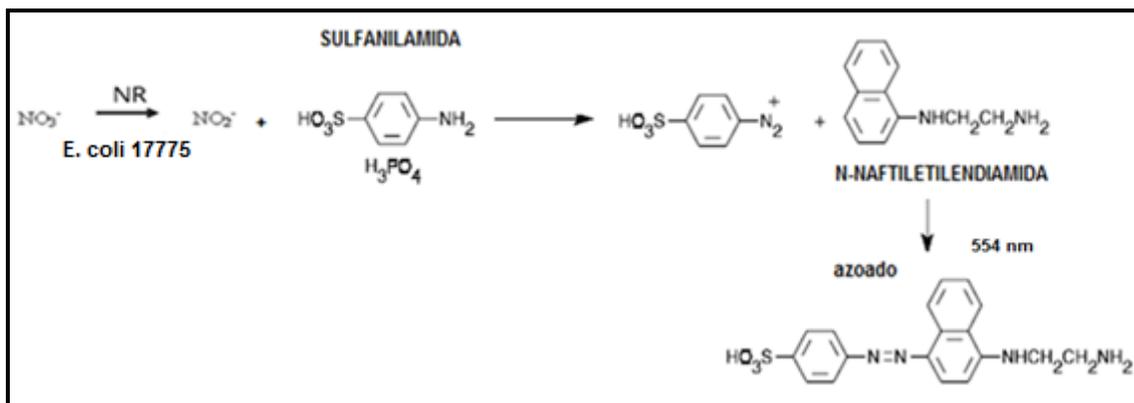


Fig. 12 Esquema de la reacción de Griess

6.6 Determinación de Peroxidación de Lípidos

Se analizó MDA mediante una reacción colorimétrica, donde el cromógeno es 1-metil fenil indol (MPI) en pH ácido, la condensación de una molécula de MDA con dos moléculas de MPI produce la formación de un cromóforo medible espectrofotométricamente a 586nm. [157]

[Fig. 13]

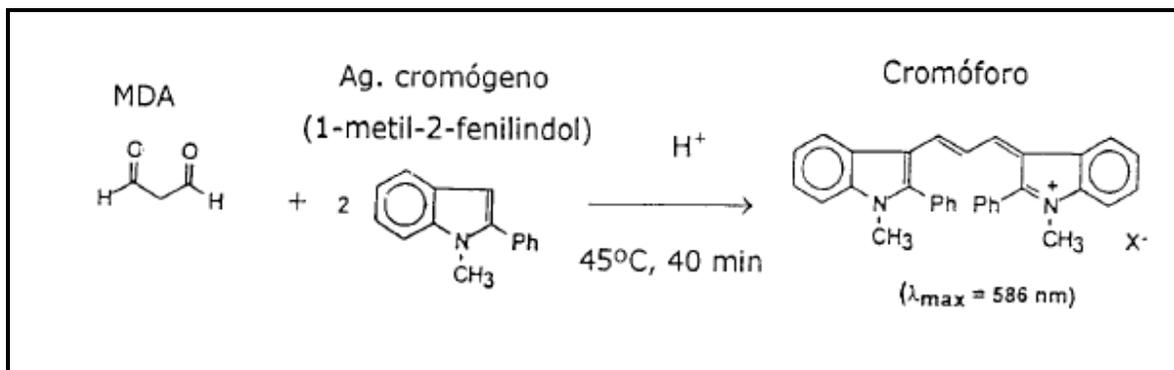


Fig. 13 Esquema de la reacción de MPI

6.7 Determinación de S- nitrosilación de proteínas

Utilizamos un kit de ELISA (Cayman Chemical Company, No.10006518) basado en la modificación del método de biotina-switch para la visualización directa de s-nitrosilación de proteínas. En el cual, los grupos SH (tioles) expuestos son bloqueados formando nitrosotioles, los cuales son

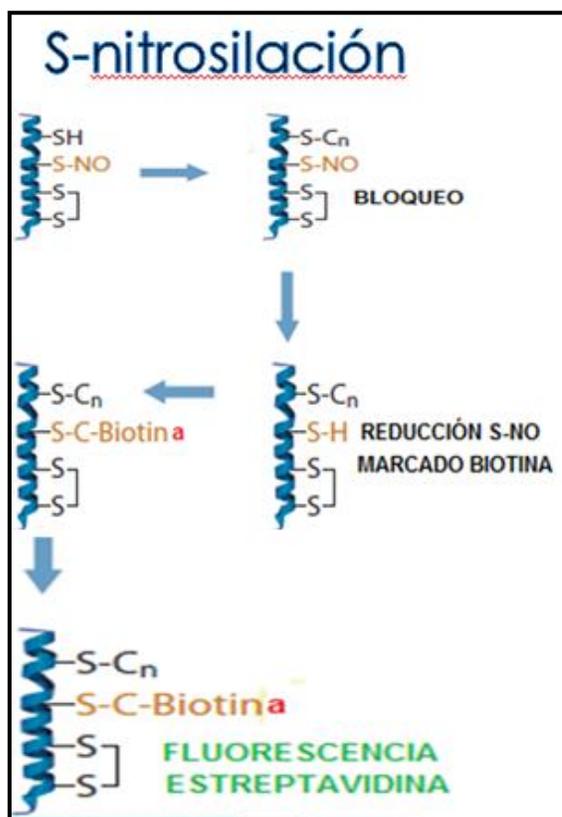


Fig. 14 Esquema de la reacción S-nitrosilación

reducidos y marcados por maleimida-biotinada.

De esta manera la biotilación de los grupos SH reaccionan con un agente colorimétrico llamado avidina que facilita la detección por medio de fluorescencia la cual se detecta a una longitud de onda 490nm emite a 520nm. ^[158] [Fig. 14]

7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

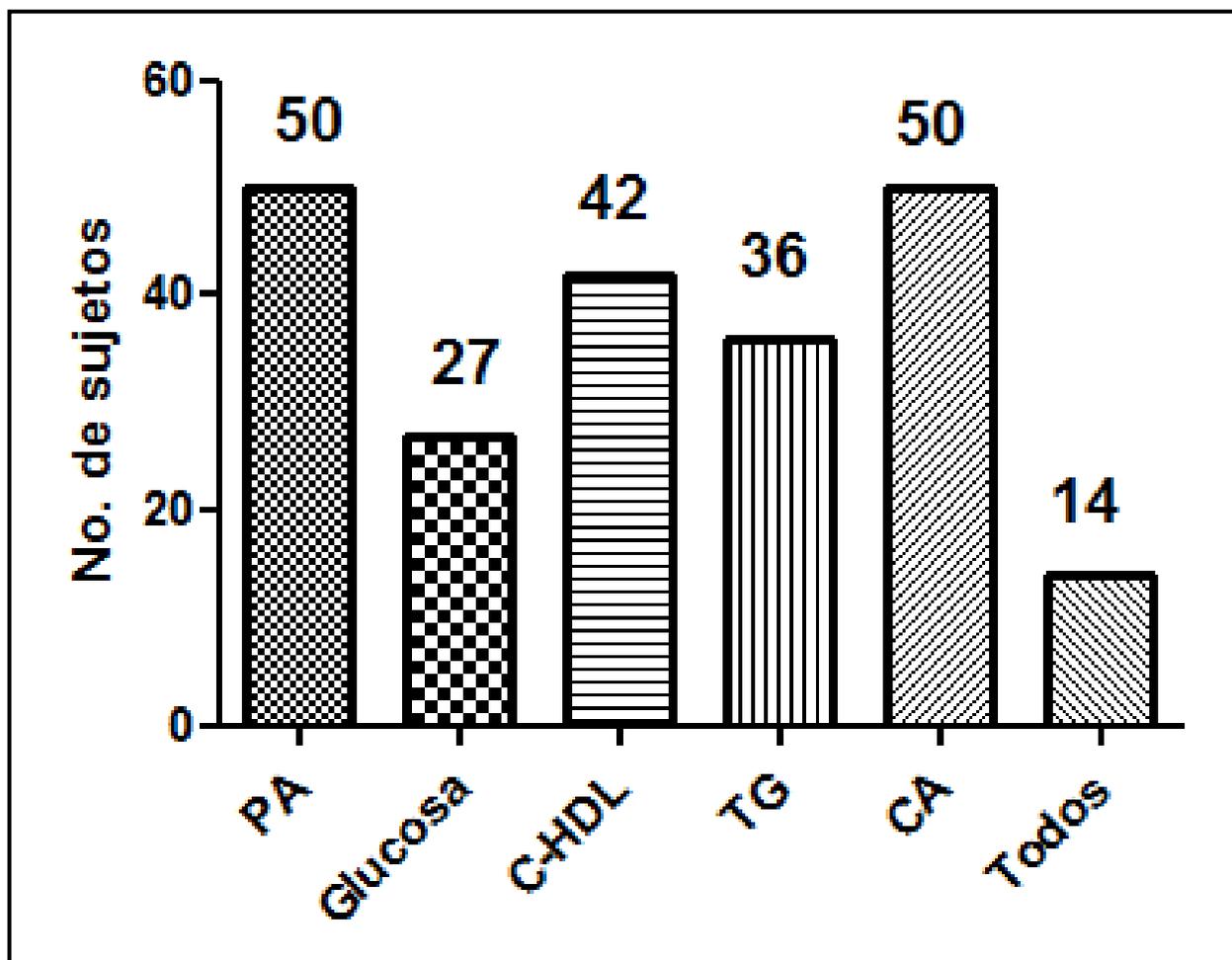
Los datos fueron analizados por la técnica de Shapiro Wilks para valorar que cumplieran una distribución normal. Se utilizó la prueba de ANOVA de una vía para comparar las medias y la desviación estándar de las diferentes variables continuas en los dos grupos del estudio. En todos los casos se consideró el valor de $p < 0.05$ como límite del significado estadístico.

8. RESULTADOS

8.1 Características iniciales de la población estudiada

El número de pacientes reclutados fue de 50 en total, pero 5 no continuaron por causas ajenas al estudio. Por lo tanto, el porcentaje de abandono fue del 10%.

En total se evaluaron 45 pacientes (31 mujeres y 14 hombres) con criterios de diagnóstico de SM según la IFD, aleatorizados en dos grupos: control (n=21) y metformina (n=24). La edad promedio en el grupo control fue de 53.44 ± 5.83 años y en el que recibió metformina fue de 52.72 ± 4.88 años.



Gráfica 2. No. de pacientes que cumplen con el criterio señalado PA: presión arterial; C-HDL: colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad; TG: Triglicéridos; CA: cintura abdominal; Todos: cumplen los 5 criterios.

De los pacientes reclutados en ambos grupos, 50 cumplieron con los criterios de HAS y obesidad abdominal; 42 presentaron cifras bajas de c-HDL; 36 hipertrigliceridemia; 27 cifras de glucosa alterada de ayuno y 14 de ellos cumplían con los 5 criterios de SM. [Gráfica 2]

Las variables antropométricas de los 45 pacientes estudiados se observan en la tabla 4. Cabe resaltar que ambos grupos presentaron obesidad abdominal, el promedio del peso fue 86.33 ± 15.72 en el grupo control y 82.8 ± 11.5 ; el IMC fue 34.42 ± 5.57 en el grupo control y 31.6 ± 4.19 en el grupo de metformina; la circunferencia abdominal fue de 106.27 ± 11.6 en el grupo control y 101.63 ± 7.66 en el grupo con metformina; no se observaron diferencia estadísticamente significativa al inicio del estudio indicando homogeneidad al momento de la asignación aleatoria.

ANTROPOMÉTRICAS	GPO CONTROL	GPO METFORMINA	VALOR DE p
Peso (kg)	86.33 ± 15.72	82.8 ± 11.5	ns
IMC (kg/m ²)	34.42 ± 5.57	31.6 ± 4.19	ns
CA (cm)	106.27 ± 11.6	101.63 ± 7.66	ns

Tabla 4. Variables antropométricas de población total.
 IMC: índice de masa corporal; CA: cintura abdominal; Los datos se muestran en medias \pm DS

Las variables bioquímicas de los 45 pacientes estudiados se observan en la tabla 5. No se observaron diferencias significativas en las variables bioquímicas entre ambos grupos. La resistencia a la insulina fue determinada por el método de HOMA (Homeostasis Model Assessment), no se observan diferencias significativas entre ambos grupos.

BIOQUÍMICAS	GRUPO CONTROL	GPO METFORMINA	VALOR DE P
Glucosa (mg/dl)	97.4±9.99	101±11	ns
CT (mg/dl)	189±33.12	208±43.7	ns
c-HDL (mg/dl)	39.1±12.30	38.8±7.11	ns
TG (mg/dl)	231±170	235±125	ns
c-LDL (mg/dl)	115±36.73	126±49	ns
no-HDL (mg/dl)	154±31.52	168±41.42	ns
Insulina (mg/dl)	16.26±8.87	13.61±8.34	ns
HOMA	3.98±2.43	3.40±2.13	ns

Tabla 5. Variables bioquímicas de población total.

CT: colesterol total; c-HDL colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad; TG: triglicéridos; c-LDL: colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad; no-HDL: colesterol no unido a lipoproteínas de alta densidad; HOMA: Homesostasis Model Assessment. Los datos se muestran en medias± DS

Las cifras iniciales de presión arterial se muestran en la tabla 3. Ambos grupos presentaban hipertensión arterial al inicio del estudio, sin diferencias significativas entre ambos grupos.

PRESIÓN ARTERIAL	GRUPO CONTROL	GRUPO METFORMINA	VALOR DE P
PS (mmHg)	144.68±16.92	138±19.22	ns
PD (mmHg)	86.77±8.611	85.59±10.31	ns
Pdif (mmHg)	57.90±15.93	52.40±15.63	ns

Tabla 6. Cifras de presión arterial de población total.

PS: presión sistólica; PD: presión diastólica; P dif: presión diferencial. Los datos se muestran en medias± DS

La valoración de la función endotelial se determinó por la técnica de VMF, donde una cifra menor del 10% en cambio en el diámetro fue considerada como disfunción endotelial; además de la medición del GIMC de ambos lados: izquierdo y derecho. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. [Tabla 7]

FUNCIÓN ENDOTELIAL	GRUPO CONTROL	GRUPO METFORMINA	VALOR DE P
VMF (% diámetro)	20.18±27.2	10.68±10.3	ns
GIMC 1ZQ (cm)	0.77±0.17	0.79±0.13	ns
GIMC DER (cm)	0.74±0.17	0.79±0.19	ns

Tabla 7. Valoración de función endotelial en población total. VMF: vasodilatación mediada por flujo; GIMC: grosor intima media carotídeo; 1ZQ: izquierdo; DER: derecho. Los datos se muestran en medias± DS

Los marcadores de estrés oxidativo utilizados fueron: MDA y carbonilos, para valorar el estrés nitrosativo se utilizó: nitritos y s-nitrosilación. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos al inicio del estudio.

MARCADORES DE EO/ EN	GRUPO CONTROL	GRUPO METFORMINA	VALOR DE P
MDA (nmol/ml)	4.39±2.33	6.52±3.37	ns
CARBONILOS (nmol/mg)	0.96±0.39	1.06±0.442	ns
NITRITOS (µmol/L)	25.78±11.5	24.69±8.80	ns
s-NITROSILACIÓN (U/mg)	1.67±1.05	2.39±0.67	ns

Tabla 8. Marcadores de estrés oxidativo/nitrooxidativo en población total. MDA: malondialdehído; EO: estrés oxidativo; EN: estrés nitrosativo. Los datos se muestran en medias± DS

8.2 Comparación de variables antropométricas en ambos grupos de estudio

En la tabla 9 se observa que ambos grupos presentaron disminución de peso durante el año de seguimiento del estudio, la reducción de peso observada fue de 4.2 kg para el grupo de metformina ($p < 0.0001$) y 4.3kg para el grupo control ($p < 0.0001$); en la misma forma, el IMC disminuyó en forma significativa para ambos grupos. La reducción de peso se asoció a la disminución del perímetro de la cintura abdominal la cual fue de 3cm para el grupo de metformina a los 6 meses del estudio aunque esta no fue estadísticamente significativa, además observamos que al año recuperaron 1 cm en el perímetro de cintura abdominal aunque para el grupo control fue mayor la reducción de 5cm ($p=0.0065$); en ningún caso existió diferencia intergrupales estadísticamente significativa.

VARIABLE	GPO	VISITA 1	VISITA 2	VISITA 3	DIFERENCIA INTRAGRUPAL	VALOR DE P
PESO (kg)	M	82.8 ±11.5	79.9±11.5	78.6±12.3	- 4.2	< 0.0001
	C	86.33±15.7	83.92±15.4	81.96±16.6	- 4.34	< 0.0001
IMC (kg/m²)	M	31.6±4.19	30.2±3.77	29.8±3.82	-1.8	< 0.0001
	C	34.42±5.57	32.82±5.40	33.15±6.06	-1.27	0.0016
CINTURA ABDOMINAL (cm)	M	101.63±7.66	98.6±7.57	99.70±7.31	-1.93	ns
	C	106.27±11.6	101.81±13	101.95±10.7	-4.32	0.0065

Tabla 9. Comparación de variables antropométricas en las tres visitas en ambos grupos de estudio. Los datos se muestran en medias ± DS. M: grupo metformina C: grupo control

8.3 Comparación de variables bioquímicas en ambos grupos de estudio

El grupo que recibió metformina presentó una diferencia intragrupal de 1.9 mg/dl ($p \geq 0.05$) en cifras de glucosa a diferencia del grupo control donde se observó un aumento de 3.8 mg/dl ($p=0.61$); ambos grupos presentaron disminución de colesterol total siendo la diferencia mayor para el grupo metformina 28.05 ($p=0.0090$); las cifras de c-HDL mostraron para ambos grupos un aumento, siendo mayor para metformina 4.9mg/dl ($p=0.0031$); los triglicéridos disminuyeron significativamente únicamente en el grupo control. El c-LDL disminuyó en ambos grupos, siendo mayor para el grupo de metformina. No se observaron diferencias intrgrupales estadísticamente significativa. El colesterol no-HDL en ambos grupos presentó una disminución con igual diferencia intragrupal 32mg/dl ($p= <0.05$). Ambos grupos presentaron una tendencia a la disminución en los niveles de HOMA sin presentar diferencias intrgrupales estadísticamente significativa. [Tabla 10]

VARIABLE	GPO	VISITA 1	VISITA 2	VISITA 3	DIF INTRA GRUPAL	VALOR DE P
GLUCOSA (mg/dl)	M	101±11	94.8±11.2	99.1±9.75	-1.9	0.05
	C	97.4±9.39	98.18±20.2	101.28±15.9	+3.88	0.6199
CT (mg/dl)	M	208±43.7	183±46.2	179.95±39.4	-28.05	0.0090
	C	189±33.1	178±37.6	162±27.1	-27	0.0076
C-HDL (mg/dl)	M	38.5±7.05	42.1±8.2	43.4±10.1	+4.9	0.0031
	C	39.1±12.3	41.5±12.4	42.4±13.2	+ 3.3	0.1153
TG (mg/dl)	M	235±125	178±117	203±178	-32	0.1536
	C	231±170	182±90.7	154.3±78.2	-76.7	0.0013
C-LDL (mg/dl)	M	126±49	105±37.7	95.9±24.3	-30.1	0.1290
	C	115±36.7	104±38.2	94.1±22.6	-23.2	0.4373
NO-HDL (mg/dl)	M	169±42	141±47.2	137±40.6	-32	0.0199
	C	150±29.5	137±37.2	118±23.6	-32	0.0032
INSULINA (mg/dl)	M	13.61±8.34	12.8±7.08	11.7±8.77	-1.91	0.3366
	C	16.26±8.87	15.6±19	16.60±20.3	-0.34	0.3940
HOMA	M	3.40±2.13	3.02±1.64	3±1.81	-0.4	0.0755
	C	3.98±2.43	4.49±8.11	3.7±2.28	-0.28	0.4734

Tabla 10. Comparación de variables bioquímicas en las tres visitas en ambos grupos de estudio. Los datos se muestran en medias± DS. M: grupo metformina C: grupo control; c-HDL: colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad; no-HDL: colesterol no unido a lipoproteínas de alta densidad; HOMA: Homesostasis Model Assessment.

8.4 Comparación de cifras de presión arterial en ambos grupos de estudio

Ambos grupos presentaron disminución de la cifras de presión arterial sistólica y diastólica durante el año de estudio, siendo la diferencia intragrupal mayor para el grupo de metformina sin diferencias significativas en la comparación intergrupal. Las cifras de presión diferencial disminuyeron en ambos grupos con significancia estadística en el análisis intragrupal y sin diferencias significativas intergrupales. [Tabla 11]

VARIABLE	GPO	VISITA 1	VISITA 2	VISITA 3	DIF INTRA GRUPAL	VALOR DE P
P SISTÓLICA (mmHg)	M	138±19.2	124.68±16.0	120.59±11	-17.41	< 0.0001
	C	144.68±16.9	126.31±14.9	130.47±14.7	-14.21	< 0.0001
P DIASTÓLICA (mmHg)	M	85.59±10.3	75.31±8.52	73.09±7.76	-12.5	< 0.0001
	C	86.77±8.61	76.5±10.5	76.61±7.78	-10.16	< 0.0001
P DIFERENCIA L (mmHg)	M	54.04±15.8	49.50±12.0	48.0±8.24	-6.04	0.42
	C	58.71±15.8	50.38±8.85	53.86±13	-4.85	0.11

Tabla 11. Comparación de cifras de presión arterial en las tres visitas en ambos grupos de estudio. Los datos se muestran en medias± DS. M: metformina C: control; P: presión

8.5 Comparación de marcadores de estrés oxidativo/nitrooxidativo en ambos grupos

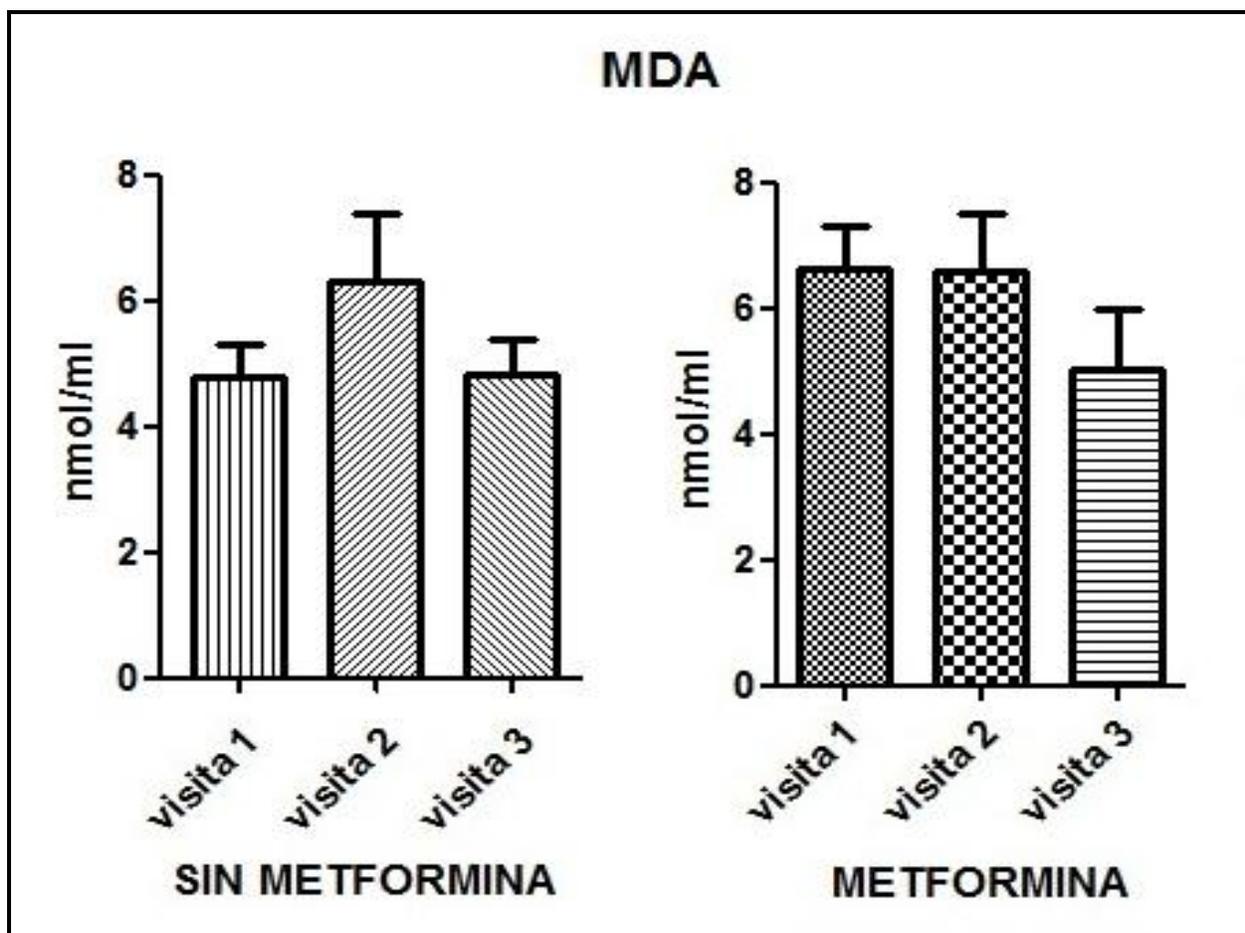
En el grupo de metformina se presentó una disminución en carbonilos estadísticamente significativa en el análisis intergrupar e intragrupal. Se observó una tendencia a la disminución de MDA y nitritos entre las visita inicial y del año, así como un aumento de s-nitrosilación sin presentar diferencia intragrupal estadísticamente significativa. En el grupo control se presentó un aumento en la s-nitrosilación 1.74U/mg (p<0.050). [Tabla 12]

VARIABLE	GPO	VISITA 1	VISITA 2	VISITA 3	DIF INTRA GRUPAL	VALOR DE P
MDA (nmol/ml)	M	6.52±3.37	6.70±4.63	5.03±4.54	-1.49	0.2801
	C	4.39±2.33	6.27±4.73	4.84±2.47	+0.45	0.9216
CARBONILOS (nmol/mg)	M	1.06±0.442	0.86±0.45	0.618±0.36	-0.442	0.0041
	C	0.96±0.39	0.77±0.51	0.844±0.40	-0.12	0.3607
NITRITOS nmol/ml	M	24.69±8.80	20.63±9.43	19.57±9.13	-5.12	0.1860
	C	25.78±11.5	19.28±9.43	22.34±11.9	-3.44	0.1495
S-NITROSILACIÓN (U/mg)	M	2.39±0.67	1.82±1.05	2.76±1.06	+0.37	0.164
	C	1.67±1.05	2.28±0.92	3.41±1.50	+1.74	0.0196

Tabla 12. Comparación de los valores de estrés oxidativo/nitrooxidativo en las tres visitas de estudio. Los datos se muestran en medias± DS. M: metformina C: control; P: presión

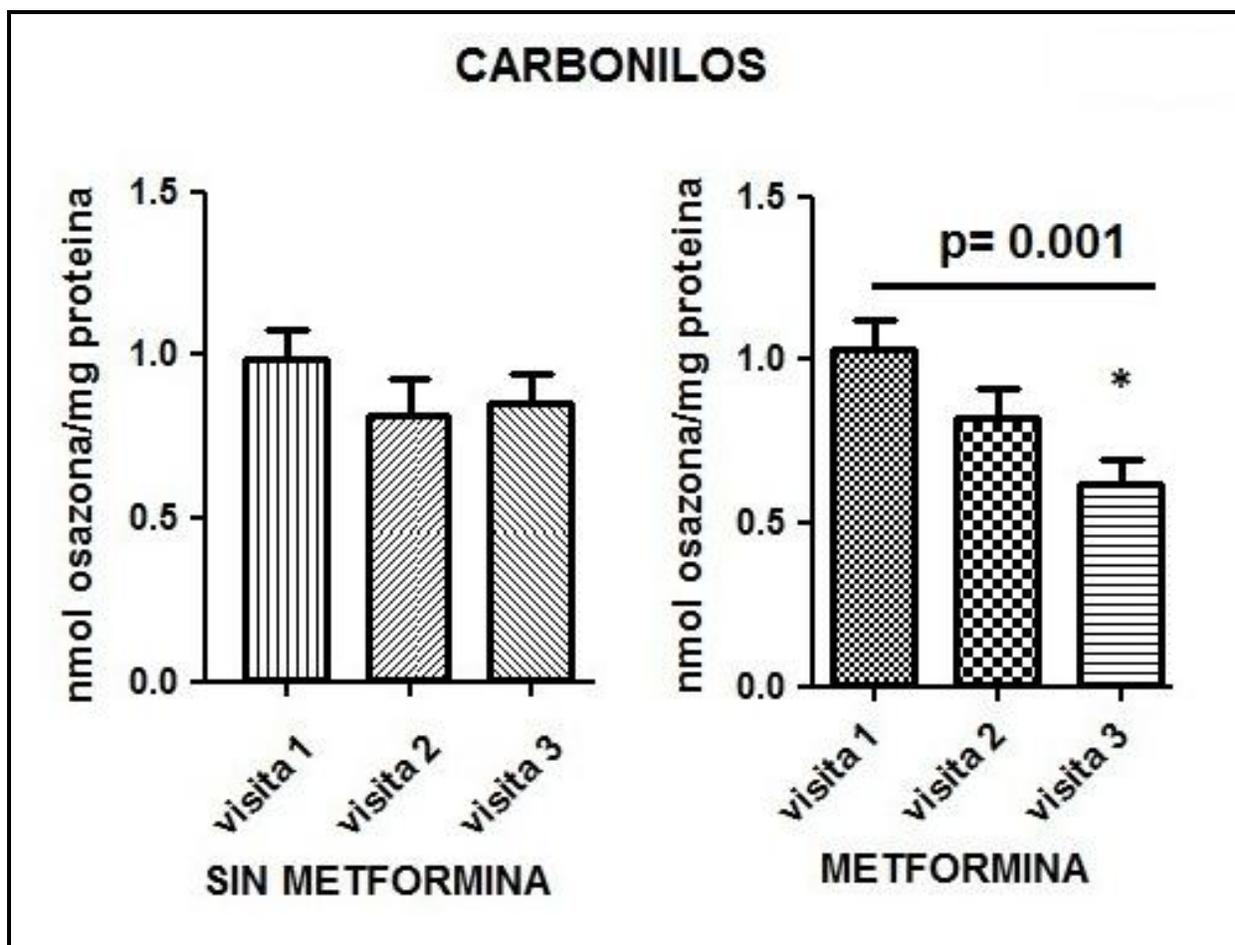
En las gráficas 3 a 5, se presentan el comportamiento durante las tres visitas que realizaron los pacientes que concluyeron el estudio de las concentraciones plasmáticas de los marcadores realizados para determinar estrés oxidativo/nitrosativo: oxidación de lípidos MDA, oxidación de proteínas carbonilos y nitrooxidación nitritos y S-nitrosilación.

La gráfica 3 muestra el comportamiento que presento las concentraciones plasmáticas de MDA en los pacientes del grupo control (sin metformina) durante las tres visitas (0,6 y 12 meses) aunque se observa un aumento de la concentración plasmática de MDA en la visita 2, esta disminuye a valores similares de la visita inicial, lo que puede sugerir un periodo de adaptación a los cambios de hábitos de los pacientes de este grupo. De manera interesante, el grupo de pacientes que recibió metformina como coadyuvante a su tratamiento integral, no presento el incremento en la concentración plasmática de MDA en la visita 2 y aunque no significativa estadísticamente presento una disminución en la visita de los 12 meses (visita 3).



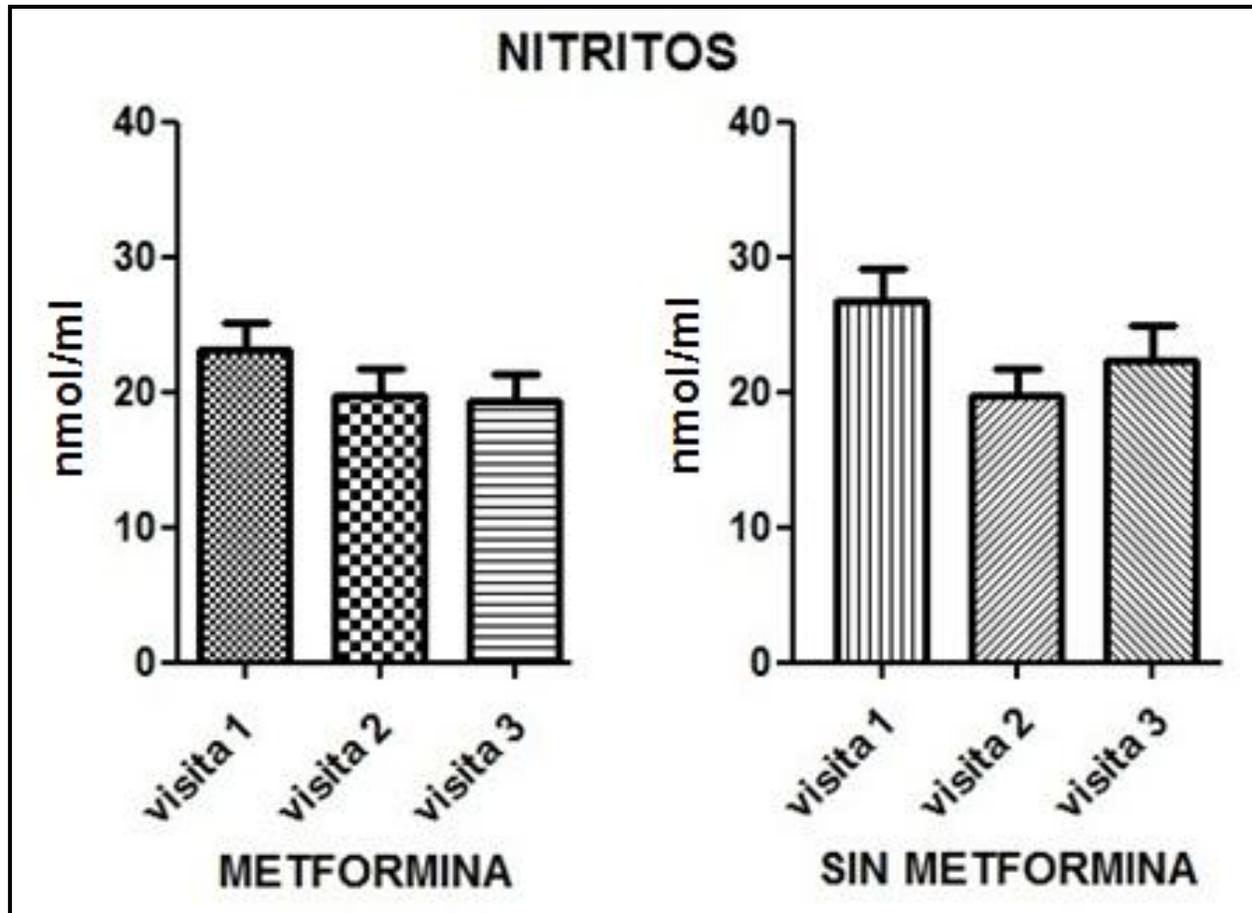
Gráfica 3. Concentración plasmática de MDA nmol/ml de las tres visitas en ambos grupos de estudio. Los datos se muestran como medias \pm ES.

Respecto al marcador de oxidación de proteínas plasmáticas, la gráfica 4 muestra que el grupo de pacientes control presentaron un comportamiento sutilmente bifásico, es decir en la visita 2 se observó una disminución respecto a la visita inicial aunque no estadísticamente significativa y en la visita 3 la concentración plasmática de carbonilos aumentaron discretamente sin alcanzar valores similares de la visita inicial aunque no hay diferencia estadísticamente significativa entre la visita inicial y la visita tres en este grupo de pacientes. En el grupo de pacientes que recibieron metformina la concentración plasmática de carbonilos se comportó con una clara tendencia a la disminución desde la visita 2, siendo estadísticamente significativa en la visita 3.



Gráfica 4. Concentración plasmática de carbonilos nmol osazonas/mg proteína de tres visitas en ambos grupos de estudio. Los datos se muestran en medias± ES.

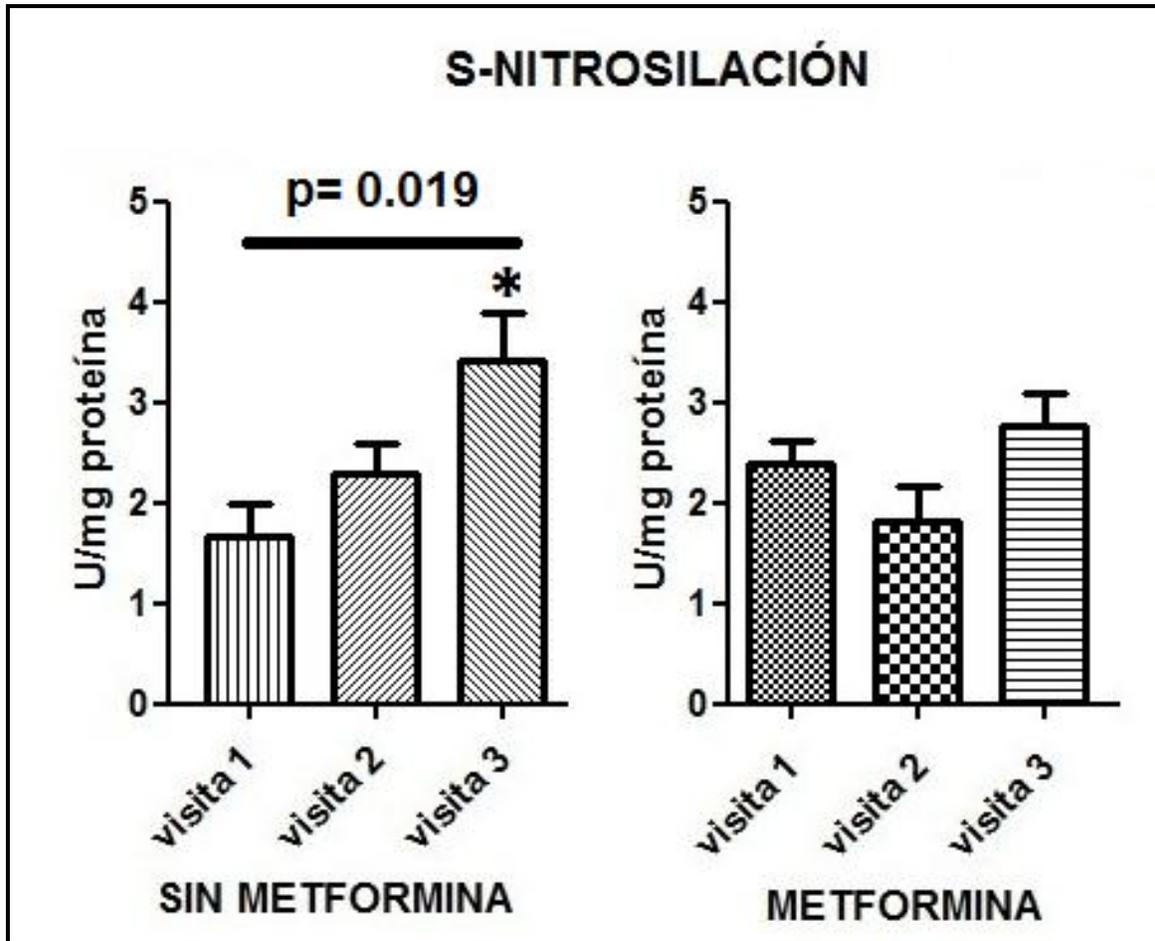
La gráfica 5, muestra el comportamiento de las concentraciones plasmáticas de los nitritos, determinados por la reacción de Griess en ambos grupos de estudio. En el grupo de pacientes control se observa una disminución desde la visita 2 y esta tendencia se mantiene en la visita 3, sin embargo estas diferencias no son estadísticamente significativas. Por otro lado, en el grupo de pacientes que recibieron metformina, se comporta disminuyendo en la visita 2 pero en la visita 3 hay un aumento respecto de la visita 2 y cercano a los valores de la visita 1.



Gráfica 5. Concentración plasmática de nitritos (nmol/ml) de tres visitas en ambos grupos de estudio. Los datos se muestran en medias \pm ES.

En el paso ulterior de la nitrooxidación, la gráfica 6 muestra el comportamiento de las concentraciones de S-nitrosilación de proteínas plasmáticas en ambos grupos de pacientes de estudio. En el grupo de pacientes control se observa una clara tendencia de aumento de S-nitrosilación de las proteínas plasmáticas desde la visita 2, siendo este cambio estadísticamente significativo en la visita 3. En el grupo de pacientes que recibieron metformina se observa un comportamiento distinto, en la visita 2 hay una disminución de la S-nitrosilación de proteínas plasmáticas pero en la visita 3 la S-nitrosilación aumenta no solo

más que en la visita 2, sino el aumento es mayor que la visita inicial, aunque este no es estadísticamente significativo.



Gráfica 6. Concentración plasmática de S-nitrosilación U/mg proteína de tres visitas en ambos grupos de estudio. Los datos se muestran en medias \pm ES.

8.6 Comparación de variables de función endotelial en ambos grupos de estudio

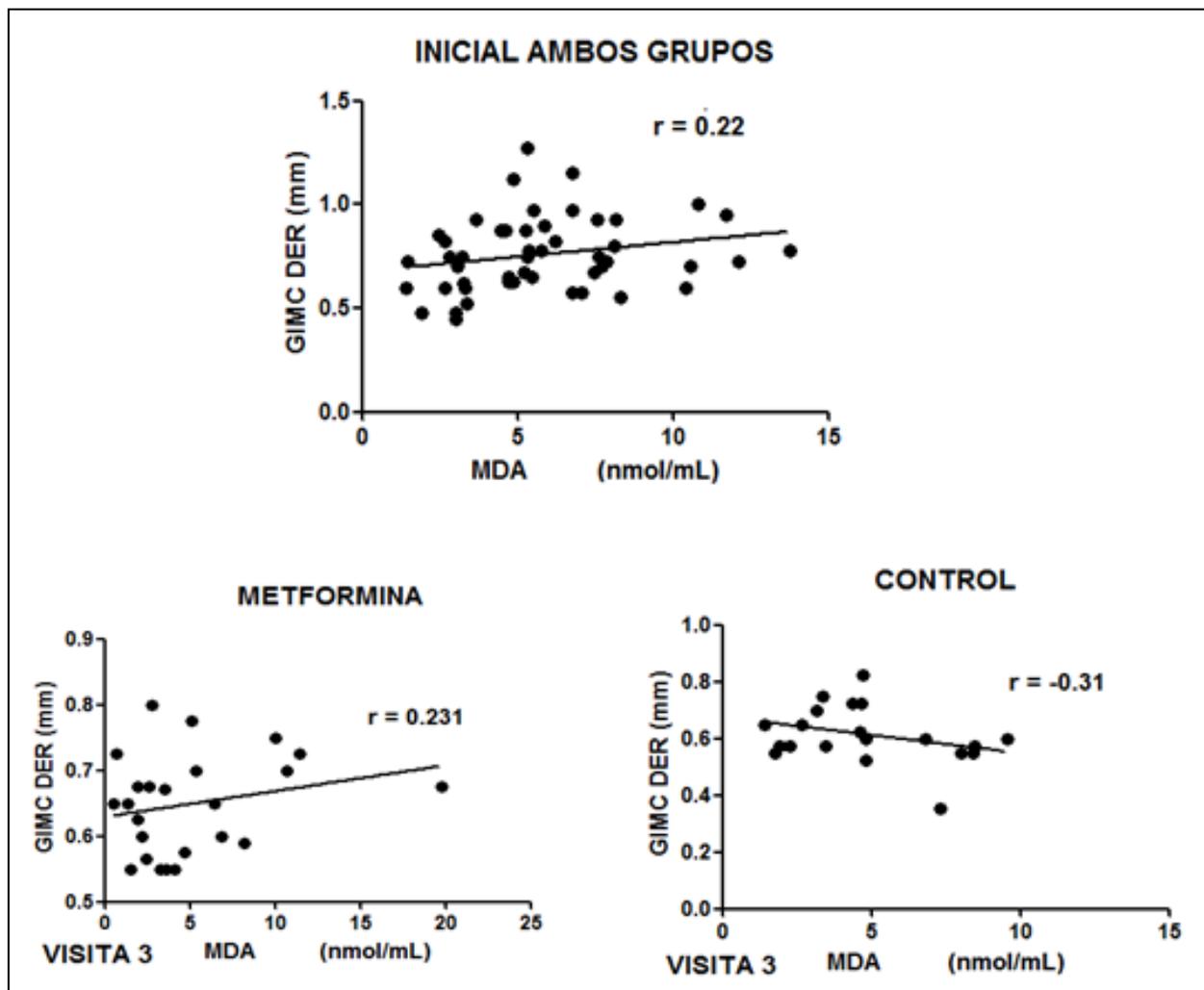
La tabla 13 muestra que se presentó una disminución del GIMC izquierdo y derecho en ambos grupos, además se observa una diferencia similar estadísticamente significativa; la VMF presentó una tendencia a aumentar en el grupo de metformina de 10% a 15% sin ser estadísticamente significativa, por otro lado en el grupo control se observó una disminución de la función endotelial de un 5%, aunque sin ser estadísticamente significativa.

VARIABLE	GPO	VISITA 1	VISITA 2	VISITA 3	DIFERENCIA INTRAGRUPAL	VALOR DE P
GIMC IZQUIERDO (mm)	M	0.79±0.13	0.69±0.125	0.63±0.09	-0.16	< 0.0001
	C	0.77±0.17	0.63±0.13	0.61±0.09	-0.16	0.0002
GIMC DERECHO (mm)	M	0.79±0.19	0.68±0.137	0.65±0.07	-0.14	0.0003
	C	0.74±0.17	0.65±0.12	0.61±0.09	-0.13	< 0.0001
% DIAMETRO	M	10.68±10.3	15.80±17.2	15.09±12.5	+4.41	0.2270
	C	20.18±27.2	21.82±13.9	14.21±14.4	-5.97	0.2625

Tabla 13. Comparación de variables de función endotelial en las tres visitas en ambos grupos de estudio. Los datos se muestran en medias± DS. M: metformina C: control; MDA: malondialdehído

8.7 Correlación de los marcadores de estrés oxidativo/nitrosativo con GIMC

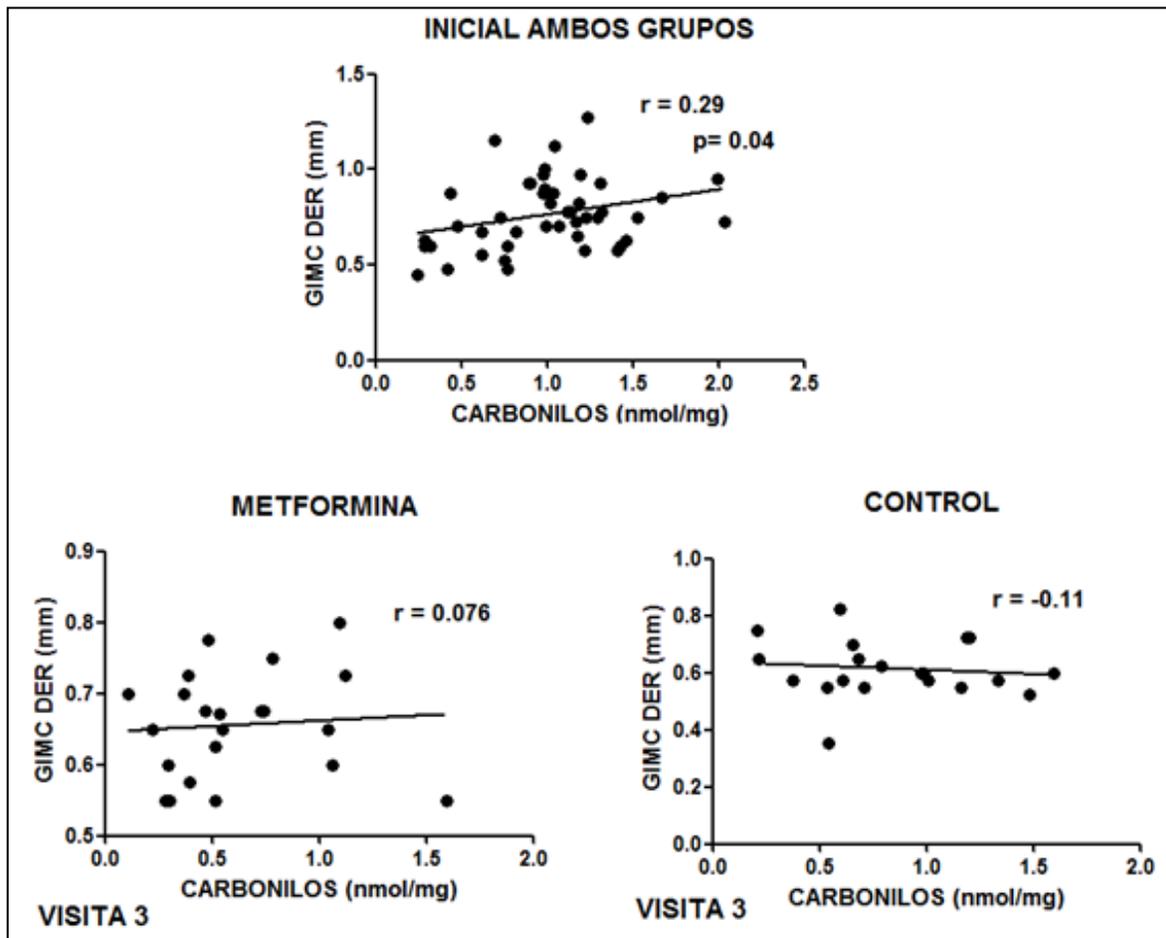
El análisis de la correlación entre el marcador de oxidación de lípidos, MDA en plasma, con uno de los indicadores de función endotelial el GIMC derecho indica, como se muestra en la gráfica 7, no existe una correlación estadísticamente significativa al inicio del estudio.



Gráfica 7. Correlación del marcador de oxidación de lípidos MDA con GIMC derecho. GIMC: grosor íntima media carotideo; DER: derecho.

Este análisis corrobora que la metformina no tiene un efecto directo sobre la generación de MDA en plasma, en el análisis a la visita tres no se observa un cambio significativo en la correlación. Respecto al grupo control aunque se muestra una correlación negativa ($r=-0.31$) al termino de un año del estudio, sin embargo esta correlación no fue estadísticamente significativa.

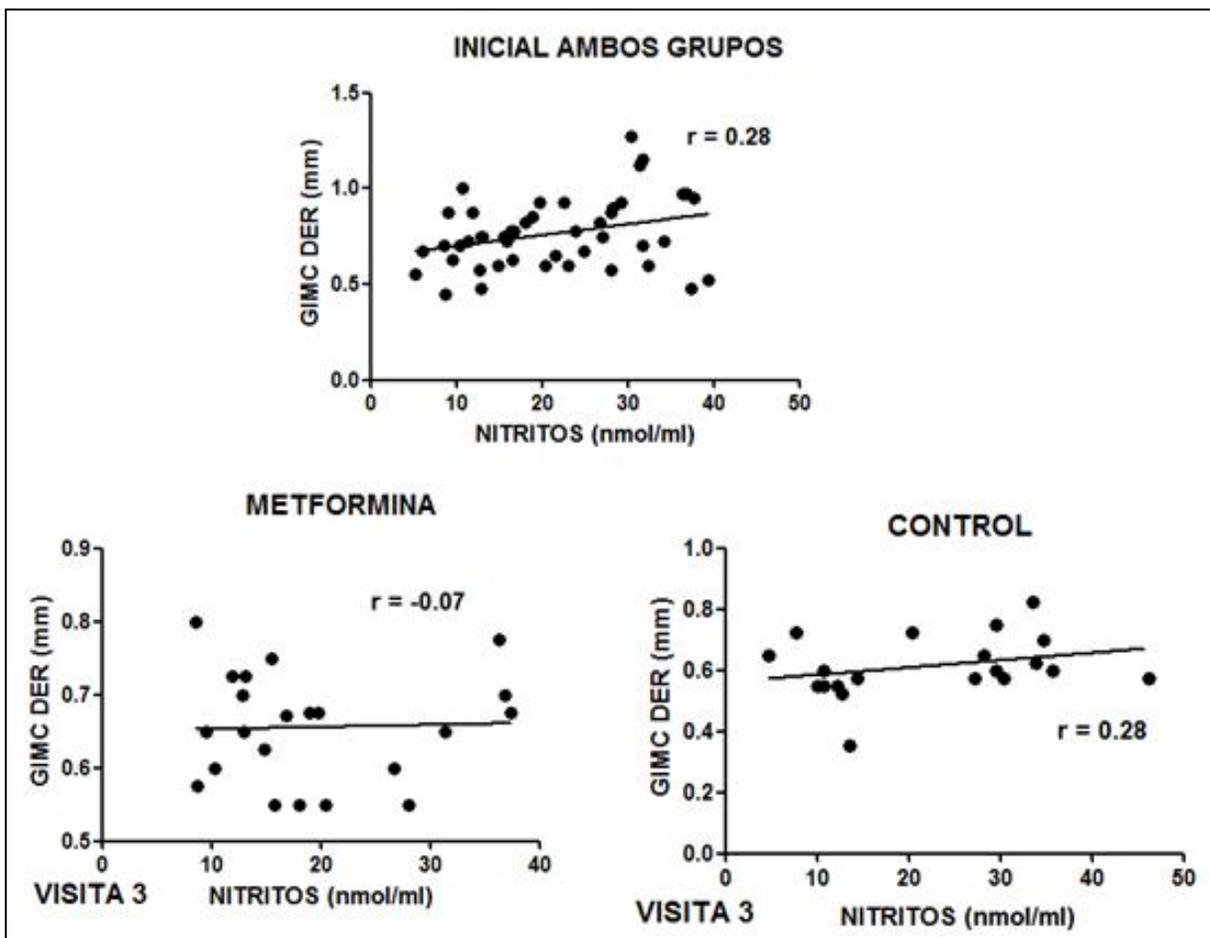
Al comparar el comportamiento del marcador de oxidación de proteínas plasmáticas carbonilos, la gráfica 8 muestra que al inicio del estudio en ambos grupos se observa una correlación positiva $r=0.29$ ($p=0.04$) entre el GIMC derecho con los carbonilos; sin embargo



Gráfica 8. Correlación de marcador carbonilos con GIMC derecho. GIMC: grosor íntima media carotideo; DER: derecho.

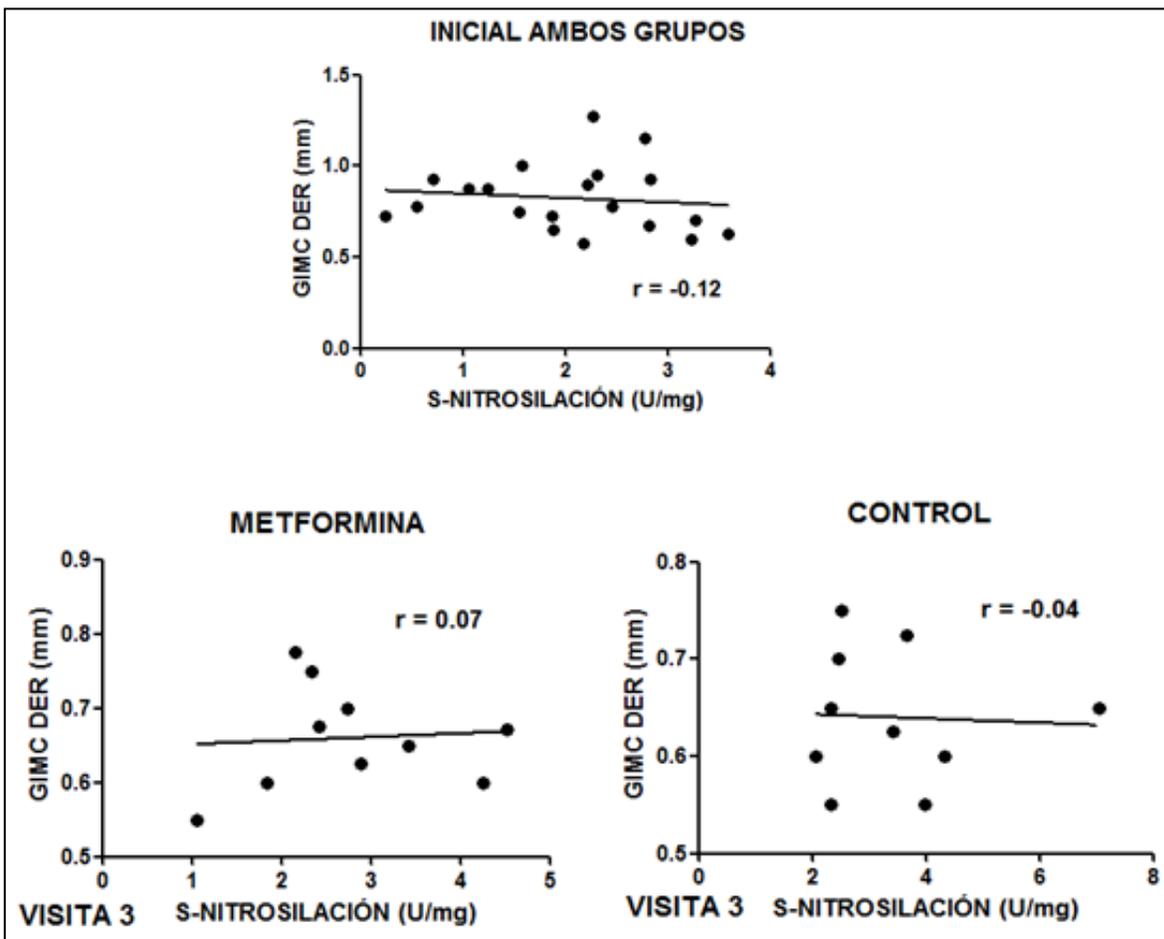
esta correlación se pierde al año del estudio, donde ni el grupo que recibió metformina ni el control se observa una correlación estadísticamente significativa.

Para evaluar la posible correlación entre la función endotelial y la nitrooxidación realizamos el análisis entre las concentraciones de nitritos obtenidos del plasma y el GIMC derecho como se muestra en la gráfica 9. Al inicio del estudio no se observa correlación del GIMC derecho con la concentración de nitritos, tampoco se observa al final del estudio ni en el grupo que recibió metformina ni el grupo control.



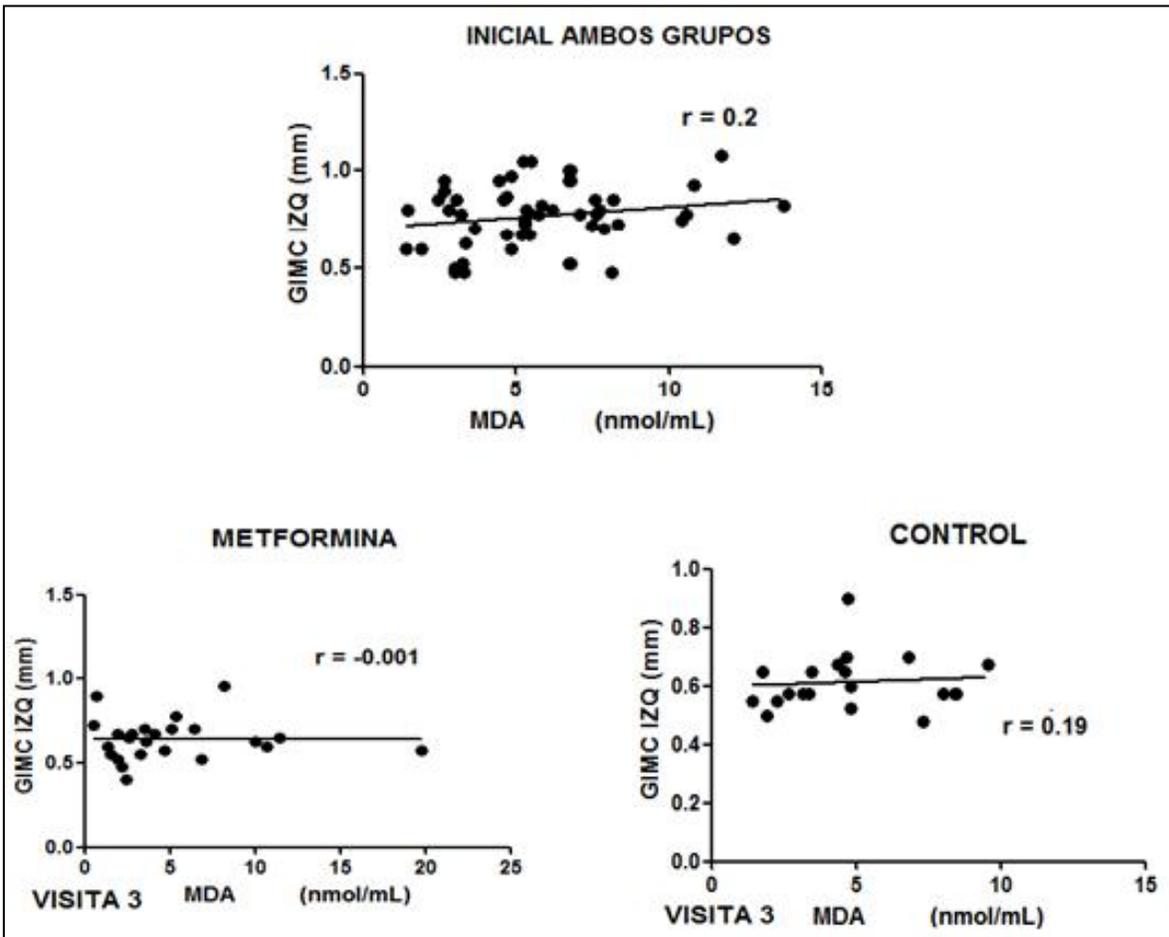
Gráfica 9. Correlación de marcador de nitritos con GIMC al inicio y después de un año de tratamiento con y sin metformina. GIMC: grosor íntima media carotideo; DER: derecho.

En cuanto a otra de las rutas del metabolismo del NO, la S-nitrosilación de proteínas plasmáticas, cuando se realizó la correlación de este marcador de nitrooxidación con el GIMC derecho con los datos iniciales de ambos grupos no se encontró una correlación estadísticamente significativa, como se muestra en la gráfica 10. Al término de un año del estudio, de igual manera no encontramos correlación entre este marcador de la función endotelial y la S-nitrosilación en ambos grupos de estudio.



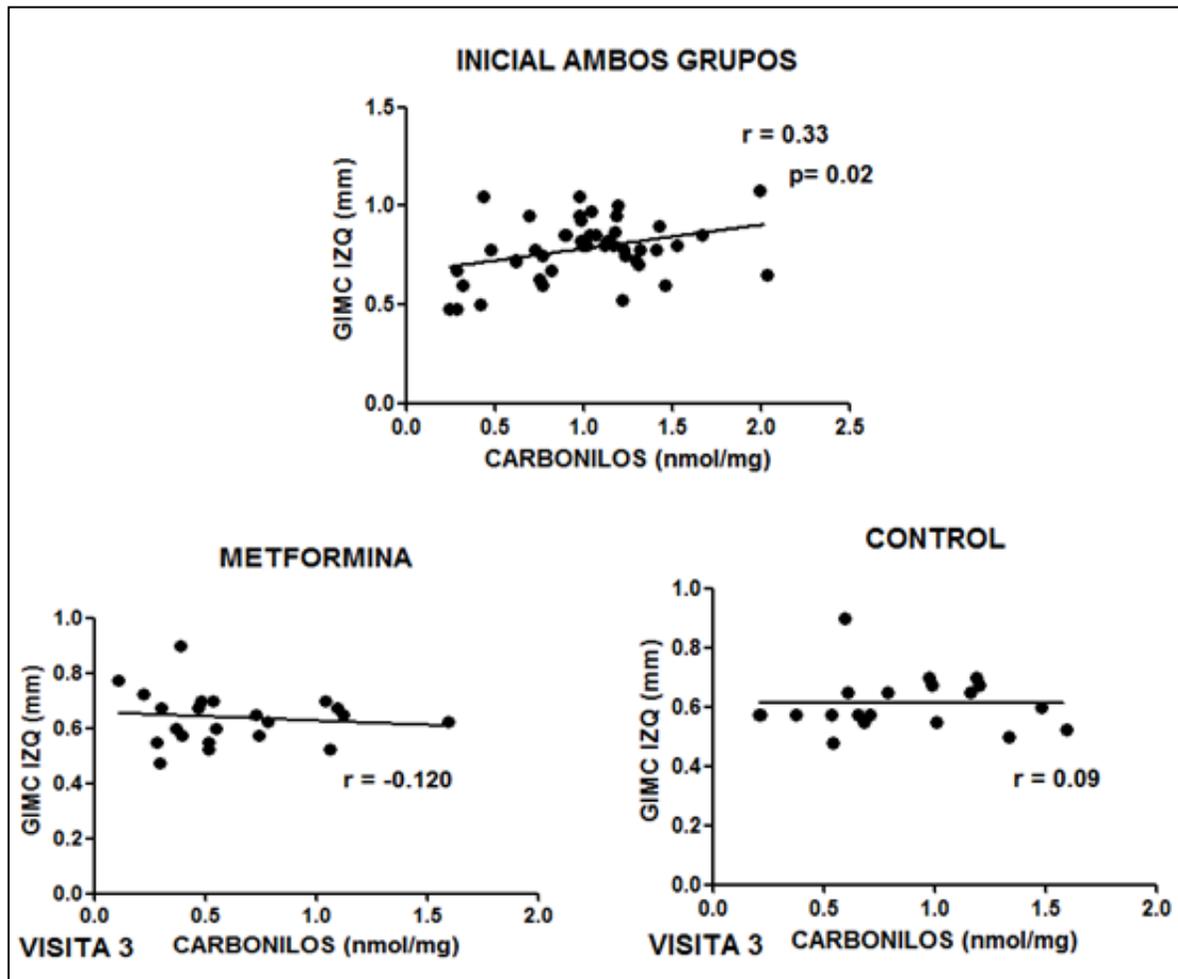
Gráfica 10. Correlación de marcador de nitrooxidación. S-nitrosilación con GIMC derecho. GIMC: grosor íntima media carotideo; DER: derecho.

Al realizar el análisis de la correlación entre el marcador de oxidación de lípidos, MDA plasmático con el GIMC contralateral encontramos que no existe correlación estadísticamente significativa en ambos grupos al inicio del estudio. [Gráfica 11]



Gráfica 11. Correlación de marcador MDA con GIMC izquierdo.
GIMC: grosor íntima media carotideo; IZQ: izquierdo

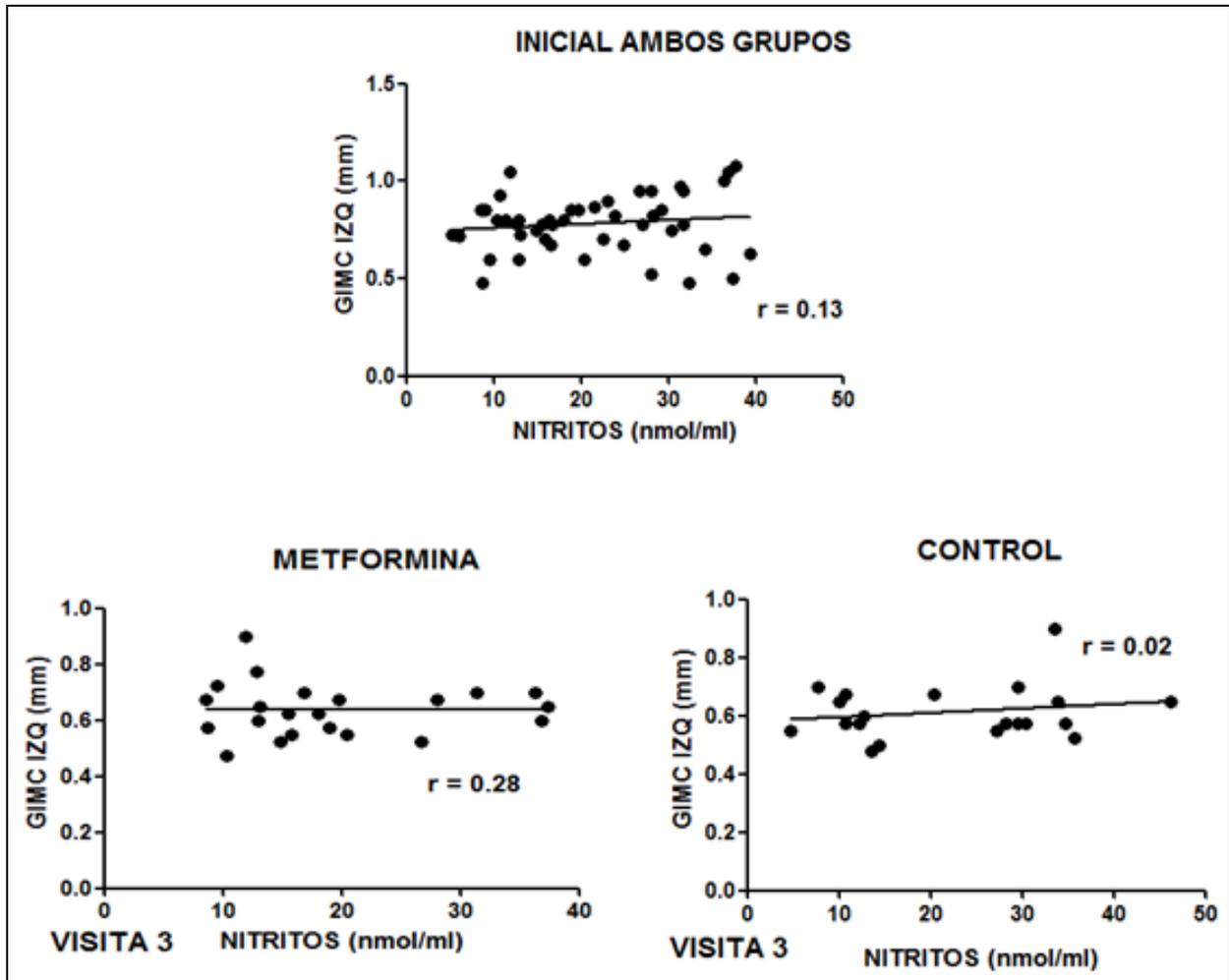
Sin embargo cuando se analizan los valores del marcador carbonilos con el GIMC izquierdo, en la gráfica 12 se observa una correlación $r=0.33$ ($p=0.02$) al inicio del estudio, pero al año esta correlación se pierde en ambos grupos.



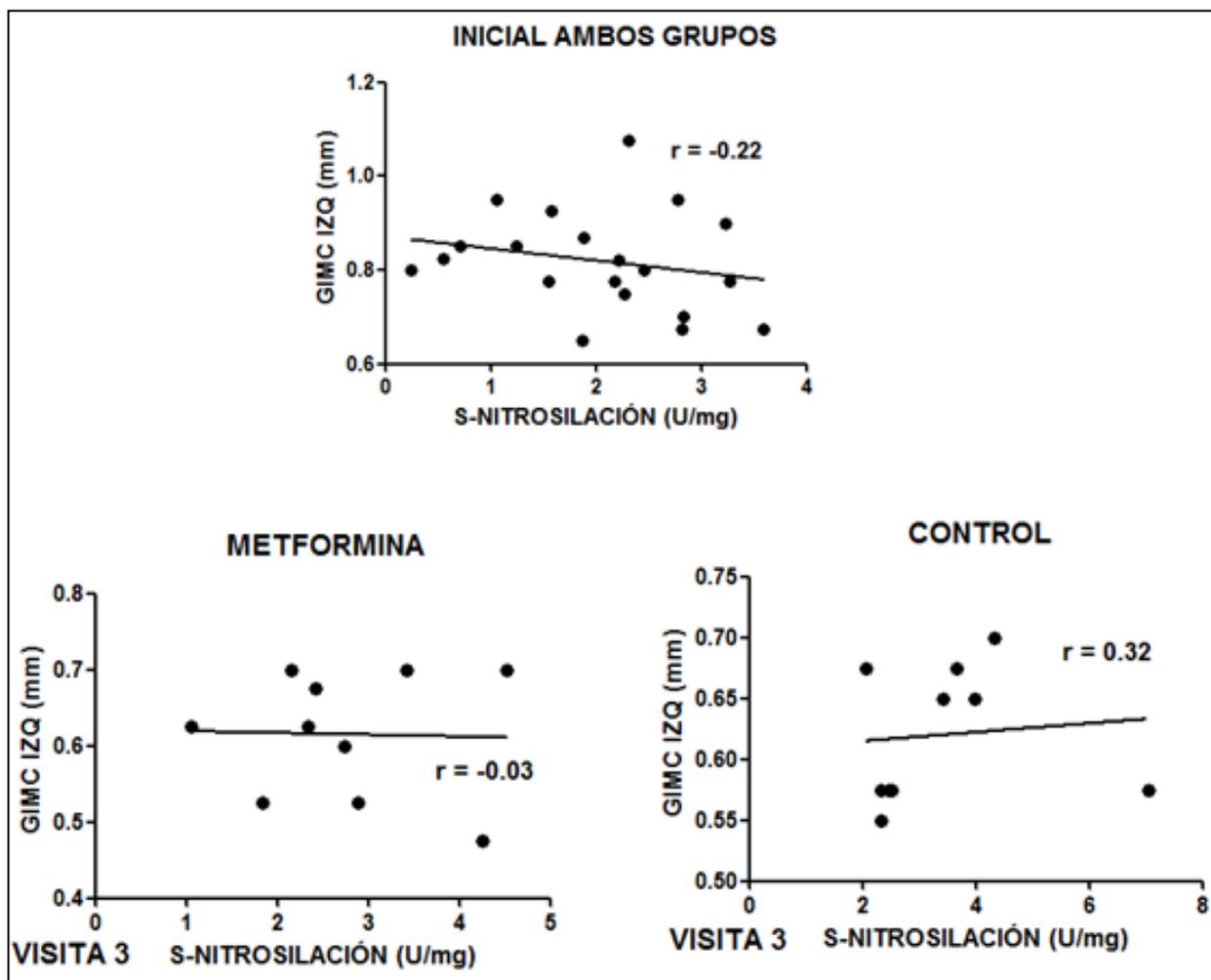
Gráfica 12. Correlación de marcador carbonilos con GIMC izquierdo. GIMC: grosor íntima media carotideo, IZQ: izquierdo.

No existió correlación en valores de nitritos y GIMC izquierdo en ambos grupos de estudio como se muestra en el gráfica 13. Al analizar los valores del marcador de nitrooxidación S-nitrosilación con GIMC izquierdo no se observó correlación en ningún grupo de estudio.

[Gráfica 14]



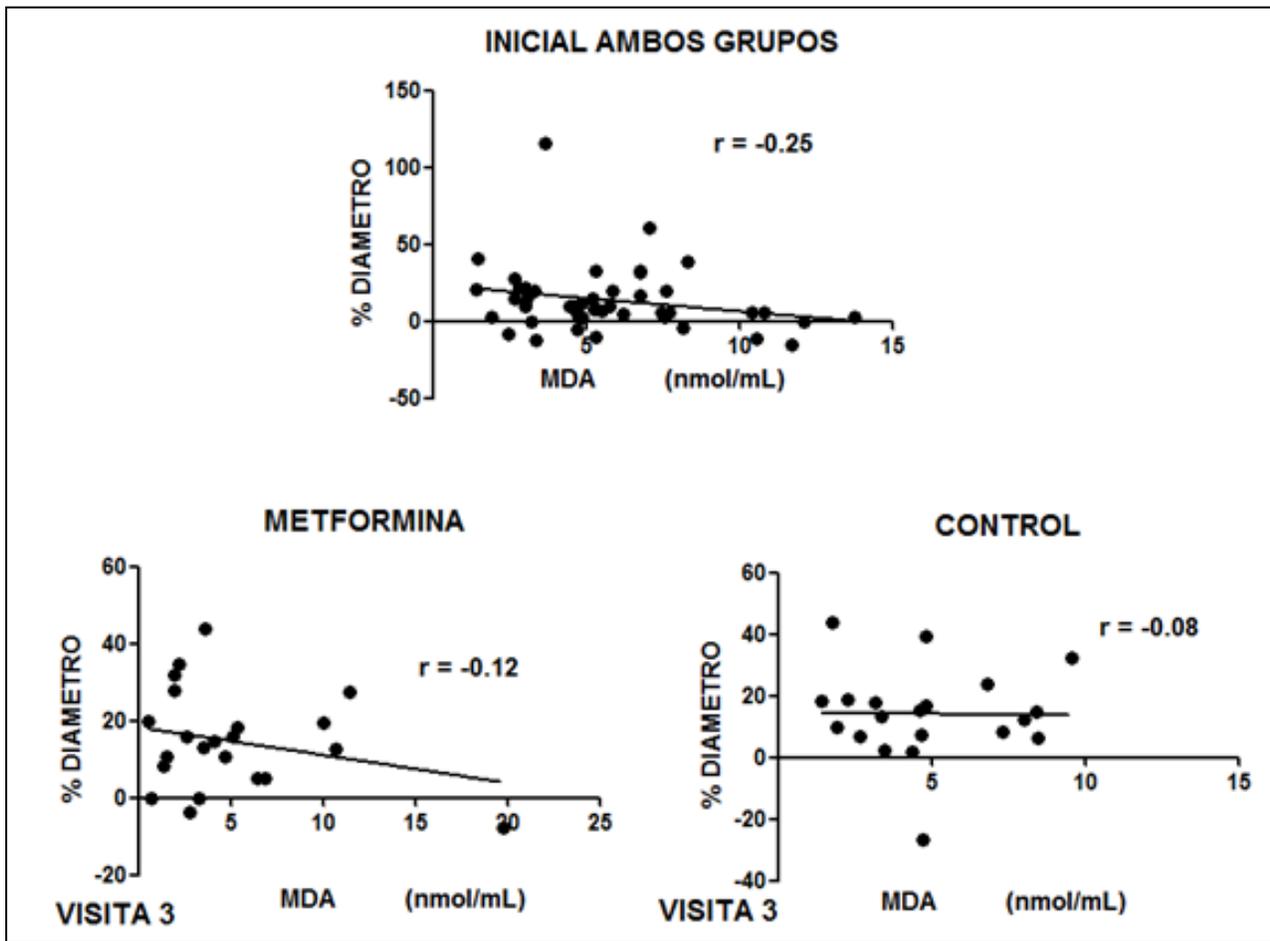
Gráfica 13. Correlación de marcador nitritos con GIMC izquierdo. GIMC: grosor íntima media carotideo; IZQ: izquierdo



Gráfica 14. Correlación de marcador s-nitrosilación con GIMC izquierdo. GIMC: grosor íntima media carotideo; IZQ:izquierdo

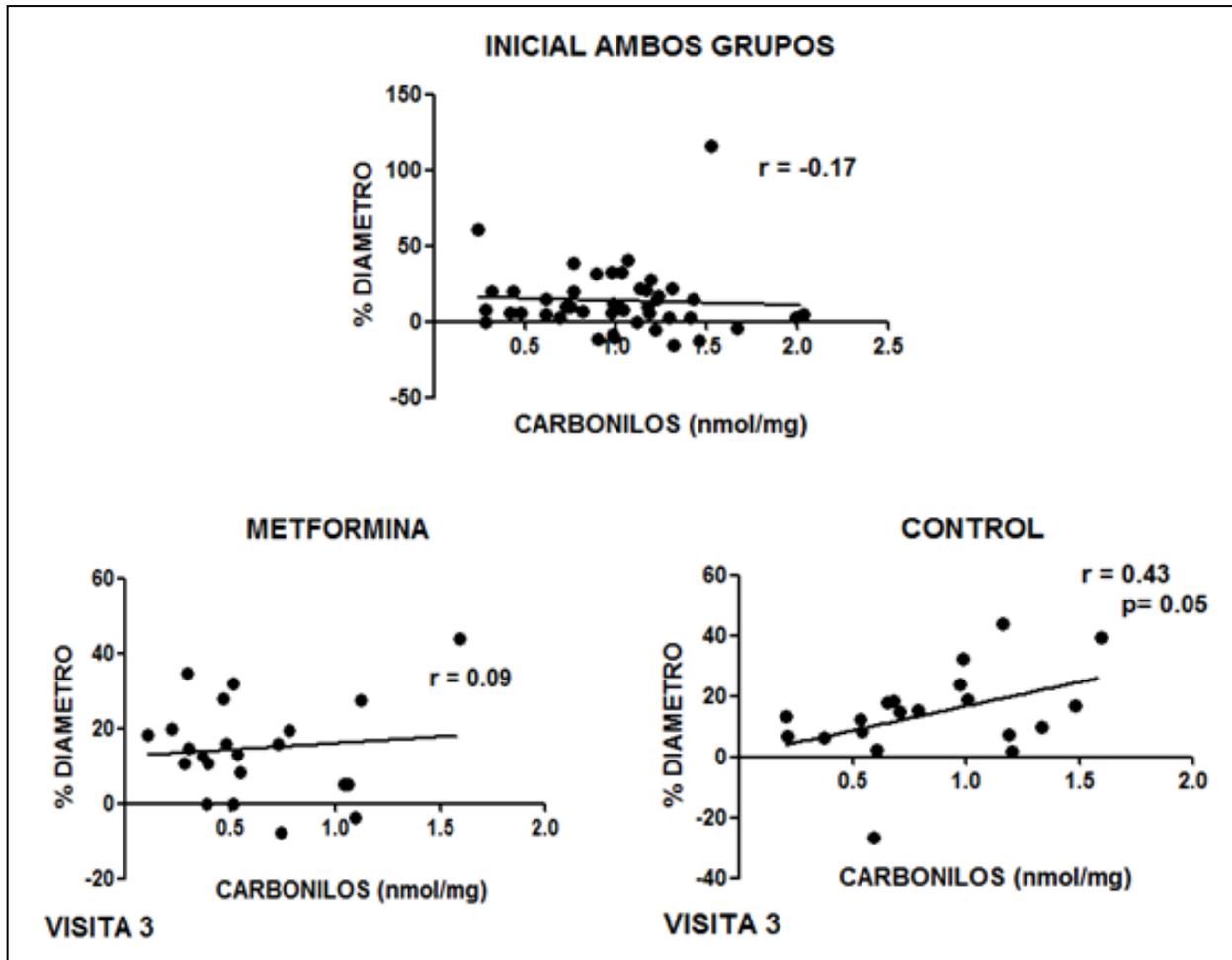
8.8 Correlación de los marcadores de estrés oxidativo/nitrooxidativo con valores de función endotelial.

No se presentó correlación entre los niveles de MDA y cambios en el marcador de función endotelial al inicio del estudio ni al año (visita 3) de seguimiento. [Gráfica 15]



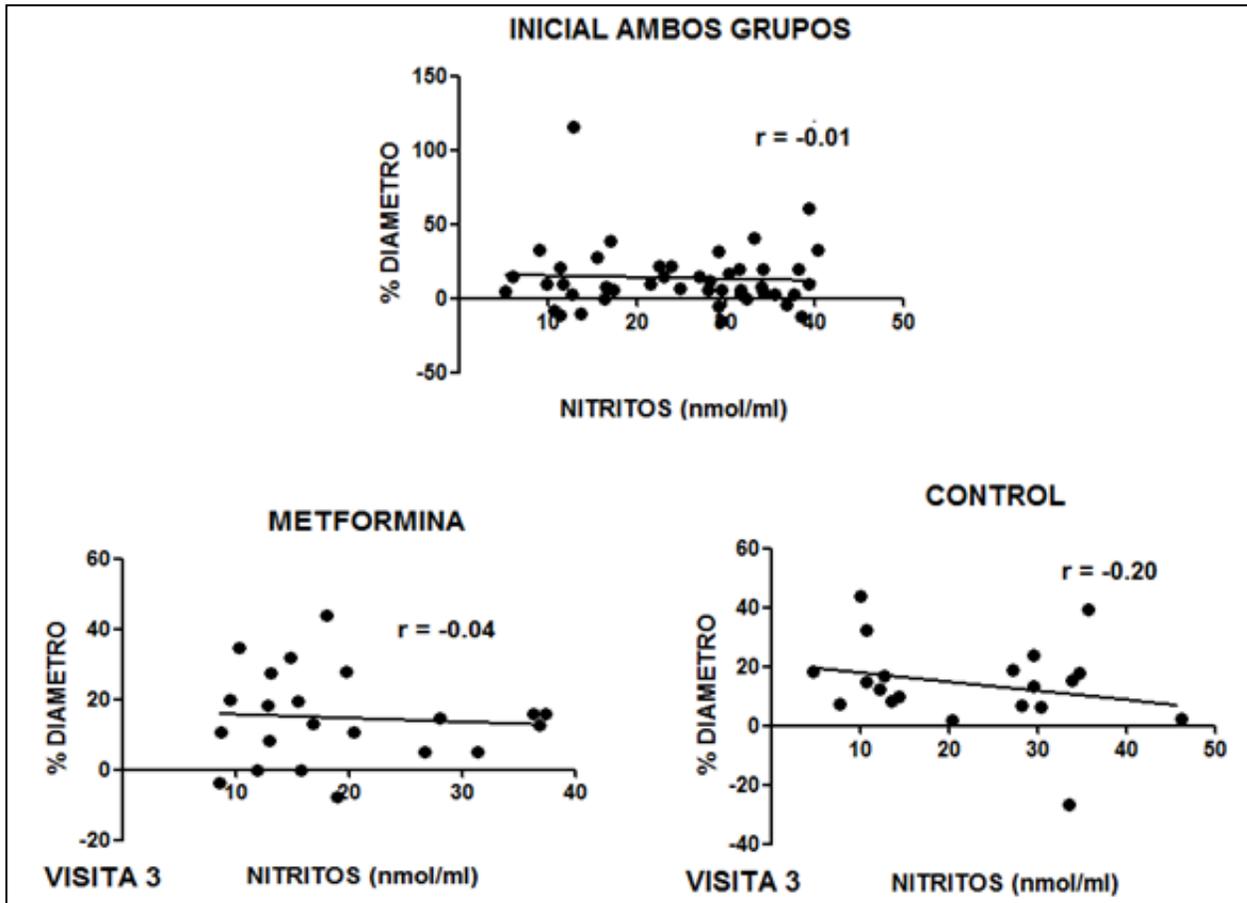
Gráfica 15. Correlación de Función endotelial (% diámetro) con valores de MDA. No se presentó alguna correlación. MDA: malondialdehído

Al realizar el análisis de la correlación de los valores de cambio de diámetro como marcador de función endotelial y carbonilos al inicio del estudio no se observó correlación alguna, sin embargo al año (visita3) esto cambió ya que el grupo control presenta una correlación positiva $r=0.43$ ($p\leq 0.05$), como se ilustra en la gráfica 16.



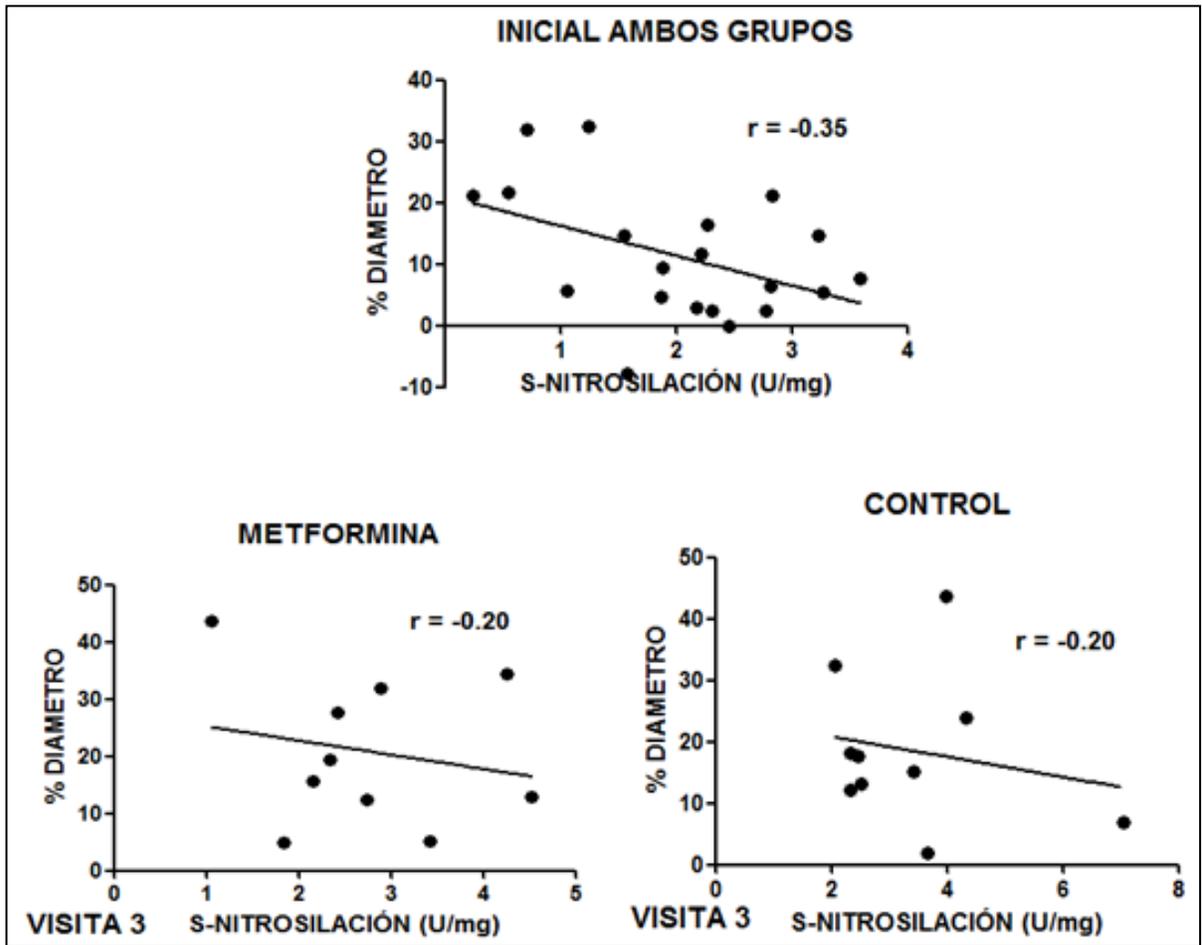
Gráfica 16. Correlación de Función endotelial (%diámetro) con valores de carbonilos (nmol/mg).

Con los valores de nitritos y cambios en el diámetro no se observó correlación alguna inicial y al año (visita 3) de seguimiento de estudio, gráfica 17.



Gráfica 17. Correlación de Función endotelial (% diámetro) con valores de nitritos (nmol/ml).

Con los niveles de s-nitrosilación y cambios en el diámetro, no existió correlación alguna al inicio del estudio además que no hubo cambio posterior al año (visita 3) del estudio, gráfica 18.

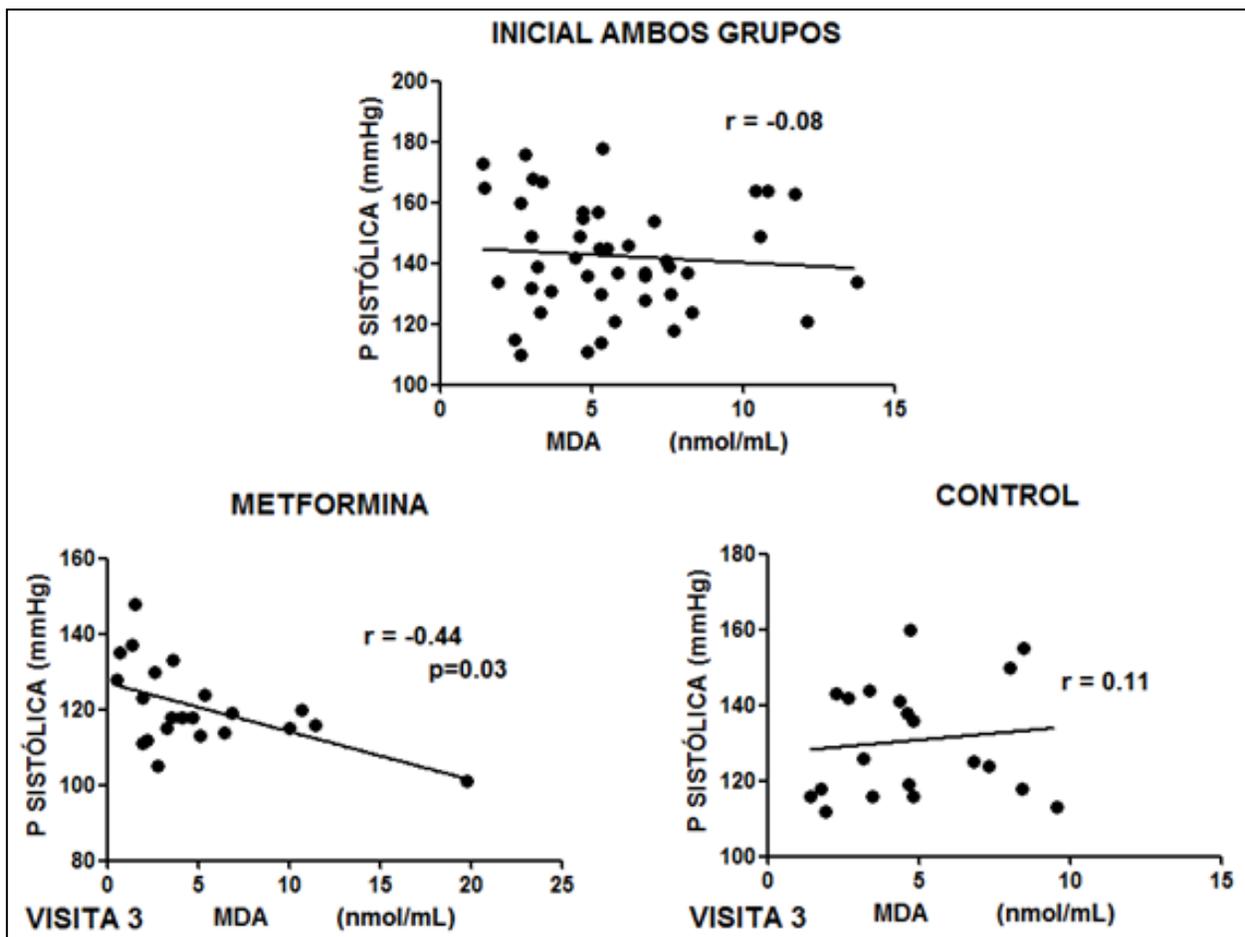


Gráfica 18. Correlación de Función endotelial (% diámetro) con valores de S-nitrosilación (U/mg).

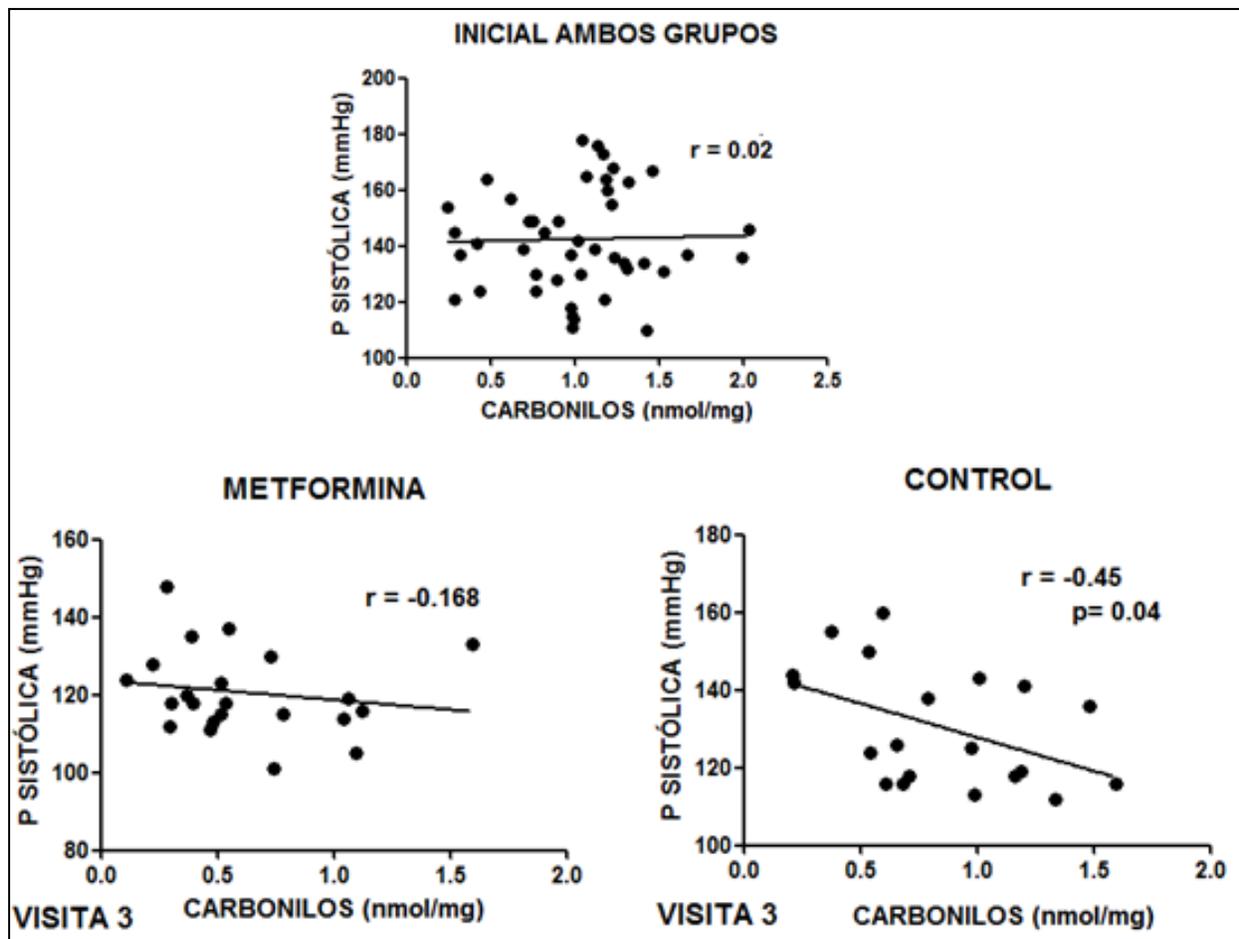
8.9 Correlación de los marcadores de estrés oxidativo/nitrooxidativo con cifras de PA.

8.9.1 Cifras de presión sistólica.

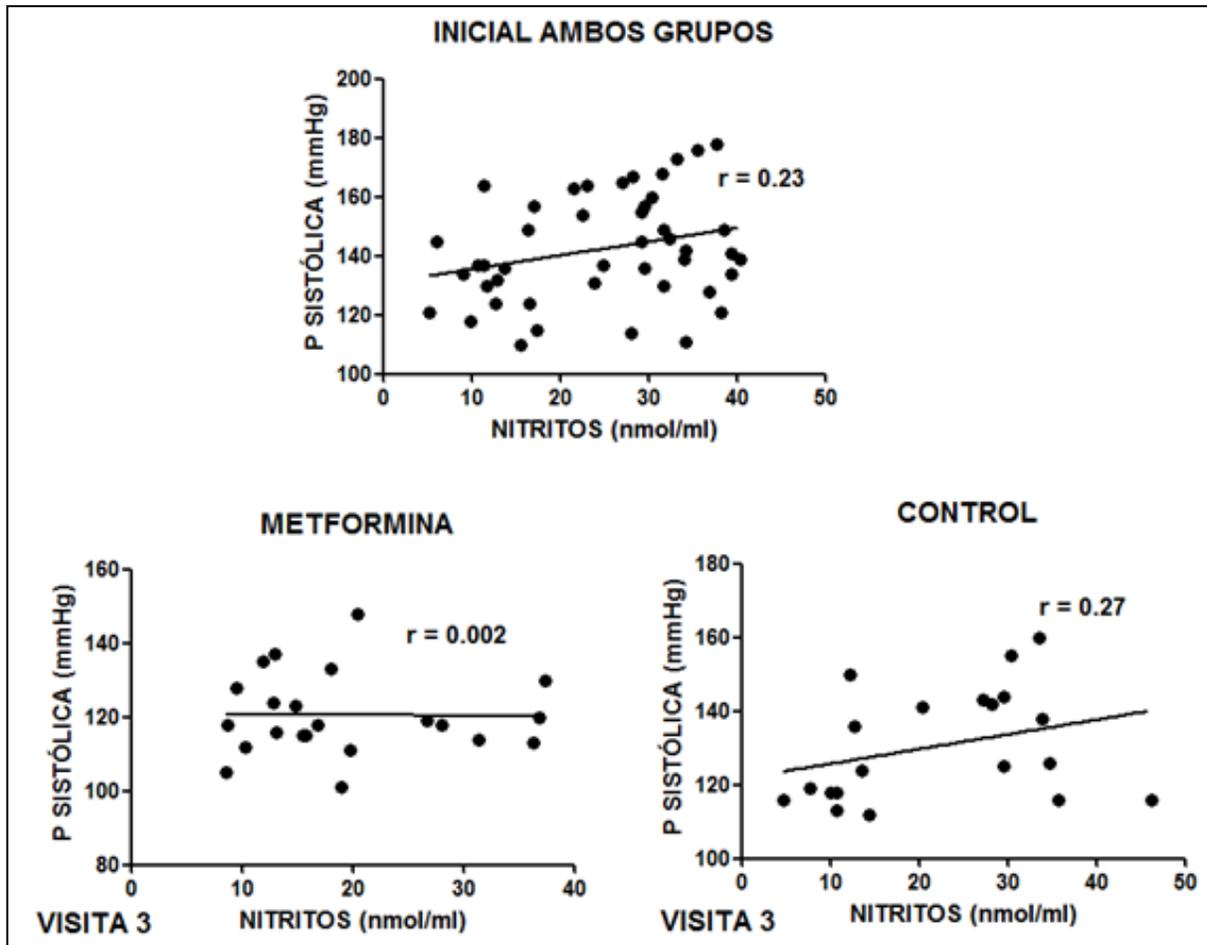
No se encontró correlación entre los marcadores MDA, nitritos, carbonilos, S-nitrosilación y las cifras de presión sistólica al inicio y año (visita 3) del estudio como se muestra en las gráficas 19, 20, 21 y 22.



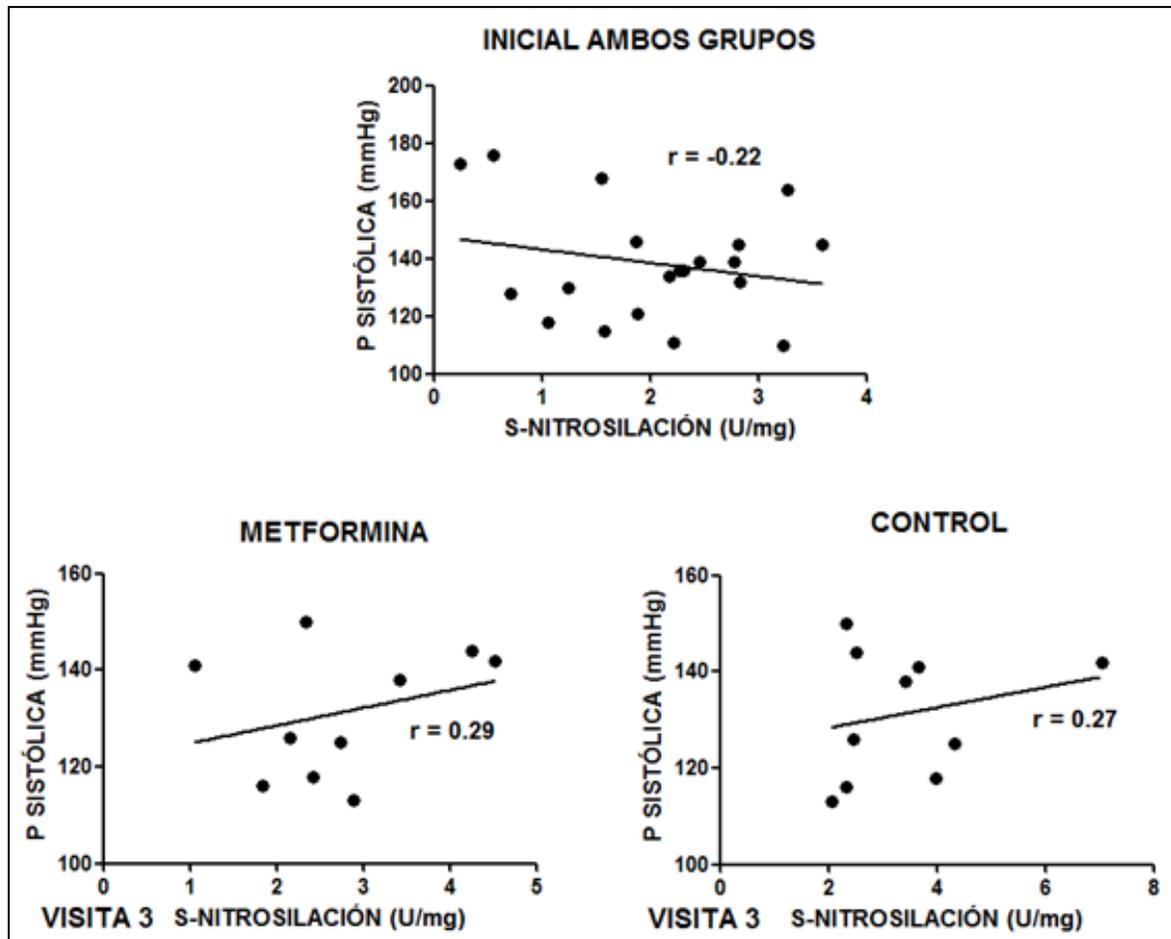
Gráfica 19. Correlación de presión sistólica (mmHg) con valores de MDA. P=presión; MDA: malondialdehido



Gráfica 20. Correlación de presión sistólica (mmHg) con valores de carbonilos (nmol/mg). P=presión.



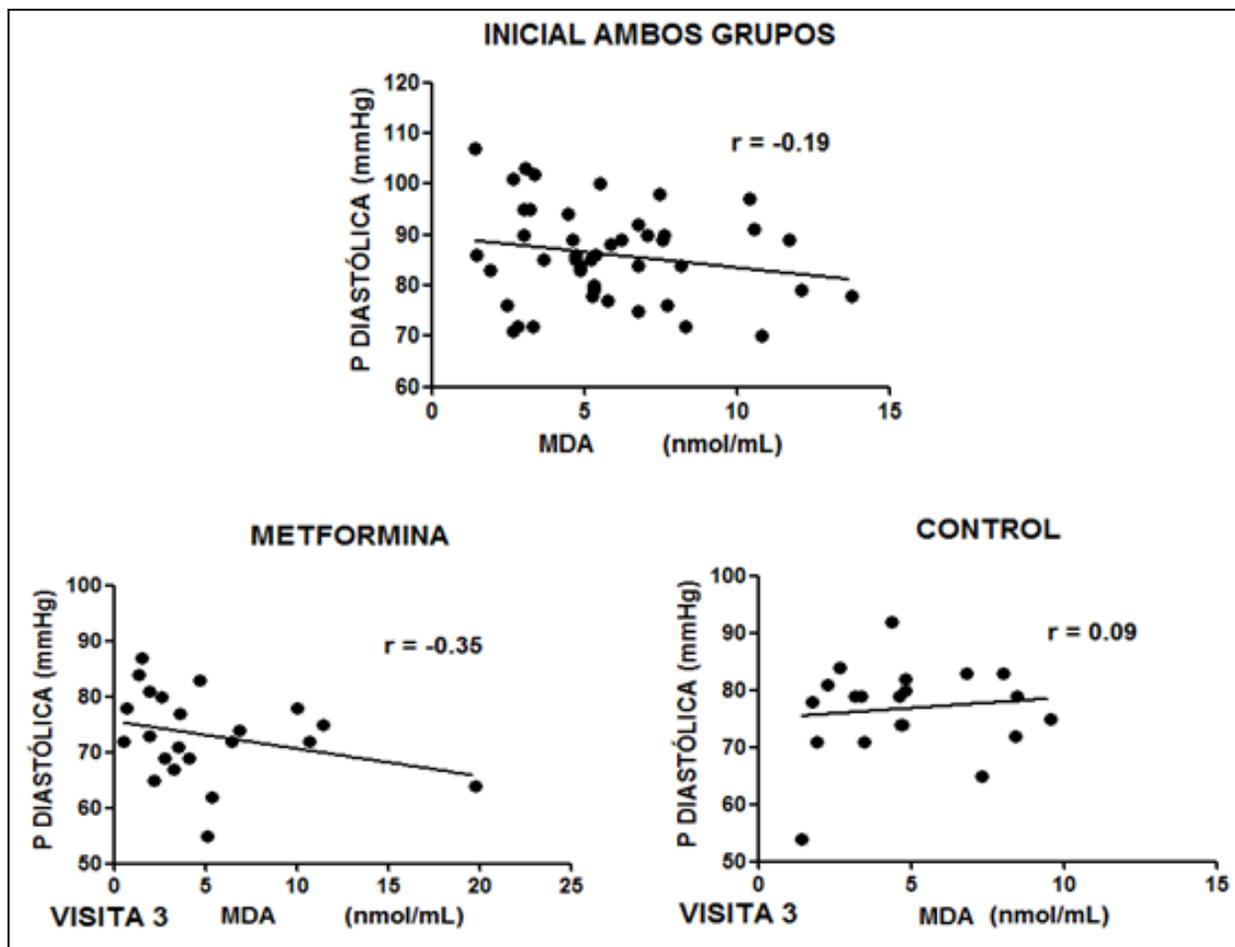
Gráfica 21. Correlación de presión sistólica (mmHg) con valores de nitritos P=presión.



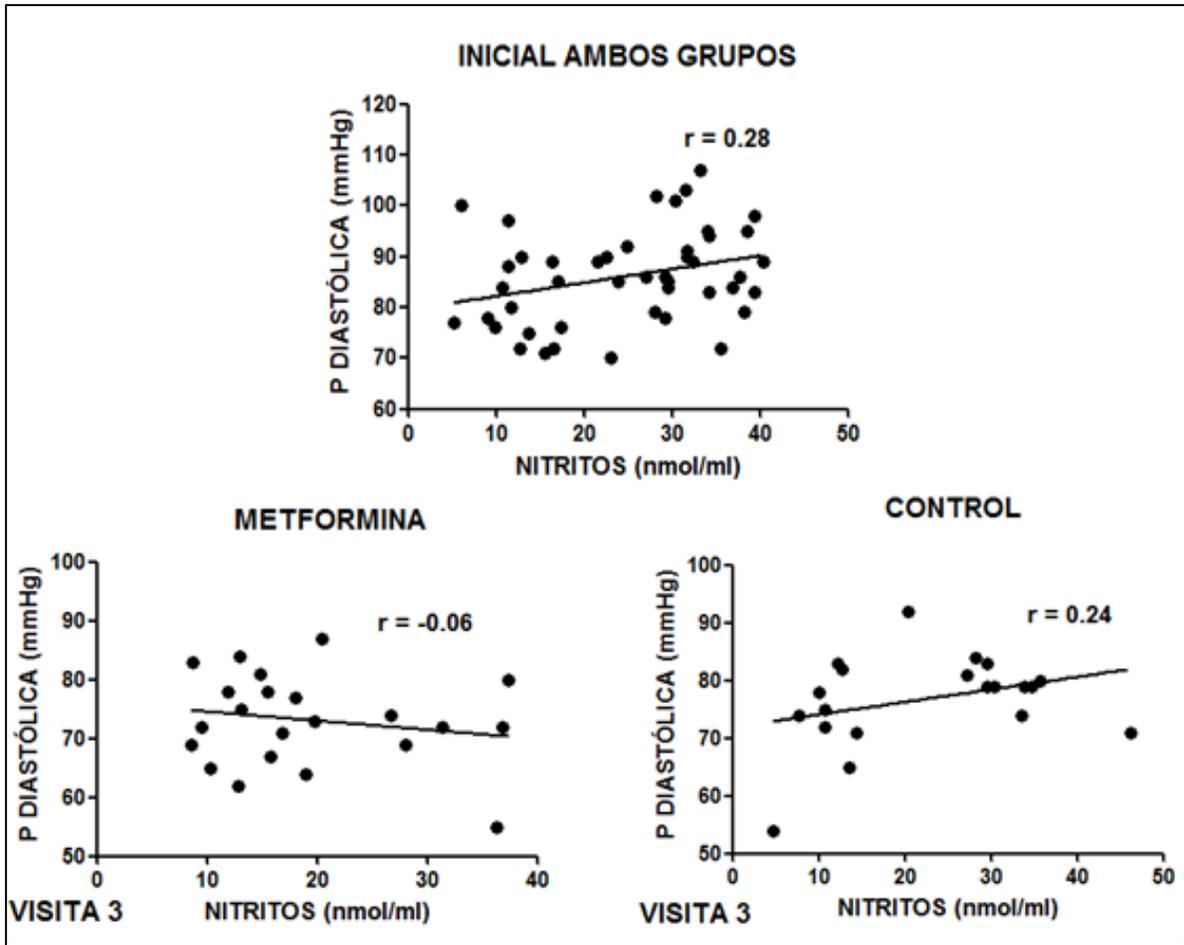
Gráfica 22. Correlación de presión sistólica (mmHg) con valores de s-nitrosilación (U/mg). P=presión.

8.9.2 Cifras de presión diastólica.

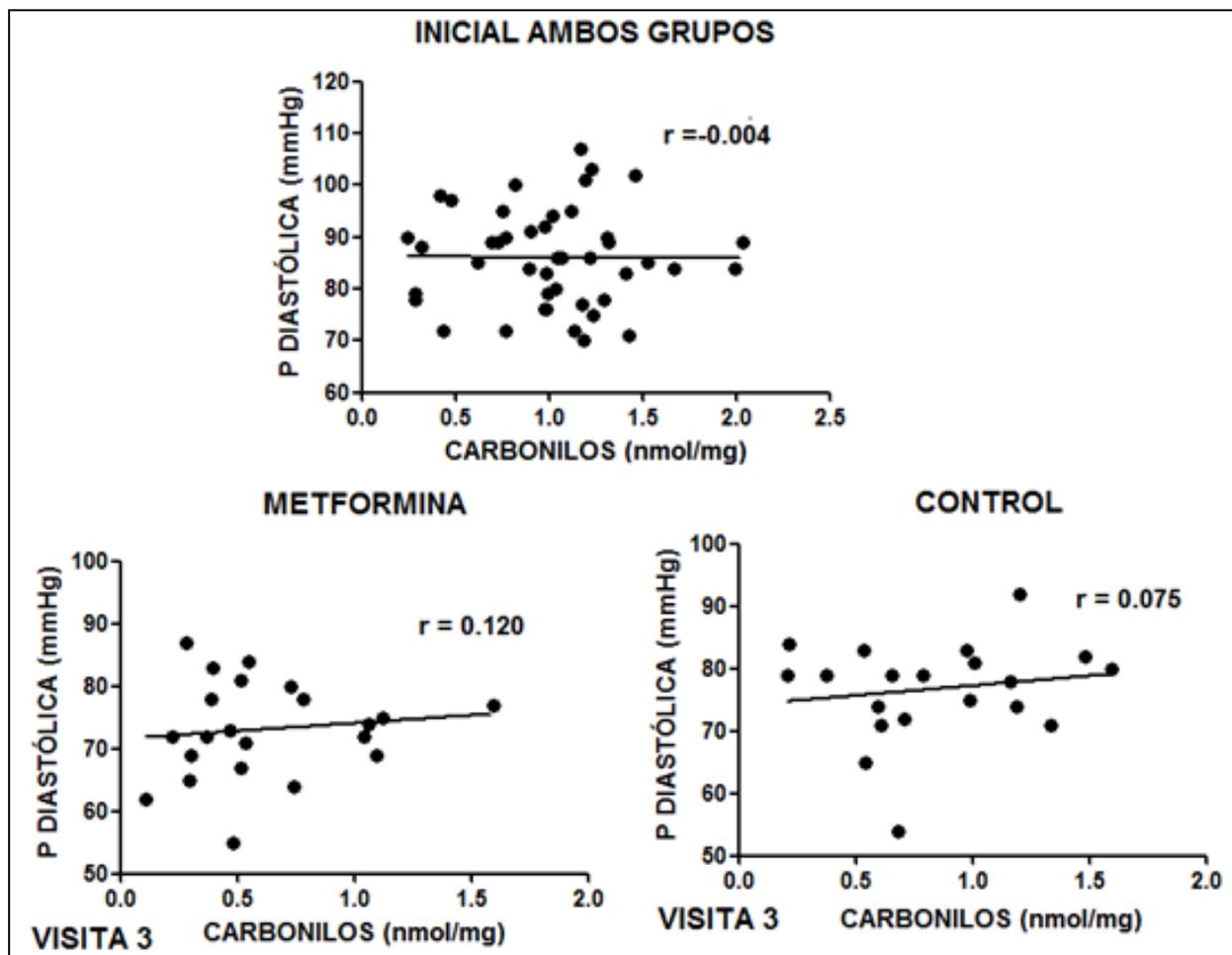
No se encontró correlación entre los marcadores de MDA, carbonilos, nitritos y S-nitrosilación con cifras de presión diastólica en ambos grupos de estudio como se muestra en las gráficas 23, 24, 25, 26.



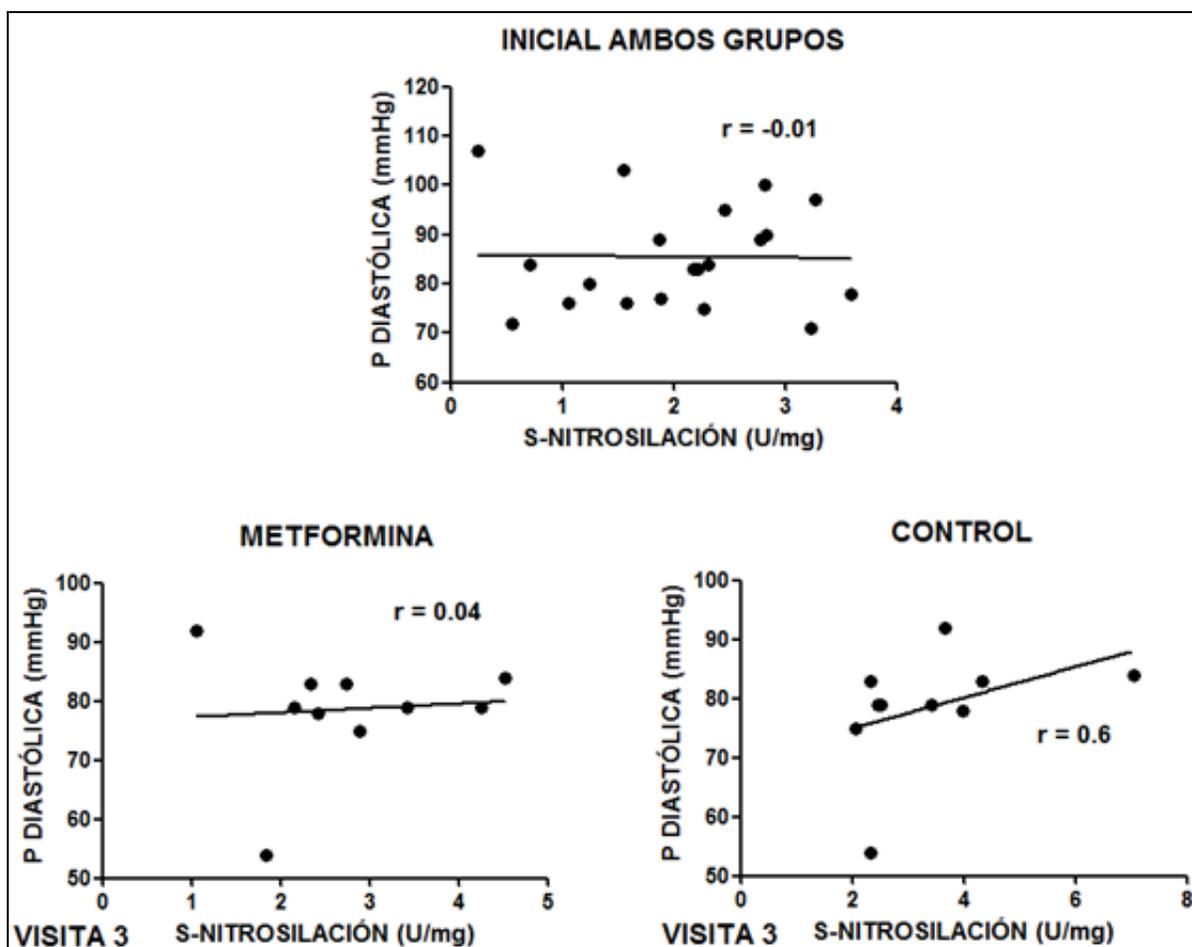
Gráfica 23. Correlación de presión diastólica (mmHg) con valores de MDA P=presión.



Gráfica 24. Correlación de presión diástolica (mmHg) con valores de nitritos. P=presión.



Gráfica 25. Correlación de presión diastólica (mmHg) con valores de carbonilos (nmol/mg). P=presión.



Gráfica 26. Correlación de presión diastólica (mmHg) con valores de s-nitrosilación (U/mg). P=presión.

9. DISCUSIÓN

El desarrollo de HAS en el contexto de SM se asocia a obesidad y RI. ^{[30][51][52]} De tal forma que la obesidad abdominal origina un aumento en la reabsorción de sodio y estimula la liberación de renina mientras que la resistencia a la insulina activa al SNS.^[50] En ambos casos existe sobreexpresión del SRAA, el cual propicia la generación de retención de volumen y de sodio, disminución en la producción de NO en células endoteliales y vasoconstricción del músculo liso por generación de angiotensina II, que conducen a la disfunción endotelial, rigidez y remodelación de las arterias pequeñas. ^{[53][54][159]}

El término DE indica que el endotelio no cumple apropiadamente sus funciones, debido a una menor biodisponibilidad de NO, debido a aumento del estrés oxidativo/nitrosativo vascular, mecanismo intracelular etiopatogénico central. ^{[103][159]}

La metformina, es un medicamento ampliamente utilizado en la práctica clínica para el manejo de DM2 y SOP. ^{[116][160]} El estudio UKPDS mostró una disminución del 40% de complicaciones cardiovasculares a largo plazo en pacientes con DM2 tratados con metformina, independiente de su acción como sensibilizante de la insulina.^[135] Se sabe que el principal efecto de la metformina es mejorar la sensibilidad a la insulina en tejidos periféricos y el efecto que tiene en el peso corporal, la circunferencia abdominal y el IMC, ^{[137][138]} en nuestro estudio el grupo tratado con metformina mostró un mejor control de la glucosa. Sin embargo, no se observaron diferencias en cuanto al peso corporal y el IMC, lo que concuerda con estudios previos. ^{[152][161]}

La metformina ha mostrado disminuir los valores plasmáticos de lípidos, ^{[150] [162][163]} en nuestro estudio se observó un aumento significativo del c-HDL en el grupo tratado con metformina, observaciones similares fueron reportadas en el estudio MEFISTO. ^[152]

También se ha demostrado el aumento de la actividad de paraoxonasa. Es decir, el efecto de la metformina no solo pareciera elevar el c-HDL sino mejorar la actividad antioxidante de esta lipoproteína. ^[164]

Se han propuesto algunos mecanismos mediante los cuales la metformina podría disminuir las cifras de presión arterial, independientes de la mejoría en la sensibilidad a la insulina. Entre ellos se ha propuesto la disminución de la inflamación y la activación endotelial.

^{[117][150][165][166]} A pesar de que en el presente estudio no se midieron dichos parámetros, ambos grupos de pacientes mostraron una disminución en las cifras de presión arterial y disminución del GIMC. La función endotelial tampoco varió significativamente entre ambos grupos, sin embargo, se observó una tendencia hacia la mejoría en la función endotelial en los pacientes tratados con metformina, que bien podría explicar el papel protector cardiovascular de la metformina reportado en otros estudios. ^[152]

Por otra parte, se sabe que la HAS, la obesidad, la hiperglucemia y la dislipidemia aumentan el estado de estrés oxidativo. La metformina en estudios *in vitro*, ha demostrado reducir la producción de EROs, a través de la inhibición de NADPH oxidasa. ^[166] También disminuye la lipoperoxidación y aumenta la expresión de la eNOS en ratas diabéticas. ^{[133] [167]} La metformina inhibe la producción de los α -dicarbonilos: glioxal y metilglioxal principales precursores de los AGEs y generadores de las complicaciones vasculares en estados de hiperglucemia. ^[168] En humanos, se ha observado que la administración de metformina por 12 semanas, aumenta los niveles plasmáticos de la SOD ^[169] y disminuye los niveles de isoprostanos (8-iso-PGF). ^[170] Estos estudios sin embargo, han incluido pacientes diabéticos y las dosis de metformina utilizadas han sido de 1000-1700 mg. El estudio MEFISTO, que utilizó 850mg de metformina en pacientes con SM mostró una disminución de carbonilos y un aumento de ON. ^[152] Nuestro estudio mostró también disminución de carbonilos en pacientes

con HAS y SM. La dismunción de carbonilos podría traducirse como una disminución de la oxidación de proteínas y una disminución de la inflamación vascular que se presenta en el SM. Este mecanismo antiinflamatorio es independiente del NO, ya que los niveles de nitritos no presentaron cambio significativo, además de que se observó un aumento de la S-nitrosilación en el grupo control no tratado con metformina. La medición de parámetros de la función vascular no mostró cambios significativos mayores para el grupo de metformina en cuanto al GIMC, sin embargo, si se observó una tendencia a la mejoría de la función endotelial, que podría ser tiempo-dependiente, es decir que, quizás un año de seguimiento no basta para ver estos cambios de manera significativa. La disminución de estrés carbonílico podría estar relacionada a esta mejoría en la función endotelial. [Gráf. 3]

Carecemos de valores normales en los marcadores oxidativos, aunque hay evidencia en la literatura de la medición de éstos en diferentes tejidos y poblaciones, los valores reportados en cada estudio varían de forma importante, sugiriendo que esta variación podría ser tejido específica, de género, dependiente de factores de riesgo cardiometabólicos o enfermedades y étnicas. [171][172] Hicks y cols [173], realizaron un estudio en población mexicana, “aparentemente sana” de entre 41 a 50 años de edad y reportaron niveles de carbonilos de 0.62 ± 0.035 nmol/mg proteína. Sin embargo, no se describen los parámetros antropométricos ni de laboratorio para esta población, lo que hace difícil interpretar si realmente era una población sana y libre de factores de riesgo cardiometabólico.

Los niveles plasmáticos de carbonilos reportados por Dalle-Done son de 0.4-1.0nmol/mg proteína, [174] en nuestra población de estudio obtuvimos valores dentro de este rango observando que el grupo que recibió tratamiento con metformina durante un año presento una disminución, con lo cual podríamos inferir que esta población se encontraba en un estado de estrés carbonílico aumentado.

En cuanto al marcador de MDA, la técnica utilizada más utilizada fue la reacción con ácido tiobarbitúrico (TBARs). Diversos estudios, con poblaciones diferentes mostraron niveles más bajos que los que nosotros obtuvimos en nuestro estudio, ^{[175][176][177]} esto podríamos explicarlo por la diferencia en la técnica utilizada.

Los valores de nitritos reportados por Armanie y cols ^[178] en población venezolana con SM y cifras mayores de 130/85 son de $88.55 \pm 8.30 \mu\text{mol/L}$, los cuales difieren bastante con los obtenidos en nuestro estudio: 14.2-33.4 nmol/ml.

Los resultados de este estudio sugieren que la metformina sería un coadyuvante importante en el tratamiento de los pacientes hipertensos con SM, que ayudaría en la disminución del estrés carbonílico y se vería reflejado en una disminución de la inflamación vascular y mejoría a largo plazo de la función endotelial.

10.LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Este estudio tiene algunas limitaciones. No se midieron las cifras de glucosa postprandial, lo que podría haber ayudado a determinar si nuestros pacientes presentaban alteraciones de la glucosa, más allá de la glucosa alterada de ayuno. Por cuestiones de tiempo no se realizó la medición de citocinas inflamatorias o moléculas de adhesión vascular, ni la capacidad antioxidante de los pacientes lo que hubiera permitido valorar el estado de estrés de nuestros pacientes, así como la medición de AGEs. Actualmente no se cuenta con valores de referencia de marcadores de estrés oxidativo en este tipo de población, sin embargo nuestro estudio contempló dos controles, el mismo paciente y el grupo no tratado con metformina. No obstante, sería importante la determinación en mexicanos sanos, de valores de referencia de marcadores de estrés oxidativo y nitrooxidativo. Además, nuestro estudio estuvo limitado a un

año, cuando algunos cambios, sobre todo de la dinámica vascular requieren tiempos de observación más prolongados.

11.CONCLUSIONES

- a) Metformina a una dosis de 850mg/día durante un año disminuye los niveles de carbonilos en pacientes hipertensos con SM.
- b) Metformina a una dosis de 850mg/día durante un año eleva los niveles de c-HDL en pacientes hipertensos con SM.

12.PERSPECTIVAS

Se requiere de estudios adicionales, que incluyan la medición de AGEs, citocinas proinflamatorias y NF-kB; así como estudios a largo plazo para determinar si la metformina en dosis de 850mg/día contribuye a la disminución del riesgo cardiometabólico en pacientes con SM.

13.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Reaven GM. Insulin resistance, the insulin resistance syndrome and cardiovascular disease. *Panminerva Med* 2005;47:201-210
2. Córdoba JA, Barquera S, Campos I, y col. Análisis de conglomerados de factores de riesgo para enfermedades crónicas en adultos mexicanos. *Draft* 2007
3. Kylin E. Studien ueber das hypertonie-hyperglykamie-hyperurikamie syndrom. *Zentrablatt Fue Innere* 1923; 44: 105-127
4. Vague J. Sexual differentiation, a factor affecting the forms of obesity. *Pres Med* 1947; 30: 339-40.
5. Reaven G, Calciano A, Cody R, Lucas C, Millar R. Carbohydrate intolerant and hyperlipemia in patients with myocardial infarction without known diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 1963; 23: 1013-23.
6. Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988;37:1595-607.
7. Ferrannini E, Buzzigoli G, Bonadonna R, et al. Insulin resistance in essential hypertension. *N Engl J Med* 1987;317:350-7.
8. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabet Med.* 1998; 15: 539-53.
9. Rojas R, Palma O, Quintana I. Adultos. En: Olaiz G, Rivera J, Shamah T, Villalpando S, Hernández M, Sepúlveda J (eds). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006 (ENSANUT 2006)*. México, DF: Instituto Nacional de Salud Pública, 2006; 75–82.
10. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J; IDF Epidemiology Task Force Consensus Group. The Metabolic syndrome – a new worldwide definition. *Lancet* 2005; 366: 1059-62
11. Balkau B, Charles MA. Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *Diabetes Med* 1999;16:683-689
12. Executive Summary or the third report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (adult treatment panel III). *JAMA* 2001;285:2486-97
13. American Association of Clinical Endocrinologist. Code for dismetabolic syndrome x. <http://www.aace.com>

14. International Diabetes Federation. The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome 2005. Available from:
http://www.idf.org/webdate/docs/metac_syndrome_def-pdf.
15. Aguilar, Rojas, Gómez et al. El síndrome metabólico: un concepto en evolución. *Gac Med Mex* 2004;140: S41-48
16. www.sinais.salud.gob.mx
17. The Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC) 2007 Guidelines for the Management of Arterial Hypertension. *J Hypertens* 2007; 25:1105-87.
18. Lakka HM, Laaksonen DE, Lakka TA, Niskanen LK, The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *JAMA* 2002;288(21):2709-16
19. Assman G, Nofer JR, Schulte H. cardiovascular risk in metabolic síndrome: view from PROCAM study. *Endocrinol Metab Clin* 2004;377-392
20. Tenerz A, Norhammar A, Silveia A, Hamsten A, et al. Diabetes insulin resistance and the metabolic síndrome in patients with acute myocardial infarction without previously know diabetes. *Diabetes Care* 2003;26:2770-2776
21. Gami AS, Witt BJ, Howard DE, Erwin PJ, Gami LA, Somers VK, Montori VM. Metabolic syndrome and risk of incident cardiovascular events and death: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *J Am Coll Cardiol*. 2007; 49:403-414
22. Grundy SM. Metabolic Syndrome: Connecting and Reconciling Cardiovascular and Diabetes Worlds. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47:1093-100.
23. Martin R Salazar, Horacio A Carbajal, Walter G Espeche. Relationships among insulin resistance, obesity, diagnosis of the metabolic syndrome and cardio-metabolic risk. *Diabetes and Vascular Disease Research* 2011 8: 109-116
24. Björntorp, P. Metabolic implications of body fat distribution. *Diabetes Care* 1991; 14, 1132-1143
25. Bouchard C. Genetics and metabolic syndrome. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1995; 19 (suppl 1): 552-559
26. Phillips DLW, Barker DJP, Hales CN, Osmond C, Thinness at birth and insulin resistance in adult life. *Diabetologia* 1994; 37: 150-154.

27. Corti R, Hutter R, Badimon JJ, Fuster V. Evolving concepts in the triad of atherosclerosis, inflammation and thrombosis. *J Thromb Thrombolysis*. 2004;17:35–44.
28. Vaverkova H, Harasek D, Novotny D, Jackuliakova D. Apolipoprotein B versus LDL cholesterol: association with other risk factors for atherosclerosis. *Clin Biochem* 2009; 42: 1246-1251
29. Dandona P, Aljada A, Chaudhuri A et al. Metabolic Syndrome. A comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes and inflammation. *Circulation* 2005; 111: 1448-54.
30. Astrup A, Finer N. Redefining type 2 diabetes: “diabesity” or “obesity dependent diabetes mellitus?” *Obes Rev* Oct 2000;1(2):57-9
31. Hall JE, Jones DW, Kuo JJ. Impact of the obesity epidemic on hypertension and renal disease. *Current Hypertens Reo* 2003 Oct; 5(5):386-92
32. Gazi IF, Filippatos TD, Tsimihodimos V, Saougos VG. The hypertriglyceridemic waist phenotype is a predictor of elevated levels of small, dense LDL cholesterol. *Lipids* 2006 Jul; 41(7):647-54
33. De Simone G, Palmieri V, Bella JN, Celentano A, Hong Y, Oberman A. Association of left ventricular hypertrophy with metabolic risk factors: the HyperGEN study. *J Hypertens* 2002 Feb;20(2):323-31
34. Messerli FH, Nunez BD, Ventura HO. Overweight and sudden death. Increased ventricular ectopy in cardiopathy of obesity. *Arch Intern Med* 1987;147:1725-28.
35. Thipahty D, Mohanthy P, Dhindsa S, Syed T, Dandona P. Elevation of free fatty acids induces inflammation and impairs vascular reactivity in healthy subjects. *Diabetes*. 2003;52:2882-2887
36. Tall AR, Wang N. Tangier disease as a test of the reverse cholesterol transport hypothesis. *J Clin Invest* 2000;106:1205-1207
37. Berg, A. H. & Scherer, P. E. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ.Res.* 2005; 96: 939–949
38. Iwashima Y, Katsuyuya T, Ishikawa K, Ouchi N. Hypoadiponectinemia is an independent risk factor for hypertension. *Hypertension* 2004; 43:1318-1323
39. Verma S, Li SH, Wang CH, Fedack PW. Resistin promotes endothelial cell activation. *Circulation* 2003;108:736-740

40. Eikelis N, Schalaich M, Aggarwai A, Kaye D, Esler M. Interactions between leptin and the human sympathetic nervous system. *Hypertension* 2003; 41:1072-1079
41. Jeppesen J, Hein HO, Suadicani P. Relation of high TG-low HDL cholesterol and LDL cholesterol to the incidence of ischemic heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:111-1120
42. Cefalu WT, Cannon CP. *Atlas of cardiometabolic risk*. 1st Ed. New York, USA: Informa Healthcare, 2007: 78
43. Ohasi R, Mu H, Wang X, Yao Q. Reverse cholesterol transport and cholesterol efflux atherosclerosis. *QJM* 2005;98(2):845-856
44. Heinecke JW. Mechanisms of oxidative damage of low-density lipoprotein in human atherosclerosis. *Curr Opin Lipido*. 1997;8:268-74
45. Triana Mantilla, La hiperglicemia y sus efectos tóxicos. *Rev Cubana Angiol y Cir Vasc* 2001;2(2):131-41
46. Reaven GM. Insulin resistance and its consequences. *Diabetes mellitus: a fundamental and clinical text*. 3rd. Ed Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins, 2004:pp.899-915
47. Aronson Doron, Rayfield Elliot. How hyperglycemia promotes atherosclerosis: molecular mechanisms. *Cardiovascular Diabetology* 2002;1(1):1
48. Mikhail Nasser, Golub Michael, Tuck Michael. Obesity and hypertension. *Progress in cardiovascular disease* 1999;42(1):39-58
49. Rahmouni Kamal, Correia Marcelo, Haynes William. Obesity-Associated Hypertension. *New insights into mechanisms Hypertension*. 2005; 45:9-14
50. Aneja Ashish, El-Atat Fadi, Macfarlane I. Hypertension and obesity. *Recente Profess in Hormone Research*. 2004;59(1):169- 205
51. Reaven GM, Lithell H, Landsberg L. Hypertension and associated metabolic abnormalities-ther role of insuline resistance and the sympathoadrenal system. *N Engl J Med* 1996;334:374-81
52. Low Wang C, Goalstone ML, Draznin B. Molecular mechanisms of insulin resistance that impact cardiovascular biology. *Diabetes* 2004; 53:2735-2740
53. Sowers JR, Fronlic,h ED. Insulin and insulin resistance: impacto n blood pressure and cardiovascular disease. *Med Clin North Am* 2004;88:63-82
54. Redon Josep, Cifkova Renata, Laurent Stephane y cols. Mechanisms of hypertension in the cardiometabolic syndrome. *Journal of Hypertension* 2009,vol 27(3); 441-451

55. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases. The role of oxidant stress. *Circ Res* 2000;87: 840-84
56. Redon Josep, Cifkova Renata, Laurent Stephane y cols. Mechanisms of hypertension in the cardiometabolic syndrome. *Journal of Hypertension* 2009, vol 27(3); 441-451
57. Hanson RL, Imperatore G, et al. Components of the metabolic syndrome and incidence of type 2 diabetes. *Diabetes* 2002;51:3120-3127.
58. Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, Forsén, B, Lahti K, Nissén M, Taskinen MR, Groop L. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 2001;24:683-689.
59. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, on behalf of the INTERHEART Study Investigators. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet*. 2004;364:937-952.
60. Wilson, PW, D'Agostino, RB. Parise H et al. Metabolic síndrome as a precursor of cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 2005; 112:3066-72
61. Gami A, Witt B, Howard D, Erwin P, Gami L, Somers V y cols. Metabolic Syndrome and Risk of Incident Cardiovascular Events and Death. A systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *J Am Coll Cardiol* 2007;49:403-14
62. Hunt KJ, Resendez RG, Williams K, Haffner SM, Stern MP. National Cholesterol Education Program versus World Health Organization metabolic syndrome in relation to all cause and cardiovascular mortality in the San Antonio Heart Study. *Circulation* 2004;110:1251-1257.
63. Lorenzo C, Williams K, Hunt KJ, Haffner S. The National Cholesterol Education Program-Adult Treatment Panel III, International Diabetes Federation and World Health Organization Definitions of the Metabolic Syndrome as Predictors of Incident Cardiovascular Disease and Diabetes. *Diabetes Care* 2007;30:8-13
64. Hanson RL, Imperatore G, Bennett PH, Components of the "metabolic syndrome" and incidence of type 2 diabetes. *Diabetes* 2002;51:3120-3127
65. Calderin O y González O. Síndrome metabólico vs síndrome de insulinoresistencia. Diferentes terminos, clasificaciones y enfoques ¿existe o no?. *Rev. Cub Endocrinol.* 2006, 17-3.
66. Consenso Latinoamericano de la Asociación Latinoamericana de Diabetes (ALAD), Epidemiología, Diagnóstico, control, prevención del Síndrome Metabólico en adultos.

67. Stone NJ, Saxon D .Approach to treatment of the patient with metabolic syndrome: lifestyle therapy. *Am J Cardiol.* 2005; 22;96(4A):15E-21E
68. Knowler WC, Barret Conor E, Fowler SE et al. Diabetes Prevention Program Research Group. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med.* 2002;346:393-403
69. Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation and Treatment of overweight and obesity in adults- the evidence report national institutes of health. *Obes Res* 1998;6(2):51S-209S
70. Van Gaal LF, Wauters MA, De Leeuw. The beneficial effects of modest weight loss on cardiovascular risk factor. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1997;21:Suppl 1
71. Franklin BA, Kahn JK, Gordon NF, Bonow RO. A cardioprotective polypill? Independent and additive benefits of lifestyle modification. *Am J Cardiol* 2004;94:162-166
72. Sacks FM, Svetkey LP, Vollmer WM, Appel LJ. Effect on blood pressure of reduced dietary sodium and the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) diet. *N Engl J Med* 2001; 3443-10
73. Feldam R. ACE inhibitor versus AT1 blockers in the treatment of hypertension and Syndrome X. *J Cardiol* 2000;16 Suppl E:41-44
74. Barnett AH, Bain SC, Bouter P, Karberg B, Madsbad S, Jervell J, Mustonen J. Diabetics exposed to telmisartan and enalapril study group. Angiotensin-receptor blockade versus converting-enzyme inhibition in type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med* 2004;351:1952-1961
75. Henández y cols. Guía de tratamiento farmacológico para el control de la hipertensión arterial 2009. Adendum a la NOM030 Rev. *Mex Cardiol* 2009;20(2):55-104
76. The ALLHAT Collaborative Research Group. The antihypertensive and lipid lowering treatment to prevent heart attack trial. Major outcomes in high-risk hypertensive patients randomized to angiotensin-converting enzyme inhibitor or calcium channel blocker vs diuretic. *JAMA* 2002;288:2981-2997
77. Ballantyne CM, Olsson AG, Cook TJ, Mercuri MF, Pedersen TR, Kjekshus J. Influence or low high density lipoprotein cholesterol and elevated triglyceride on coronary heart disease events and response to simvastatin therapy. *Circulation.* 2001;104:3046-3051
78. Barter PJ, Rye KA Is there a role for fibrates in the management of dyslipidemia in the metabolic syndrome? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:39-46

79. Mills E, Prousky J, Raskin G, Gagnier J, Rachis B. The safety of over the counter niacin. A randomized placebo-controlled trial. *BMC Clin Pharmacol* 2003; 3:4
80. Grundy SM, Vega GL, Yuan Z, Battisti WP. Effectiveness and tolerability of simvastatin plus fenofibrate for combined hyperlipidemia. *Am J Cardiol* 2005;95:462-468
81. Antithrombotic trialists collaboration. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction and stroke in high risk patients. *BMJ* 2002;324:71-86
82. Buchanan TA, Xiang AH, Peters RK, Kjos SL, Marroquin A, Goico J, Ochoa C. Preservation of pancreatic beta-cell function and prevention of type 2 diabetes by pharmacological treatment of insulin resistance in high-risk hispanic women. *Diabetes* 2002;51:2796-2803
83. Chiasson JI, Josse RG, Gomis R, Hanefeld M, Karasik A, Laakso M. Acarbose treatment and the risk of cardiovascular disease and hypertension in patients with impaired glucose tolerance. *JAMA* 2003;209:486-494
84. Hurtado Bredda, Vaeza Nin, Amonini Rubbo. Estrés oxidativo y nitrosativo en la sepsis. *Med Intensiva* 2005;29(3):159-65
85. Konisberg Fainstein Mina, Radicales libres y estrés oxidativo. *México Manual Moderno* 2008; 135-146
86. Medina-Navarro R, Hicks JJ, Olivares Corichi I, Guzmán Alberto. Especies reactivas de oxígeno: bioquímica inorgánica y biomedicina. En *Bioquímica*, JJ Hicks. México Mc Graw-Hill, 2004; 690-708
87. Hua Cai and Harrison David, Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases: The role of oxidant stress. *Circ Res.* 2000;87:840-844
88. Roberts Christina, Sindhub Kunal. Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Science* 2009;84; 705-712
89. Ceballos R, Ramírez Sánchez, Calzada Claudia, Olivares Corichi, Disfunción endotelial y estrés oxidativo, *Rev Endocr y Nut* 2006;14(4); 233-236
90. Paravicini Tamara, Touyz Rhian. NADPH Oxidases, Reactive oxygen species and hypertension. *Diabetes Care* 2008;31,170-180
91. Kamakshi Sachidanandam, Sussan C Fagan, Advije Ergul Oxidative stress and cardiovascular disease: antioxidants and unresolved issues, *Cardiovascular Drug Reviews* 2005;23(2): 115-132
92. Guzmán-Grenfell A, Hicks JJ, Óxido nítrico. *Bioquímica*, JJ Hicks. México Mc Graw-Hill, 2004; 677-688

93. Claudio Napoli and Louis J. Ignarro Nitric Oxide and Pathogenic Mechanisms Involved in the Development of Vascular Diseases Arch Pharm Res Vol 32, No 8, 1103-1108, 2009
94. Go Y-M, Patel RP, Maland MC, Park H, Beckman JS, Darley-Usmar. Evidence for peroxynitrite as a signaling molecule in flow-dependent activation of c-Jun. Am J Physiol Heart Circ Physiol 1999;277:647-653
95. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the bad and the ugly. Am J Physiol 1996;271:1424-1437
96. Nedeljkovic Z S, Gokce N, Loscalzo J. Mechanisms of oxidative stress and vascular dysfunction. J Postgrad Med 2003;79:195-200
97. Harrison DG. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. J Clin Invest 1997;100:2153-2157
98. Caballero AE. Endothelial dysfunction in obesity and insulin resistance: A road to diabetes and heart disease. Obes. Res. 2003;11:1278-1289
99. Eposito, K; M Ciotola; D.Giugliano. El estrés oxidativo presente en el síndrome metabólico explicaría el elevado riesgo cardiovascular. J Inv Endocr 2006;29:29
100. Clapp B, Hingorani A, Kharbanda R et al. Inflammation-induced endothelial dysfunction involves reduced nitric oxide bioavailability and increased oxidant stress. Cardiovasc. Res 200;64:172-178
101. Vane J, Anggard E, Botting R. Regulatory function of the vascular endothelium. N Engl J Med 1990;323:27-36
102. Nedeljkovic Z S, Gokce N, Loscalzo J. Mechanisms of oxidative stress and vascular dysfunction. J Postgrad Med 2003;79:195-200
103. Vanhoutte Paul M. Endothelial function and dysfunction. Heart Metab 2004;22:510-515
104. Anderson TJ, Uehata A, Gerhard D, Meredith IT Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. J Am Coll Cardiol. 1995;26(5):1235-1241
105. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A: Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003; 23: 168-175.
106. Correti Mary, Anderson Todd, Benjamin Emelia Celermajer David, Charbonneau Francois, Creager Mark. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilatation of the brachial artery. Journal of the American College of Cardiology 2002;39(2):257-65

107. Chambless LE, Heiss G, Folsom AR y col: Association of coronary heart disease incidence with carotid arterial wall thickness and major risk factors: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study, 1987-1993. *Am J Epidemiol* 1997; 146: 483–494.
108. Pignoli Paolo, Tremoli Elena, Poli Andrea. Intimal plus medial thickness of the arterial wall: a direct measurement with ultrasound imaging. *Circulation* 1986;74(6) 1399-1406
109. Konigsberg-Fainstein Mina, Daño a lípidos. Radicales libres y estrés oxidativo México Manual Moderno, 2008; 97-119
110. Dean Roger, FU Shanli, Stocker Roland. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J* 1997;324:1-18
111. Konigsberg-Fainstein Mina, Daño a proteínas. Radicales libres y estrés oxidativo México Manual Moderno, 2008; 97-119
112. Diaz-Acosta A, Membrillo-Hernández Jorge, Consecuencias fisiológicas de la oxidación de proteínas por carbonilación en diversos sistemas biológicos, *Rev. Esp. Cienc. Quim. Biol.* 2006;9(1):34-44
113. Foster MW, McMahon TJ, Stamler JS. S-nitrosylation in health and disease. *Trends Mol Med* 2003;9:160-168
114. Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspectiva on an old paradigm. *Diabetes* 1999;48(1):1-9.
115. Flórez, Jesús; Juan Antonio Armijo y África Mediavilla. *Farmacología humana* 2004, 4ta edición (en español), Elsevier, España, pp. 396.
116. Bailey CJ, Day C: Metformin: its botanical background. *Practical Diabetes International* 21:115–117, 2004.
117. Bailey CJ, Tuner RC. Metformin. *N Engl J Med* 1996;334:574-579
118. Abbasi, F., M. Carantoni, et al. (1998). "Further evidence for a central role of adipose tissue in the antihyperglycemic effect of metformin." *Diabetes Care* 21(8): 1301-5.
119. John hb scarpello, harry cs howlett. Metformin and therapy and clinical uses, review *Diabetes and vascular disease research*, 2008 Sep; 5:3
120. Kirpichnikov D, Mcfarlane SI, Sowers JR: Metformin: an update. *Ann Intern Med* 137:25–33, 2002
121. Klip A & Leiter LA: Cellular mechanism of action of metformin. *Diabetes Care* 1990; 13:696-704.

122. Kim, Y. D., K. G. Park, et al. (2008). "Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis through AMP-activated protein kinase-dependent regulation of the orphan nuclear receptor SHP." *Diabetes* 57(2): 306-14.
123. Kahn, B. B., T. Alquier, et al. (2005). "AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism." *Cell Metab* 1(1):15-25.
124. Habinowski, S. A. and L. A. Witters (2001). "The effects of AICAR on adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells." *Biochem Biophys Res Commun* 286(5): 852-6.
125. Ciaraldi, T. P., A. P. Kong, et al. (2002). "Regulation of glucose transport and insulin signaling by troglitazone or metformin in adipose tissue of type 2 diabetic subjects." *Diabetes* 51(1): 30-6.
126. Attia GR, Rainey WE, Carr BR 2001 Metformin directly inhibits androgen production in human thecal cells. *Fertil Steril* 76:517–524
127. Erickson GF, Magoffin DA, Cragun JR, Chang RJ 1990 The effects of insulin and insulin-like growth factors-I and -II on estradiol production by granulosa cells of polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 70:894–902
128. Leverve, X. M., B. Guigas, et al. (2003). "Mitochondrial metabolism and type-2 diabetes: a specific target of metformin." *Diabetes Metab* 29(4 Pt 2): 6S88-94.
129. Després JP. Potential contribution of metformin to the management of cardiovascular disease risk in patients with abdominal obesity, the metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Metab* 2003; 29 (4 Pt 2): 6S53-61.
130. Brame L, Verma S, Anderson T, Lteif A, Mather K. Insulin resistance as a therapeutic target for improved endothelial function: metformin. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 2004; 4 (1): 53-63.
131. Hattori Y, Suzuki k, Hattori S. Metformin inhibits cytokine-induced nuclear factor kappa B activation via AMP-activated protein kinase activation in vascular endothelial cells. *Hypertension* 2006;47:1183-1188
132. Metformin: Drug Information. UpToDate, Rose, BD(Ed), UpToDate, Wellesley, MA, 2004. Recuperado el 10 de enero de 2004.

133. Majithiya JB, Balaraman R Metformin reduces blood pressure and restores endothelial function in aorta of streptozotocin- induced diabetic rats. *Life Sci* 2006; 78:2615-2624
134. Vitale C., Mercurio G, Cornoldi A. Metformin improve endotelial function in patients with metabolic syndrome. *Journal of Internal Medicine* 2005;258:250-256
135. UKPDS 28: a randomizaed trial of efficacy of early addition of metformin in sulfonylurea-treated type 2 diabetes. UK Prospective Diabetes Study Group. *Diabetes Care* 1998;21:87-92
136. Giugliano D, Quatrato A, Consoli G, Mineri A, Ceriello A, De Rosa et al. Metformin foro bese, insulin-treated diabetic patients: improvement in glycemc control and reduction of metabolic risk factors. *J Clin Pharmacol* 1993;44:107-12
137. Munro JF, MacCuish AC, Marshall A, et al: Weight-reducing effect of biguanides in obese non-diabetic women. *BMJ* 2:13-15, 1969.
138. Alicia R Desilets, Sushmita Dhakal-Karki, and Kaelen C Dunican Role of Metformin for Weight Management in Patients Without Type 2 Diabetes *The Annals of Pharmacotherapy* n 2008 June, Volume 42
139. Jeppesed J, Fachini FS. Reaven GM: individuals with high total cholesterol/HDL cholesterol rator are insulin resistant. *J. Intern Med* 243:293-301
140. Wu MS, Jhonston P, Jeng CY. Effect of metformin on carbohydrate and lipoprotein metabolism in NIDDM patients. *Diabetes Care* 1990;13:1-8
141. De Fronzo RA. Goodman AM. Efficacy of metformin in patients with non insulin-dependent diabetes mellitus. The Multicenter Metformin Study Group. *N Engl J Med* 1995;333:541-549
142. Reaven GM, Johnston P, Hollenbeck CB. Combined metformin sulfoylurea treatment of patients with noninsulin dependent diabetes in fair to poor glycemia control. *J Endocrinol Metab* 1992;74:1020-1026
143. Peuler JD: Opposing adrenergic actions of intravenous metformin on arterial pressure in femalespontaneously hypertensive rats. *Cardiovascular Research* 43: 237-247; 1999

144. Landin K, Tengborn L, Smith U. Treating insulin resistance in hypertension with metformin reduces both blood pressure and metabolic risk factors. *J Intern Med.* 1991;229:181-7
145. Chan JC, Tomlinson B, Critchley JA, Cockram CS, Walden RJ: Metabolic and hemodynamic effects of metformin and glibenclamide in normotensive NIDDM patients. *Diabetes Care* 16:1035-1038, 1993.
146. Ouslimani N, Peynet J, Bonnefont-Rousselot D, Metformin decrease intracellular production of reactive oxygen species in aortic endothelial cells. *Metabolism* 2005; 54:829-834
147. Kieren J. Mather, Subodh Verma, and Todd J. Anderson Improved endothelial function with metformin in type 2 diabetes mellitus *J. Am. Coll. Cardiol.* 2001;37:1344-1350
148. De Jager J, Kooy A, Lehert P, Bets D, Wulffelé MG, Teerlink T, Scheffer PG, Schalkwijk CG, Donker AJ, Stehouwer CD: Effects of short-term treatment with metformin on markers of endothelial function and inflammatory activity in type 2 diabetes mellitus: a randomized, placebocontrolled trial. *J. Intern. Med.* 257:100-109, 2005.
149. Diamanti-Kandarakis E, Alexandraki K, Protogerou A, Piperi C, Papamichael C, Aessopos A, Lekakis J, Mavrikakis M: Metformin administration improves endothelial function in women with polycystic ovary syndrome. *Eur. J. Endocrinol.* 152:749-756, 2005.
150. De Aguiar LG, Bahia LR, Villela N, Laflor C, Sicuro F, Wiernsperger N, Bottino D, Bouskela E: Metformin improves endothelial vascular reactivity in first-degree relatives of type 2 diabetic patients with metabolic syndrome and normal glucose tolerance. *Diabetes Care* 29:1083-1089, 2006.
151. Natali A, Baldeweg S, Toschi E, Capaldo B, Barbaro D, Gastaldelli A, Yudkin JS, Ferrannini E: Vascular effects of improving metabolic control with metformin or rosiglitazone in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 27: 1349–1357, 2004.
152. Meaney Eduardo, Vela Agustin, Samaniego Virginia, Meaney Alejandra, cols Metformin, Arterial Function, intima-media thickness and nitrooxidation in metabolic syndrome: the mefisto study. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2008;35:895-903

153. Henández y cols. Guía de tratamiento farmacológico para el control de la hipertensión arterial 2009. Adendum a la NOM030 Rev. Mex Cardiol 2009;20(2):55-104
154. Lowry Oliver, Rosebrough Nira, Farr Lewis, Protein measurement with the folin phenol reagent, J Biol Chem 1951;193:265-75
155. Dalle-Done, Rossi Ranieri, Giustarini Daniela. Protein carbonyl groups as biomarker of oxidative stress. Clinical Chim 2003;329:23-38
156. Green LC, Wagner DA. Glogowski J, Skipper PL. Analysis of nitrate, nitrite and nitrate in biological fluids. Anal. Biochem 1982;126:131-138
157. Gerard- Monnier, Erdelmeier I, Regnard K, Moze-Henry N, Yadan JC. Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals: analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. Chem Res Toxicol 1998;11:1176-1183
158. Jaffrey, S.R., Erdjument-Bromage, H., Ferris, C.D. Protein S-nitrosylation: A physiological signal for neuronal nitric oxide. Nat. Cell Biol. 2001; 3(2):46-49
159. Goligorsky S. Michael. Endothelial cell dysfunction: can't live with it, how to live without it Am J Physiol Renal Physiol 2005;288:871-880
160. Dmitri Kirpichnikov, MD; Samy I. McFarlane and James R. Sowers. Metformin: an update. Ann Intern Med 2002;137:25-33
161. Ratner R, Goldberg R, Haffner, Marcovina S, Orchard T. Impact of intensive lifestyle and metformin therapy on cardiovascular disease risk factors in the Diabetes Prevention Program. Diabetes Care 2005;28(4):888-894
162. Fanhanel G. Et al.: Metformin's effects on glucose and lipid metabolism in patients with secondary failure to sulfonylureas. Diabetes Care 1996, (11): 1185–1189.
163. WuzMS, Johnston P, Sheu WHH et al: Effect of metformin on carbohydrate and lipoprotein metabolism in NIDDM patients. Diabetes Care 1990; 13:1-8.
164. Coll B, van Wijk JP, Parra S, Castro Cabezas M, Hoepelman IM, Alonso-Villaverde C, de Koning EJ, Camps J, Ferre N, Rabelink TJ, Tous M, Joven J. Effects of rosiglitazone and metformin on postprandial paraoxonase-1 and monocyte chemoattractant protein-1 in human immunodeficiency virus-infected patients with lipodystrophy. Eur J Pharmacol. 2006 Aug 21;544(1-3):104-110. Epub 2006 Jun 16.

165. Skrha Jan, Prazny Martin, Zima Tomas. Oxidative stress and endothelium influenced by metformin in type 2 diabetes mellitus. *Eur J Clin Pharmacol* 2007, 63;1107-1114
166. Ouslimali Mahrou, Djelidi Peynet, Therond P. Metformin reduces angiotensin-mediated intracellular production of reactive oxygen species in endothelial cells through the inhibition of protein kinase C. *Biochemical Pharmacology* 2006,72; 176-183
167. Tessier D, Maheux P, Khalil A, Fülöp T. Effect of glicazide versus metformin on the clinical profile and lipid peroxidation markers in type 2 diabetes. *Metabolism*.1999;48:897-903
168. Kiho T, Kato M, Usui S, Hirano K. Effect of buformin and metformin on formation of advanced glycation end products by methylglyoxal. *Clin Chim Acta*. 2005 Aug; 358(1-2):139-45.
169. Formoso G, De Filippis EA, Michetti N, Di Fulvio P, Pandolfi A, Bucciarelli T, Ciabattoni G, Nicolucci A, Davì G, Consoli A. Decreased in vivo oxidative stress and decreased platelet activation following metformin treatment in newly diagnosed type 2 diabetic subjects. *Diabetes Metab Res Rev*. 2008 Mar-Apr;24(3):231-7.
170. Gómez-García A, Martínez Torres G, Ortega-Pierres LE, Rodríguez-Ayala E, Alvarez-Aguilar C. Rosuvastatin and metformin decrease inflammation and oxidative stress in patients with hypertension and dyslipidemia. *Rev Esp Cardiol*. 2007 Dec;60(12):1242-9.
171. Céspedes, Ela; Ponte González, Giovanni; Riverón Forment, Gretel; Castillo Herrera, José A. Marcadores de estrés oxidativo en pacientes hipertensos de una población rural en provincia Habana / Oxidative stress markers in hypertensive patients from a rural population in Habana . *Rev. cuba. invest. bioméd*;27(1), ene.-mar. 2008.
172. Livan Delgado Roche^{1*}, Gregorio Martínez Sánchez^{2*}, Arquímedes Díaz Batista^{3**} Determinación de marcadores de estrés oxidativo en pacientes con enfermedades cardiovasculares. *Acta bioquím. clín. latinoam*. v.43 n.3 La Plata jul./sep. 2009
173. Yessica Dorin Torres–Ramos* Martha Patricia Sierra–Vargas* Ivonne María Olivares–Corichi‡ Juan José Hicks Gómez* Marcadores plasmáticos de estrés oxidante en población mexicana sana de 31 a 60 años de edad. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Mex*. v.19 n.3 México jul/sep. 2006
174. Isabella Dalle-Donnea,^{*} Ranieri Rossib, Daniela Giustarinib, Aldo Milzania, Roberto Colomba. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta* 329 (2003) 23–38

175. Skalicky et al. Oxidative stress and inflammation in metabolic syndrome. Clin Chem Lab Med 2008;46(4)499-505
176. My. Odalys González Sotolongol; My. Ángel Arpa GámezII; Dr. Mario González MenocallIII; Tte. Cor. José Luis Pérez AlejoIV. Valoración del estrés oxidativo en pacientes con síndrome metabólico. Rev Cub Med Mil v.38 n.3-4 Ciudad de la Habana jul.-dic. 2009
177. CESPEDES, Ela; PONTE GONZALEZ, Giovanni; RIVERON FORMENT, Gretel y CASTILLO HERRERA, José A.. Marcadores de estres oxidativo en pacientes hipertensos de una población rural en provincia Habana. Rev Cubana Invest Bioméd 2008, vol.27, n.1.
178. Armanie Cabral, Emma A.; Sosa-Canache, Beatriz A.; Duin Balza, Amanda C.; Pacheco, Beatriz; Hernández-Hernández, Rafael; Virgilio, Nicola Efecto de la metformina sobre la función endotelial en pacientes con síndrome metabólico y pre-hipertensión. Revista Latinoamericana de Hipertensión, vol. 5, núm. 3, julio-septiembre, 2010, pp. 58-62

14. ANEXOS

14.1 Reactivos utilizados

- 12,4 dinitrofenilhidrazina (DNPH) 10mM en HCl 2.5 M
- HCl 2.5 M
- Guanidina hidrociorada 6M en fosfato de potasio (KH₂PO₄) 20 mM
- Ácido tricloroacético (TCA) al 10% y al 5%
- Acetato de etilo-etanol en proporción 1:1
- Bicarbonato de sodio al 2%
- Solución de Na₂CO₃ al 2% y tartato de sodio al 0.02% en (NaOH) 0.1N (sol. A)
- Solución CuSO₄ al 0.5% en agua bidestilada
- Solución cupro-alcalina
- Reactivo Follin-Ciocalteu diluido en agua proporción 1:1
- Albúmina de suero bovino
- E. coli 17775
- Sulfanilamida
- N-naftil etilendiamida
- 1,1,3,3- tetrametoxipropano (malondialdehido bis:dimetilacetal) 10mM en ácido sulfúrico (H₂SO₄) al 1%
- 1-metil-2-fenilindol (MPI) 10mM en acetonitrilo/metanol en una proporción 3:1
- HCl al 37%
- Solución buffer de fostatos 0.1M ph 7.4

14.2 Técnica para la determinación de carbonilos

La oxidación de proteínas puede determinarse por el contenido de carbonilos que se producen en dicha reacción.

El procedimiento utilizado fue el de la reacción entre 2,4- dinitrofenilhidrazina y carbonilos proteicos. La DNPH reacciona con estos carbonilos y forma una base de Schiff para producir la hidrazona correspondiente, la cual puede ser analizada espectrofotométricamente.

1) Agregar:

TUBO	PLASMA (μL)	DNPH 10Mm (μL)	HCl 2.5M (μL)
BLANCO	50		500
PROBLEMA	50	500	

2) Incubar 1 hora a oscuras cada 15 minutos

3) Agregar 1ml de TCA al 10% y centrifugar 10 minutos a 3000 rpm, tirar el sobrenadante.

4) Agregar 1 ml de TCA al 5% y centrifugar 10 minutos a 3000 rpm, tirar el sobrenadante.

5) Agregar 2ml de la solución etanol – acetato de etilo y centrifugar 10 minutos a 3000 rpm, tirar el sobrenadante

6) Disolver la pastilla en 1 ml de guanidina e incubar 10 minutos a 37°C

7) Leer a 375 nm, utilizando guanidina para calibrar

8) Realizar el cálculo tomando como referencia el CA: 22,000 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

14.3 Técnica para la determinación de nitritos

La concentración de ambos metabolitos del óxido nítrico se determina mediante un procedimiento de dos pasos:

- 1- Nitrato es convertido a nitrito por medio de una conversión enzimática,
- 2- Una disociación estequiométrica que da como resultado un producto azoado de color púrpura (reacción de Griess).

Para llevar a cabo esta reacción:

Agregar 250 μ l de la muestra plasmática

Agregar 30 μ l de la cepa E.coli 17775

Incubar 1 hora a 37°C durante 5 minutos en agitación constante

Centrifugar a 3000 rpm durante 5 minutos

Tomar 250 μ L del sobrenadante y agregar 50 μ l de sulfanilamida e inmediatamente después agregar 50 μ l de N-naftil etilendiamida

Agitar durante un minuto, posteriormente leer a 554 nm

14.4 Técnica para la determinación de proteínas

Se utilizó la técnica de lowry y cols. La cual determina pequeñas cantidades de proteínas del orden de 30 a 100 μ g

- 1) El plasma debe diluirse 1:100 previo a su análisis en una solución de NaCl 0.15M.
- 2) Para la determinación se toma 50 μ l de la dilución realizada, se agrega 200 μ l de agua bidestilada.
- 3) Agregar 1 ml de solución cupro-alcalina (realizada en el momento), mezclar e incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
- 4) Agregar 100 μ l de reactivo Follin-Ciocalteu diluido 1:1 en agua bidestilada, mezclar e incubar 45 minutos a temperatura ambiente.
- 5) Leer a 550 nm en espectrofotometro.

14.5 Determinación de mda con metil-fenil-indol

- 1) Se realiza un blanco con: 200 μ l de agua bidestilada, 650 μ l de MPI y se incuba por 40 minutos a temperatura 45°C.
- 2) En un tubo de ensaye de cristal, se agrega 100 μ l plasma, 100 μ l agua bidestilada y 650 μ l de MPI se incuba por 40 minutos a temperatura 45°C.
- 3) Se agrega 150 μ l a ambos tubos: blanco y problema, se incuba durante 20 minutos a temperatura ambiente.
- 4) Se centrifuga a 3500 r.p.m. durante 10 minutos.
- 5) Leer el sobrenadante a 586 nm en espectofotometro, en una celda de cuarzo.

Nota: no se deben realizar más de 8 muestras por que la reacción sigue y por lo tanto aumenta la absorbancia.