

UNIVERSIDAD DE SONORA

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA SALUD**

Comparación de la Capacidad Antioxidante Total del Suero y Plasma en Personas Aparentemente Sanas



TESIS PROFESIONAL PRÁCTICA

Que para obtener el título de:

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

Presenta:

Paulina Estrada Cárdenas

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

APROBACIÓN

Los miembros del jurado designado para revisar la Tesis Profesional de **Paulina Estrada Cárdenas** la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el Título de Químico Biólogo Clínico.

Dr. Marco Antonio López Mata
Presidente

M.C Waldo Rodrigo Ramírez Astudillo
Secretario

Dr. Saúl Ruíz Cruz
Vocal

Dr. Juan Carlos Gálvez Ruíz
Suplente

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Marco Antonio López Mata, por su apoyo y enseñanzas como maestro, así como por su siempre simpático y agradable trato. También quiero agradecer su paciencia, orientación y motivación a lo largo de este proyecto lo cual impulsó a mi formación como profesionista.

Al Instituto Tecnológico de Sonora y al Dr. Saúl Ruiz por su apoyo y su atenta disponibilidad, contribuyendo así al desarrollo de este proyecto.

A los integrantes del sínodo, Dr. Marco Antonio López Mata, Dr. Juan Carlos Gálvez Ruíz, Dr. Saúl Ruíz Cruz y M.C Waldo Rodrigo Ramírez Astudillo, por proporcionarme su tiempo y observaciones, que permitieron el enriquecimiento de mi trabajo.

También quiero agradecer a mis compañeros Marisol Gastelum Cabrera y Gabriel H. Gómez Rodríguez por su apoyo y simpatía, siempre dispuestos a ofrecerme su ayuda y compañía, pero más que nada su amistad.

A la Dra. Pilar Álvarez Ruíz y a Edna L Cárdenas, por todo su cariño, consejos y apoyo incondicional, lo cual me formó como persona y me permitieron llegar hasta aquí.

A todos aquellos amigos y compañeros que contribuyeron al desarrollo de este proyecto mediante su cooperación, agradezco en particular la solidaridad, empatía y amabilidad con la que lo hicieron.

Quiero agradecer a mis amigos, los cuales me brindaron gratos momentos de convivencia y aprendizaje, de ellos siempre obtuve buenos consejos, apoyo y motivación. Todo esto hizo de mi estancia en la universidad una experiencia que sin duda nunca olvidare, por lo cual estoy muy agradecida de habérmelos topado en el camino.

A mis maestros, sin los cuales, no me encontraría aquí, ya que todos y cada uno de ellos, llegaron a contribuir en mi formación como profesionista, mediante su ejemplo, sus enseñanzas y consejos.

Finalmente quiero agradecer a la Universidad de Sonora, una institución que me abrió sus puertas, en la cual estoy orgullosa de haberme formado, y en cuyas aulas y pasillos conocí a valiosas personas a lo largo de estos casi cinco años.

DEDICATORIAS

A mis padres, dos grandes personas a quienes debo quien soy, ya que, sin sus enseñanzas, orientación y apoyo, nada de esto sería posible.

A mis hermanos, dos grandes compañeros y amigos.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	10
INTRODUCCIÓN	11
OBJETIVOS	13
Generales.....	13
Específicos.....	13
ANTECEDENTES	14
Estrés Oxidativo.....	14
Daño Oxidativo y su Efecto en la Salud.....	14
Alteraciones al ADN.....	15
Alteraciones de Proteínas.....	15
Alteración de Lípidos.....	15
Antioxidantes en el Organismo Humano.....	16
Componentes Antioxidantes de la Sangre.....	17
Antioxidantes Celulares.....	18
Antioxidantes Plasmáticos.....	19
Métodos y Muestras Biológicas Utilizadas en la Medición de la CAT.....	19
METODOLOGÍA	23
Pacientes y Muestras.....	23
Determinación de Proteínas Totales Albúmina, Bilirrubina y Ácido Úrico.....	23
Medición de la Capacidad Antioxidante Total del Suero y Plasma.....	24
Ensayo de Reducción del DPPH.....	24
Capacidad de Reducción Férrica del Plasma (FRAP).....	25
Preparación de Pool de Suero y Plasma.....	26
Análisis Estadístico.....	27
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
Medición de la CAT (FRAP y DPPH) en Pool.....	28
Correlación Entre Métodos de Medición de la CAT.....	29
Relación del DPPH por Tipo de Muestra Biológica.....	30
Relación del FRAP por Tipo de Muestra Biológica.....	34

Contribución de los Principales Antioxidantes no Enzimáticos en la Estimación de la CAT.....	36
Concordancia Entre DPPH y FRAP.....	38
Comparación de la CAT en Sujetos Aparentemente Sanos (DPPH).....	40
Comparación de la CAT en Sujetos Aparentemente Sanos (FRAP).....	41
Comparación por Sexo y Tipo de Muestra de la CAT (DPPH).....	42
Comparación por Sexo y Tipo de Muestra de la CAT (FRAP).....	43
CONCLUSIONES	44
RECOMENDACIONES	45
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
ANEXOS	50
Anexo 1. Abreviaturas y Siglas.....	50

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Diversidad en la utilización de muestras biológicas (suero y plasma) en la medición de la CAT.....	21
2	Estimación de la CAT (FRAP) en pool de muestras (n=30).....	28
3	Estimación de la CAT (DPPH) en pool de muestras (n=30).....	28
4	Correlación de la CAT en muestras con distintos aditivos (n=30) por medio de DPPH y FRAP.....	30
5	Contribución de los principales antioxidantes no enzimáticos (método de DPPH).....	36
6	Contribución de los principales antioxidantes no enzimáticos al método de FRAP.....	37
7	Comparación de la capacidad antioxidante (DPPH) por tipo de muestra de sujetos aparentemente sanos (n=30).....	40
8	Comparación de la capacidad antioxidante (FRAP) por tipo de muestra de sujetos aparentemente sanos (n=30).....	41
9	Comparación de la CAT (DPPH) en hombres (n=15) y mujeres (n=15).....	42
10	Comparación en medición de la CAT (FRAP) en hombres (n=15) y mujeres (n=15).....	43

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Determinación de la CAT por método de DPPH.....	24
2	Curva de calibración para el método de DPPH.....	25
3	Determinación de la CAT por método de FRAP.....	26
4	Curva de calibración para el método de FRAP.....	26
5	Regresiones lineales del método de DPPH para suero vs EDTA (A), suero vs citrato (B), suero vs heparina (C), EDTA vs citrato (D), EDTA vs heparina (E) y citrato vs heparina (F).....	33
6	Regresiones lineales del método de FRAP para suero vs EDTA (A), suero vs citrato (B), suero vs heparina (C), EDTA vs citrato (D), EDTA vs heparina (E) y citrato vs heparina (F).....	35
7	Gráficas de Bland-Altman, comparativas para el método de DPPH y FRAP, en el uso de diferentes aditivos.....	39

RESUMEN

Actualmente diversas patologías han sido asociadas al estrés oxidativo, es por esto que la determinación de la capacidad antioxidante total (CAT), al ser un método capaz de medir el estatus del sistema antioxidante, puede contribuir al monitoreo clínico de padecimientos relacionados al estrés oxidativo. En el presente trabajo, se comparó la CAT del suero y plasma de personas aparentemente sanas. El estudio se realizó, con la participación de 30 sujetos aparentemente sanos, a los cuales se les recolectó muestra de sangre venosa en cuatro tubos vacutainer®, un tubo sin aditivo para la obtención de suero y para la obtención de plasma en tubos con EDTA, citrato de sodio y heparina de sodio. La CAT fue estimada por los métodos de 2,2 difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) y capacidad de reducción férrica del plasma (FRAP), y los resultados fueron expresados en equivalentes trolox/mL. En el presente estudio, también fueron medidos algunos de los principales componentes antioxidantes no enzimáticos, de origen endógeno, como las proteínas totales, albúmina y ácido úrico. Los resultados mostraron, que en general, los coeficientes de variación obtenidos en la medición del pool de suero y con cada una de los aditivos fueron más bajos para el método de DPPH que para el de FRAP. En las correlaciones intramétodo fue observado que en el DPPH, presentó una fuerte correlación analítica con las muestras de EDTA y citrato; moderada para las muestras de suero vs EDTA y suero vs citrato y baja con la heparina vs todos los tipos de muestras. A diferencia de lo anterior, el FRAP presentó una fuerte correlación en todos los casos. En el análisis de los tipos de muestra con respecto a los principales componentes antioxidantes no enzimáticos, se encontró que el ácido úrico se relaciona fuertemente con la CAT medida por ambos métodos, pero baja correlación para proteínas totales y la albúmina. Al comparar las medias obtenidas para la CAT medida en suero y con cada uno de los aditivos, se observó que por el método de DPPH existe una sobreestimación de la CAT al utilizar muestras de heparina, con respecto a los demás tipos de muestra. Mientras que el FRAP no mostró diferencias significativas ($p > 0.05$) con el uso de muestras de heparina y de suero. Así mismo, fue observado que la medición de la CAT por DPPH a diferencia del FRAP, no se ve influido por el sexo del individuo.

INTRODUCCIÓN

En los sistemas biológicos, la generación de radicales libres es un proceso constante, el cual se mantiene en balance con los diversos mecanismos antioxidantes para evitar el estrés oxidativo. Este estrés puede tener la capacidad de causar daño en tejidos y moléculas del cuerpo como los lípidos, carbohidratos, ADN y proteínas. Actualmente, diversas patologías se han asociado con el estrés oxidativo, el cual no solo contribuye al daño orgánico, sino que también promueve la fase crónica del padecimiento. Entre las patologías que han sido asociadas al estrés oxidativo se encuentran el Alzheimer, artritis reumatoide, aterosclerosis, diabetes, cáncer, fibrosis quística, solo por mencionar algunas.

El conjunto de mecanismos biológicos de defensa ante la presencia de radicales en el organismo es conocido como “sistema antioxidante”, este se encarga de mantener un balance de oxidación y reducción de compuestos en el cuerpo humano. Dicho sistema de defensa es complejo y engloba numerosos componentes, los cuales son capaces de funcionar de manera coordinada para promover la reducción del estrés oxidativo. Dada la implicación del estrés oxidativo en diversas patologías, se ha identificado que el balance en los sistemas antioxidantes juega de igual manera un papel importante en el desarrollo de estas, ya que, en un descenso de la actividad antioxidante, se verá promovida la generación de radicales y por lo tanto la del estrés oxidativo.

La capacidad antioxidante total (CAT), actualmente puede ser determinada por diversos métodos espectrofotométricos como el de 2,2 difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), capacidad antioxidante de equivalentes trolox (TEAC), capacidad de reducción férrica del plasma (FRAP), entre otros, que también son capaces de indicar la capacidad de reducción de compuestos radicales. Dada la estrecha relación que existe entre el estado oxidativo y la capacidad antioxidante en diversas patologías, la estimación de la capacidad antioxidante total podría ser utilizada como un indicador del estado patológico. Sin embargo, actualmente los métodos existentes, presentan diversos inconvenientes que evitan que la interpretación de sus resultados sea sencilla, haciendo necesario la comparación entre distintos métodos para poder llegar a una conclusión. Debido a que la gran mayoría de los métodos, difieren en el uso de los radicales iniciadores, así como en el tiempo de reacción, pH, entre otros factores que influyen en el estudio.

Un aspecto que pudiese tomarse en cuenta también es el tipo de muestra utilizada, ya que la capacidad antioxidante puede ser medida a partir de cualquier fluido biológico. Sin embargo, los componentes sanguíneos son los más utilizados, aun así, es de considerar que no está establecido si la muestra utilizada en el análisis de la CAT debe de ser recolectada en tubos

con anticoagulante (plasma) o en tubos sin aditivo (suero). Es conocido que los componentes presentes en plasma y suero son diferentes, por lo tanto, es importante comparar la CAT en suero y plasma de personas aparentemente sanas por dos métodos comúnmente utilizados (DPPH y FRAP).

OBJETIVOS

Generales

Comparar la capacidad antioxidante total en suero y plasma de sujetos aparentemente sanos por dos métodos comúnmente utilizados (DPPH y FRAP).

Específicos

- Comparar la precisión del DPPH y FRAP utilizando un pool sin aditivo y con cada uno de los aditivos (EDTA, citrato y heparina).
- Determinar la concentración de los principales antioxidantes no enzimáticos del plasma y suero (proteínas totales, albúmina y ácido úrico).
- Determinar la capacidad antioxidante total de muestras de suero y plasma por el método DPPH y FRAP de sujetos aparentemente sanos.

ANTECEDENTES

Estrés Oxidativo

Los radicales libres son especies moleculares altamente reactivas, que poseen un electrón desapareado en uno de sus orbitales. Estos tienen una vida media corta dado que reaccionan rápidamente con moléculas próximas, extrayendo un electrón de estas, para así completar su propio orbital. Este proceso de extracción de electrones genera una cadena de nuevos radicales. En sistemas biológicos humanos, los principales radicales libres que se generan son las especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS), siendo el superóxido, hidroxilo y perhidroxilo, especies reactivas que pueden ser capaces de generar estrés oxidativo, cuando la producción de radicales libres supera a la capacidad de eliminación. Dicho estrés puede ser capaz de modificar la respuesta celular frente a estímulos intracelulares y extracelulares, conduciendo a lesiones orgánicas de diversas índoles (Harper, 2012; González-Hernández, 2010).

Daño Oxidativo y su Efecto en la Salud

El ser humano está expuesto de manera continua a agentes externos que dan origen a radicales libres en el organismo, como la exposición a radiaciones ionizantes; rayos X y ultravioleta. Independientemente de los factores externos que inducen a la formación de radicales, ROS y RNS, son producidos de manera continua en el organismo, la mayoría como resultado de la respiración mitocondrial, seguido de la explosión respiratoria de macrófagos activados e interacciones con iones metálicos como el cobre, hierro, níquel y cobalto, que reaccionan de manera no enzimática con el oxígeno (González-Hernández, 2010; Harper, 2012).

Agentes pro-oxidantes como ROS y RNS, promueven la formación de lesiones oxidativas en el organismo humano y estas pueden ser directas y específicas contra diferentes componentes celulares. Casi todas las moléculas en el organismo son susceptibles al ataque de radicales libres, sin embargo, las estructuras más afectadas son los lípidos poliinsaturados, proteínas, ADN y carbohidratos (Sánchez-González, 2014; Mckee, 2003.). Se ha observado que, en personas con enfermedades cardiovasculares como el cáncer, artritis reumatoide, isquemias, entre otras, existe un descenso de las actividades antioxidantes y un incremento en la producción de ROS (Garca y col., 2013).

Alteraciones al ADN

Se ha observado que los daños al ADN inducidos por ROS y RNS pueden generar ruptura de la doble hélice, formación de aductos ADN-proteína y modificaciones del material genético. Pudiendo lo anterior, derivar en mutaciones y por lo tanto, en una disfunción celular. Por otro lado, también puede ocasionar la inhibición de la síntesis de enzimas antioxidantes y consecuentemente generar una elevación en la producción de un mayor número de especies reactivas, que conlleven a una fase crónica de la enfermedad. En específico en la otitis media crónica, se ha identificado que un aumento en el estrés oxidativo puede generar daño en las estructuras ciliadas del oído medio. Este se ha asociado con lesiones oxidativas en el ADN y proteínas celulares. Así mismo, fue encontrada una concentración alta de malondialdehído, que es un producto de la peroxidación lipídica. Dicho compuesto tiene la capacidad de reaccionar con bases nitrogenadas del ADN, produciendo efectos mutagénicos, genotóxicos y carcinogénicos (González-Hernández, 2010; Garca y col., 2013).

Alteraciones de Proteínas

Las proteínas son dianas importantes de los radicales libres y se ha observado que estos pueden inducir fácilmente cambios estructurales de las proteínas. Estos cambios pueden afectar a las propiedades y funciones proteicas normales, promoviendo la formación de agregados dentro y fuera de la célula. La oxidación de varios aminoácidos en la albúmina, principal proteína sérica responsable de la actividad atrapante de radicales (70%), puede ocasionar una modificación estructural que afecte a su tiempo de vida media, así como a su capacidad redox. Por otro lado, modificaciones en los aminoácidos por acción directa o indirecta de ROS y RNS, pueden conducir a la formación de componentes inmunogénicos que los reconocen como extraños y reaccionan ante ellas, produciendo autoanticuerpos (Hernández, 2010; Harper, 2012; González-Taverna y col., 2013).

Alteración de Lípidos

La peroxidación de lípidos es una reacción en la cual componentes celulares como proteínas de membrana, receptores celulares, así como enzimas unidas a estos, son inactivados por medio de la desintegración de la membrana celular. Esto sucede debido a que los ácidos grasos

polinsaturados de las membranas celulares son altamente susceptibles al ataque de ROS y RNS. Los cuales generan un reordenamiento en los dobles enlaces, alterando así la naturaleza de la membrana lipídica celular, resultando en un descenso de la fluidez y permeabilidad que esta mantiene. Los principales metabolitos resultantes de la peroxidación lipídica son el malondialdehído y el 4-hidroxinonenal, estos compuestos son biológicamente activos ya que reaccionan con nucleósidos, lípidos y proteínas, alterando las propiedades y funciones de estas moléculas al formar uniones cruzadas. En varias patologías como la diabetes mellitus, Alzheimer, asma, preclamsia, entre otras; se han encontrado niveles plasmáticos altos de malondialdehído. Esto ha sido atribuido directamente al aumento en el estrés oxidativo, en diversos procesos patológicos y por lo tanto en la peroxidación de lípidos (Garca y col., 2013; Mckee T,2003.).

Antioxidantes en el Organismo Humano

Dado que la producción de ROS y RNS en el organismo humano es un proceso dinámico, promovido por diversos factores endógenos y exógenos, hay una constante exposición a lesiones en moléculas constituyentes del organismo. Sin embargo, en individuos saludables la producción de ROS y RNS se encuentra en balance con los mecanismos de defensa, que pretenden limitar a la producción de estrés oxidativo. Mencionado sistema de defensa, conocido como sistema antioxidante, buscan mantener la homeostasis de la oxidación y reducción de compuestos en el organismo, por medio de la acción de diversas moléculas neutralizantes de radicales libres. Por lo tanto, la capacidad antioxidante ha sido definida como la habilidad que posee un compuesto de reducir la capacidad pro-oxidante de otro (Henry, 2005.; Sofic y col., 2002).

La defensa antioxidante del organismo humano es compleja y comprende una gran variedad de componentes que actúan a diferentes niveles de oxidación, ya sea previniendo la formación de radicales libres, inactivándolos o terminando las reacciones iniciadas por estos. Los mecanismos homeostáticos de la oxidación son desarrollados a partir de enzimas y otros componentes no enzimáticos, que eliminan ROS y RNS, mediante la formación de radicales relativamente estables, que persisten lo suficiente como para pasar por una reacción hacia productos no radicales. Por otro lado, la CAT puede estar influenciada por dos componentes, el endógeno y el exógeno (Harper, 2012; Sánchez-González., 2014). El primero está compuesto principalmente por enzimas producidas por las células del cuerpo, como la catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa, en tanto que los principales componentes no enzimáticos endógenos son moléculas como la bilirrubina, ácido úrico, ferritina, transferrina, ceruloplasmina y albúmina. El mecanismo de defensa endógeno se ha catalogado como primario, debido a que

posee la mayor capacidad para la eliminación directa de ROS. Mientras que los antioxidantes exógenos son constituidos por componentes de la dieta que incrementan la capacidad antioxidante; flavonoides y las vitaminas, principalmente la A, C y E, presentes en frutas y verduras (Sánchez-González, 2014).

Componentes Antioxidantes en Sangre

A quedado bien establecido que las ROS se producen de manera constante como producto del metabolismo aerobio. El sistema antioxidante se encuentra como un mecanismo de acción constante en el cuerpo, que usualmente remueve o inactiva a los radicales libres, evitando la generación de más ROS. Por lo tanto, el estrés oxidativo es minimizado, así como el daño tisular que este genera. La sangre se encuentra compuesta de elementos líquidos del plasma y elementos sólidos, los cuales corresponden a células como leucocitos, plaquetas y eritrocitos. El plasma está compuesto principalmente por agua, la cual contiene iones disueltos, proteínas, carbohidratos, grasas, hormonas, vitaminas y enzimas. Que en conjunto conforman el 55 % del volumen total del fluido sanguíneo en el organismo. Por lo general, cambios en diferentes tejidos del cuerpo, logran detectarse por medio del análisis de los componentes sanguíneos, que suelen reflejar el estado fisiológico de todo el cuerpo. Es por esto, que la determinación de la capacidad antioxidante total en compuestos biológicos podría contribuir de manera activa al monitoreo clínico de pacientes con padecimientos relacionados al estrés oxidativo (Benzie y Strain,1996; McKenzie,2000; Janaszewska y Bartosz, 2002).

En el plasma humano, así como en otros fluidos se pueden encontrar diversos antioxidantes preventivos y reparadores como la vitamina C, vitamina E, ubiquinol, bilirrubina, ácido úrico, flavonoides y carotenoides. Así como también a las proteínas transportadoras de hierro, las cuales también son consideradas antioxidantes (Sánchez-González, 2014).

La capacidad antioxidante en plasma se encuentra estrechamente regulada por los diferentes mecanismos que interaccionan para reducir el estrés oxidativo en el cuerpo. Mencionado estado de biodinamia se puede ver reflejado en el incremento de la capacidad antioxidante plasmática, después del consumo de alimentos como vegetales, frutas, jugos y otros productos. Un incremento de la capacidad antioxidante en plasma tras el consumo de alimentos pudiera ser una adaptación del organismo al estrés oxidativo. Los componentes antioxidantes se distribuyen por todo el cuerpo en diversos compuestos, que se encuentran en diferentes proporciones según su ubicación, tal es el caso del ascorbato, ácido úrico y algunos polifenoles que actúan como antioxidantes hidrosolubles, mientras que la ubiquinona y carotenos actúan

como antioxidantes liposolubles que atrapan a radicales en membranas y lipoproteínas plasmáticas (Sofic y col., 2002; Harper, 2012).

Antioxidantes Celulares

El eritrocito es el principal componente celular de la sangre, este aporta el 45% de la composición sanguínea total. Posee la característica de ser un corpúsculo flexible de deformabilidad alta, esto debido a las características de su membrana compleja, compuesta por fosfolípidos, proteínas, lípidos y carbohidratos. Defectos y daños en la estructura o función de los componentes de la membrana eritrocitaria, hacen propensa a la célula a una destrucción prematura. El principal mecanismo antioxidante que posee se da por medio de la vía metabólica de las hexosas monofosfato, la cual es esencial para mantener concentraciones adecuadas en la célula de glutatión reducido, el principal antioxidante eritrocitario, que mantiene a la hemoglobina en un estado reducido y preserva a las enzimas antioxidantes. Cuando la célula es expuesta a agentes oxidantes, la producción de NADPH es aumentada y consecuentemente la de glutatión reducido, en escases de esta enzima o de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, la fuerza reductora de la célula se ve disminuida y la membrana celular es propensa a sufrir lesiones oxidativas que pueden conducir a la hemólisis temprana del eritrocito (McKenzei, 2000; Ruiz-Arguelles, 2009).

Antioxidantes liposolubles juegan un papel importante en la prevención de la lipoperoxidación de membranas, principalmente vitaminas como el α -tocoferol, γ -tocoferol y el β -caroteno. Estos mismos son capaces de formar interacciones con los componentes antioxidantes de la fase acuosa, estableciendo reacciones de regeneración de compuestos antioxidantes. Estas interacciones, no solo son importantes para la integridad de las células, sino también de algunas otras moléculas, tal es el caso de la LDL, cuya principal línea de defensa está conformada por la vitamina E que se encuentra en la superficie de la molécula, con su anillo de cromanol de cara a la fase acuosa, permitiendo así que esta continúe interaccionando con otros antioxidantes acuosos como el ácido ascórbico y la bilirrubina, que permiten la regeneración del radical tocoferilo (Valkonen y Kuusi, 1997).

Antioxidantes Plasmáticos

En este apartado se menciona el término plasmático como un componente de la sangre en la cual están suspendidos los componentes celulares. En el plasma humano, así como en otros fluidos corporales se pueden encontrar diversos antioxidantes circulantes, que pueden derivar tanto de la fuente endógena como de la exógena. Los principales antioxidantes plasmáticos son la albúmina y el ácido úrico, ya que estos conforman el 50% de la actividad antioxidante total. La albúmina circulante, constituye al 80% de los tioles reactivos disponibles en plasma, lo que hace que esta sea la principal captadora de ROS y RNS plasmático. Las funciones antioxidantes de esta proteína se encuentran estrechamente relacionadas con la estructura que posee y su estado redox. Por su parte, el ácido úrico se encuentra presente en concentraciones cercanas al máximo de solubilidad, a este le han atribuido cualidades antioxidantes valiosas, las cuales han sido asociadas a una prevalencia baja de riesgo cardiovascular. En personas con aterosclerosis suelen encontrarse concentraciones de ácido úrico altas, que podrían estar funcionando como un mecanismo de protección ante la peroxidación. Inclusive se ha mencionado que la elevación de la concentración del ácido úrico pudiera funcionar como un posible marcador de aterosclerosis (Nieto y col., 1999; Quintanar-Escorza y Calderón-Salinas, 2009; Taverna y col., 2013). A pesar de que la albúmina y el ácido úrico conforman a la mayoría de la capacidad antioxidante plasmática, es importante también considerar la presencia de otros compuestos como la bilirrubina, enzimas como el glutatión y el NADPH, así como otros compuestos endógenos y exógenos (Quintanar-Escorza y Calderón-Salinas, 2009).

Métodos y Muestras Biológicas Utilizadas en la Medición de la CAT

Es importante primero aclarar que en este trabajo utilizaremos el término de muestras biológicas para referirnos al suero y plasma. Teniendo como partida las diferencias entre uno y otro. En el caso del plasma este es considerado como la muestra analítica que contiene fibrinógeno, dado que es recolectada en tubos con anticoagulantes ya sea EDTA, heparina o citrato. A su vez es importante considerar que el anticoagulante en el plasma puede causar una dilución variable debido al transporte de agua o por cambios en la presión osmótica de las células de la sangre al plasma, así como la inhibición de algunas enzimas en el caso de los anticoagulantes quelantes como el EDTA. Por otro lado, el suero es considerado como la muestra obtenida a partir de la sangre, recolectada en tubos sin aditivos, en los cuales se da la coagulación, razón por la cual la

muestra carecerá de fibrinógeno y de otros componentes involucrados en la formación del coágulo (Henry, 2005).

Es importante mencionar que los métodos para la determinación de la CAT se basan en comprobar como un agente oxidante, induce cambio oxidativo a un sustrato oxidable, el cual es capaz de inhibir o reducir el cambio en presencia de un antioxidante. Esta inhibición generalmente es proporcional a la actividad del mismo compuesto en la muestra. Distintos métodos utilizados para medir la CAT pueden diferir en el agente oxidante, el sustrato empleado, tiempo de evaluación, así como el tipo de interacciones que desarrolla la muestra con el medio de reacción. La mayoría de los métodos actuales utilizados para la medición de la actividad antioxidante, no emplean especies radicales de significado biológico, si no radicales que son oxidantes iniciadores ajenos al organismo humano (Quintanar-Escorza y Calderón-Salinas, 2009).

Se ha observado que la CAT medida en muestras biológicas es influenciada por dos grupos de compuestos antioxidantes, los componentes endógenos y exógenos del sistema antioxidante. Estimaciones de la CAT son utilizadas como una forma de monitorear al estrés oxidativo. Actualmente, un método internacional para la medición de la CAT no ha sido establecido, dado que los disponibles poseen una sensibilidad cuestionable y una baja reproducibilidad ya que estos son afectados fácilmente por potenciales redox, condiciones de manejo, pH y reactividad de los antioxidantes (Prasetyo y col., 2012; Sánchez-González, 2014). Otro factor que pudiera estar influyendo en el análisis de la CAT, es el tipo de muestra biológica utilizada (suero o plasma). La gran mayoría de estudios que se han publicado sobre la medición de la CAT de muestras biológicas, suelen manejar suero o plasma de manera indistinta, aun cuando es conocido que estos dos difieren en su composición (tabla 1).

Tabla 1. Diversidad en la utilización de muestras biológicas (suero y plasma) en la medición de la CAT.

Método para la medición de la CAT	Muestra utilizada		Cita bibliográfica
FRAP	Suero	Plasma (aditivo)	✓ Rathan-Shetty y col., 2015
			✓ Chrczanowicz y col., 2008
	✓	EDTA	Benzie y Strain, 1996
		Heparina	Janaszewska y Bartosz, 2002
			Cao y Prior, 1998.
		EDTA	Shirpoor y col., 2006
ABTS	✓	EDTA	MacLean y col., 2007
			Ener y col., 2015
			Ihara y col., 2004
			Garca y col., 2013
	✓	Heparina	Janaszewska y Bartosz, 2002
			Cao y Prior, 1998
	✓	EDTA	Valkonen y Kuusi, 1997
			Maldonado y col., 2009
DPPH	✓	Heparina	Chrczanowicz y col., 2008
			Janaszewska y Bartosz, 2002

Varios métodos espectrofotométricos (DPPH, TAEC y FRAP) han sido utilizados en diferentes laboratorios para la evaluación de la CAT en fluidos biológicos. Sin embargo, la comparación entre sus resultados no es sencilla y puede diferir significativamente al utilizar métodos diferentes. Es por eso, que un solo método de medición para la CAT no es suficiente para interpretar la regulación de los sistemas biológicos en el estrés oxidativo y hace necesario el uso de baterías de métodos para tener un mejor entendimiento del mismo. Por lo tanto, existe aún un gran reto en el estandarizar los valores normales de estas pruebas, para poblaciones específicas, ya que hasta el momento los resultados solo pueden ser comparativos y relativos (Janaszewska y Bartosz, 2002; Sofic y col., 2002; Quintanar-Escorza y Calderón-Salinas, 2009).

Aunque faltan varios aspectos analíticos por ajustar en la medición de la CAT, es importante iniciar con el estudio de las diferencias analíticas que pudieran existir al utilizar distintas muestras biológicas en la medición de la CAT, ya que el suero y plasma suelen ser las primeras muestras biológicas de elección para la realización de diversos análisis. Sin embargo, es conocido que estos dos son diferentes en su composición, hecho que es considerado en muchas notas técnicas existentes, que emplea el uso de estas muestras biológicas. Por lo antes

mencionado, es importante estudiar el efecto que pudiera tener el uso de plasma o suero humano en la determinación de la CAT.

MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes y Muestras

El presente estudio fue de tipo prospectivo, y se realizó siguiendo los principios de la declaratoria de Helsinki y todos los pacientes firmaron una carta de consentimiento informado donde se explicó el procedimiento, el uso y manejo de sus muestras biológicas. Para el presente estudio fueron seleccionados 30 sujetos aparentemente sanos (15 hombres y 15 mujeres) de edades entre 19 y 25 años de edad. A quienes se les colectaron muestras de sangre venosa por venopunción del área antecubital, las muestras fueron extraídas por la mañana y con ayuno previo. A cada sujeto se le extrajo sangre, la cual fue recolectada en 4 tubos Vacutainer®; uno sin aditivo para la obtención del suero y 3 tubos con anticoagulante; EDTA, citrato de sodio y heparina de sodio. Los pacientes que presentaron hemólisis, ictericia o lipemia en las muestras, fueron descartados del estudio. Para la obtención del suero se dejaron reposar las muestras de sangre por 15 minutos a temperatura ambiente para la formación del coágulo. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 1000 g por 15 min y el sobrenadante fue colectado (suero) y almacenado en alícuotas a -20 °C, hasta su análisis. Para la obtención del plasma, las muestras se centrifugaron (1000 g por 5 min) y se recolectaron alícuotas que fueron almacenadas bajo condiciones arriba descritas y se clasificaron en base al tipo de anticoagulante utilizado. A todos los sujetos se le realizó la medición de la CAT por DPPH y FRAP. Además de la medición de los principales componentes no enzimáticos con propiedades antioxidantes (proteínas totales, albúmina y ácido úrico). Debido al alcance del presente estudio, los elementos no enzimáticos como las vitaminas y minerales no fueron incluidos.

Determinación de Proteínas Totales, Albúmina y Ácido Úrico

La determinación de estos componentes se realizó siguiendo los procedimientos de los kits proveído por Spinreact®; proteínas totales (biuret), ácido úrico (uricasa-peroxidasa) y albúmina (verde de bromocresol). La medición de los analitos se realizó en un equipo de química clínica semiautomático Spinlab (Holanda), con volumen de aspiración programado de 500 µL de muestra. El control de calidad de los resultados fue validado con la medición de dos controles, uno normal (SPINTROL H Normal) y otro patológico (SPINTROL H patológico) de suero humano. Las mediciones de cada una de las muestras fueron realizadas por triplicado.

Medición de la Capacidad Antioxidante Total del Suero y Plasma

Ensayo de Reducción del DPPH

Se realizó siguiendo lo establecido por Janaszewska y Bartosz, (2002) con algunas modificaciones (figura 1). Una solución stock fue preparada mezclando 2.5 mg de radical DPPH en 100 mL de metanol y se ajustó a 0.7 ± 0.02 a 492 nm de absorbancia. La muestra de suero o plasma (20 μ L) fue acondicionada con 380 μ L de solución PBS (buffer fosfato salino, por sus siglas en inglés) y se le adicionaron 400 μ L de radical DPPH. La mezcla se mantuvo en completa oscuridad durante 30 minutos para posteriormente ser centrifugada a 9500 g por 10 minutos. El sobrenadante fue recolectado y posteriormente, la absorbancia fue medida en un lector de microplaca PERLONG DNM-9602 a una longitud de onda 492 nm.

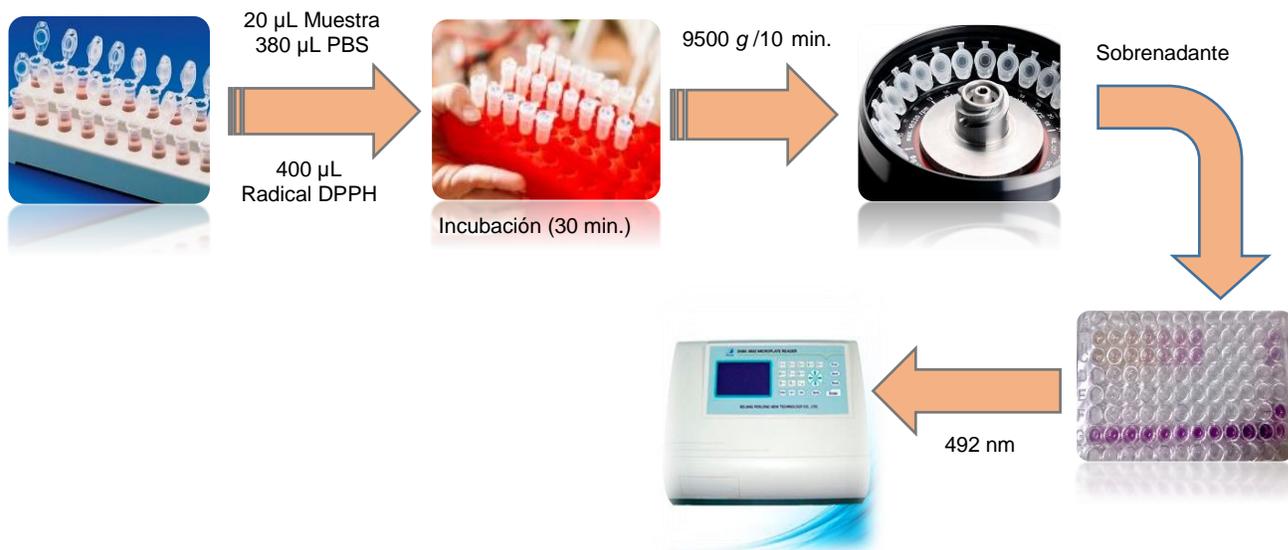


Figura 1. Determinación de la CAT por método de DPPH.

Adicionalmente se utilizó una curva de calibración (figura 2) utilizando trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromán-2-ácido carboxílico) y los resultados fueron expresados como equivalentes trolox por mL (ET/mL).

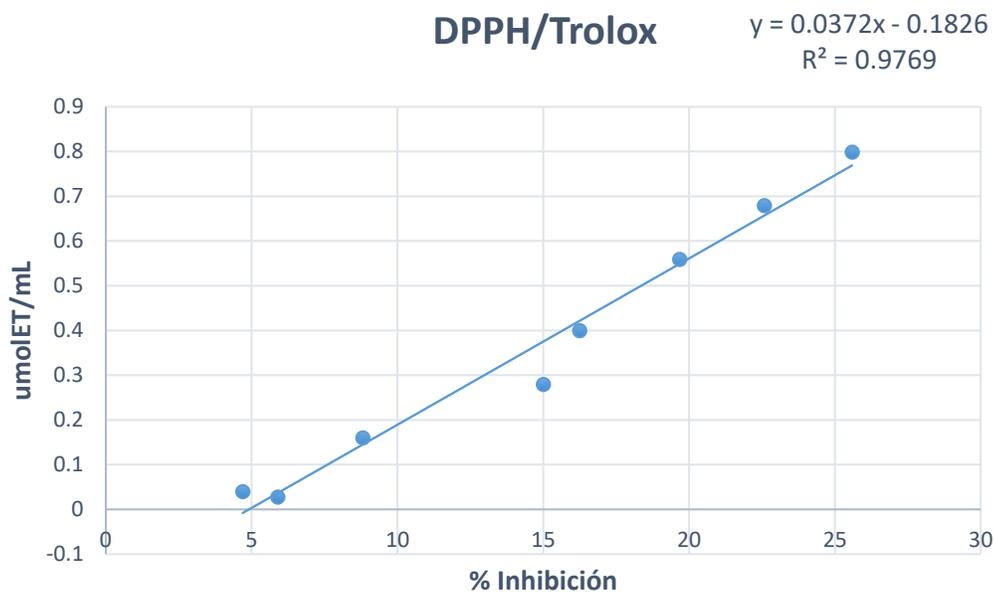


Figura 2. Curva de calibración para el método de DPPH.

Capacidad de Reducción Férrica del Plasma (FRAP)

Se utilizó el método establecido por Benzie y Strain, (1996), adaptado para lector de microplaca (figura 3). La preparación del reactivo de FRAP consistió de 25 mL de buffer acetato (0.3 M, pH= 3.6), mezclado con 2.5 mL de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (20 mM) y 2.5 mL 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina (10 mM). Para el ensayo se colocaron 30 μL de agua destilada con 10 μL de suero o plasma y se le adicionaron 300 μL de reactivo de FRAP. Las mezclas fueron incubadas por un periodo de 4 minutos para posteriormente ser leídas a 630 nm en un lector de microplaca PERLONG DNM-9602.

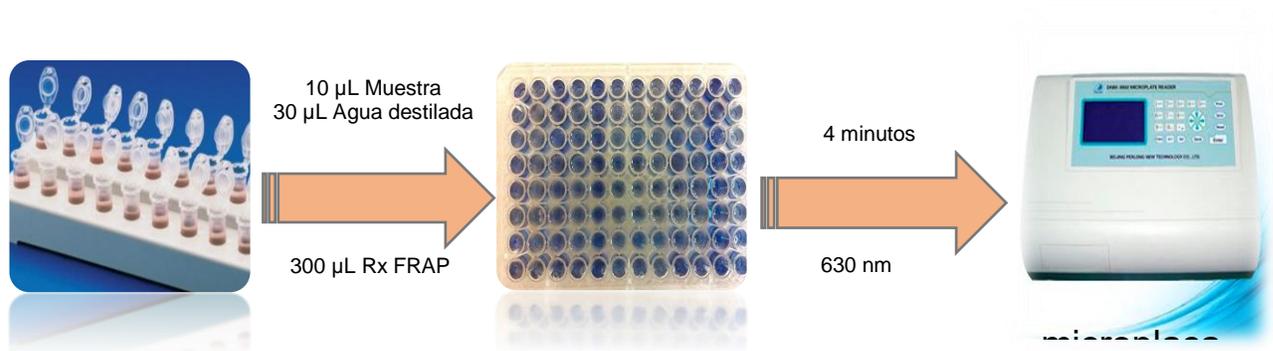


Figura 3. Determinación de la CAT por método de FRAP.

Adicionalmente se utilizó una curva de calibración (figura 4) con trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromán-2-ácido carboxílico) y los resultados fueron expresados como equivalentes trolox por mL (ET/mL).

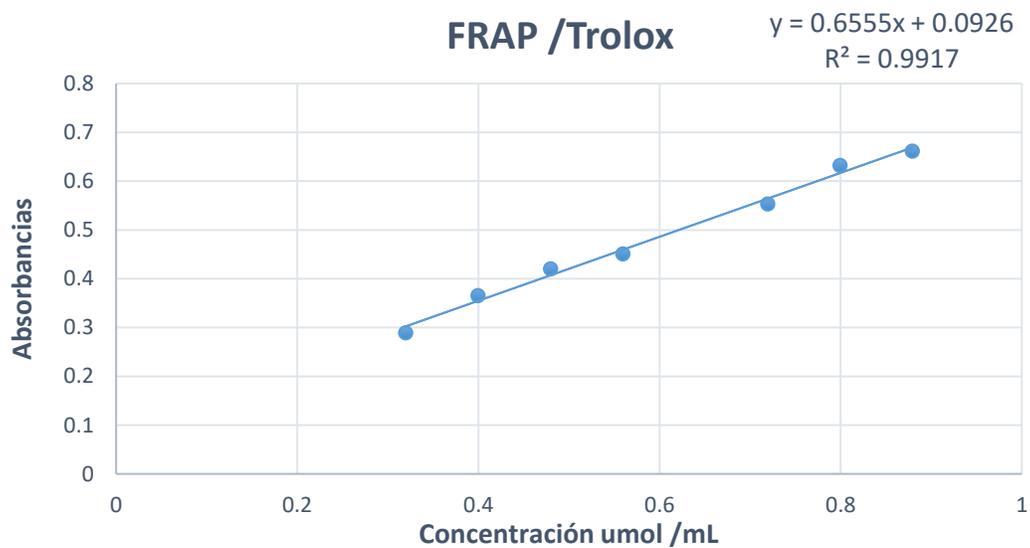


Figura 4. Curva de calibración para el método de FRAP.

Preparación de Pool de Suero y Plasma

La preparación de cada pool se realizó utilizando las muestras obtenidas mediante la venopunción de los 30 sujetos, anteriormente descritos. Las muestras fueron organizadas y separadas en suero y plasma (EDTA, citrato y heparina). Posteriormente, fueron colocadas de manera independiente en un matraz Erlenmeyer de 250 mL y fueron homogeneizadas para la formación del pool. La medición de la CAT por los métodos de DPPH y FRAP, se realizó siguiendo los procedimientos anteriormente descritos y repitiendo cada medición 30 veces para cada pool para estimar y comparar la precisión de los métodos.

Análisis Estadístico

Se realizó una estadística descriptiva, para establecer el comportamiento normal de los datos (comportamiento gaussiano). Para comparar los métodos se utilizaron pruebas *t*-student (pareada) para la comparación intra e intermétodos y prueba de *t*-student de dos muestras para la comparación por sexo. Se realizaron pruebas de regresión lineal y correlación Pearson para conocer la relación entre los métodos y tipos de muestras, además se compararon los métodos mediante gráficos de Bland-Altman. Para la toma de decisiones se utilizó un $\alpha = 0.05$ y un paquete estadístico NCSS (2007) fue utilizado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Medición de la CAT (FRAP y DPPH) en Pool

La medición de la CAT del pool de suero y con cada uno de los aditivos por el método de FRAP se muestra en la tabla 2. Donde observamos que en orden de mayor a menor coeficiente de variación (CV) en la medición de la CAT, encontramos a las muestras de suero, heparina, EDTA y citrato. Mientras que en las mediciones de la CAT por DPPH se observó un comportamiento diferente, resultando que el uso de muestras con heparina presentaron un menor CV, mientras que el pool con EDTA presentó la precisión más baja (tabla 3). Desde el punto de vista general, el método de DPPH (CV; 6.06 a 9.71) presentó mayor precisión que el FRAP (CV; 9.64 a 14.06) comparados independientemente del tipo de muestra utilizada.

Tabla 2. Estimación de la CAT (FRAP) en pool de muestras (n=30).

Pool FRAP ($\mu\text{mol ET/mL}$)				
	Suero	EDTA	Citrato	Heparina
Media	0.40	0.37	0.39	0.38
IC 95%	(0.38 – 0.42)	(0.36 – 0.39)	(0.38 – 0.40)	(0.37 - 0.40)
DE	0.05	0.04	0.03	0.04
CV	14.06	10.59	9.64	12.08

Tabla 3. Estimación de la CAT (DPPH) en pool de muestras (n=30).

Pool DPPH ($\mu\text{mol ET/mL}$)				
	Suero	EDTA	Citrato	Heparina
Media	330.16	350.33	380.99	497.82
IC 95%	(318.92 - 341.40)	(337.63 - 363.03)	(368.65 - 393.33)	(486.54 - 509.09)
DE	30.10	34.01	33.04	30.19
CV	9.12	9.71	8.67	6.06

Las diferencias en la precisión entre ambos métodos (DPPH y FRAP) puede deberse a diferentes propiedades fisiológicas que influyen en la medición de la CAT. En el caso del método de FRAP, se ha observado que es capaz de considerar solo a algunos de los antioxidantes presentes en suero y plasma, ya que este método excluye la contribución antioxidante de las proteínas y péptidos. Mientras que el DPPH posee un tiempo de reacción más largo, que permite una mayor interacción con los componentes del suero, incluso con los antioxidantes débiles, incluyendo a algunos péptidos y proteínas como la albúmina, la cual posee capacidad antioxidante (Benzie y Strain, 1996; Gawron-Skarbek y col., 2014).

Otros estudios reportados previamente han indicado que los métodos comúnmente utilizados para medir la CAT como el TAEC, ORAC y FRAP, presentan baja correlación entre ellos. Lo anterior, puede deberse a que cada método emplea diferentes tecnologías y principios, en el caso del FRAP este mide la habilidad de reducción del hierro, por lo tanto, en este método no se ve implicado el uso de radicales libres u oxidantes, a diferencia del DPPH (Cao y Prior, 1998).

Correlación Entre Métodos de Medición de la CAT

La CAT obtenida utilizando los métodos de DPPH y FRAP en distintos tipos de muestra, se correlaciona moderadamente en la mayoría de los casos (tabla 4), siendo las muestras con heparina las que se correlacionaron mayormente con cada uno de los aditivos por los dos métodos. Por otro lado, también se observó, que existe una débil correlación, de las muestras recolectadas en tubos con citrato de sodio y medidas por el método de FRAP. Es importante mencionar que los tubos con citrato poseen una relación de la muestra con el aditivo de citrato de sodio de 9:1, lo cual genera una dilución en la muestra. Además, es conocido que los anticoagulantes pueden tener un efecto osmótico, extrayendo el agua y elementos formes de las células sanguíneas hacia el plasma, causando una dilución. Este efecto ha sido evidenciado con el uso de muestras con anticoagulantes con el citrato y el oxalato, mientras que en el caso de la heparina y el EDTA el efecto osmótico que se presenta es menor. Debido a lo anterior, es probable que la baja correlación entre los demás aditivos por los métodos de DPPH y FRAP con respecto a las muestras con citrato, podría deberse a una dilución de la muestra (Méndez-González y col., 2008).

Tabla 4. Correlación de la CAT en muestras con distintos aditivos (n=30) por medio de DPPH y FRAP,

	CAT ($\mu\text{mol ET/mL}$)			
	FRAP Suero	FRAP EDTA	FRAP Citrato	FRAP Heparina
DPPH Suero	$r = 0.530302$ $p = 0.002575$	$r = 0.443364$ $p = 0.014130$	$r = 0.433704$ $p = 0.016648$	$r = 0.563282$ $p = 0.001191$
DPPH EDTA	$r = 0.460374$ $p = 0.010467$	$r = 0.442310$ $p = 0.014388$	$r = 0.366529$ $p = 0.046349$	$r = 0.488881$ $p = 0.006117$
DPPH Citrato	$r = 0.419554$ $p = 0.020999$	$r = 0.454461$ $p = 0.011637$	$r = 0.285184$ $p = 0.126621$	$r = 0.479166$ $p = 0.007383$
DPPH Heparina	$r = 0.591024$ $p = 0.000584$	$r = 0.524087$ $p = 0.002952$	$r = 0.503612$ $p = 0.004552$	$r = 0.570382$ $p = 0.000998$

Correlación de *Pearson* ($p < 0.05$). *r*: Coeficiente de correlación.

Aunque la correlación entre los métodos, al usar los distintos tipos de muestra es positiva, debe considerarse que FRAP y DPPH, son métodos que emplean principios diferentes y que también estiman en diferente proporción a algunos compuestos. Es conocido que el DPPH es un método que no es específico para algún compuesto antioxidante en particular, sino que es capaz de interaccionar con la mayoría de los antioxidantes presentes en la muestra de suero o plasma. Por otro lado, método de FRAP se ha contemplado como un método colorimétrico capaz de demostrar los efectos antioxidantes de componentes como el ácido úrico, bilirrubina, vitamina C y polifenoles. Sin embargo, los efectos de las proteínas en este ensayo son débilmente apreciados, a diferencia de DPPH y TAEC. Por lo anterior, es frecuente que los niveles de CAT, medidos por el método de FRAP presentan valores más bajos que los obtenidos por otros métodos descritos. Otra limitante del FRAP es que no estima la capacidad antioxidante de los grupos sulfhidrilos libres de las proteínas, los cuales se han reconocido como los principales responsables de los efectos antioxidantes (Hydzik y col., 2016; Erel, 2004).

Relación del DPPH por Tipo de Muestra Biológica

Se encontró en general una fuerte relación de la CAT medida en muestras de suero y plasma (EDTA, citrato y heparina) por el método de DPPH. La relación más fuerte fue la CAT medida en muestra con EDTA vs citrato, mientras que se encontró una asociación moderada con muestras

de suero vs EDTA y suero vs citrato. En cambio, no encontramos relación analítica de la heparina con los diversos tipos de muestras utilizadas en el estudio (figura 5). Las diferentes relaciones entre los tipos de muestra, nos indican que el tipo de muestra biológica utilizada puede influir directamente en la concentración de la CAT medida.

La relación analítica del 72% del EDTA vs Citrato (figura 5D) podría deberse a que los anticoagulantes presentes en la muestra, actúan en la inhibición del proceso de coagulación mediante mecanismos similares que involucran la quelación de iones de calcio, el cual es un importante cofactor en la cascada de la coagulación. Sin embargo, ha sido observado que estos anticoagulantes son capaces de unirse también a otros iones metálicos como el magnesio y el zinc, inhibiendo la función de algunas enzimas como la fosfatasa alcalina y la aspartato aminotransferasa (Bowen y col., 2010).

Otro aspecto que es relacionado con el uso anticoagulantes (quelantes) como el EDTA y el citrato de sodio, es que estos pueden inducir cambio conformacional en algunas proteínas, con sitios de unión a cationes divalentes, lo cual puede ocasionar la pérdida o disminución de su funcionalidad. Dada la fuerte relación entre los mecanismos anticoagulantes de estos dos aditivos (citrato y EDTA), y los efectos que pueden inducir en algunas de las proteínas en sangre, se pudiese pensar que las similitudes en las interacciones con la muestra, son la causa de su relación analítica alta, más allá del efecto osmótico y de la dilución variable del plasma que estos inducen. Se ha observado que la heparina, con la cual se obtuvo una débil correlación en todas las muestras, posee un efecto osmótico similar al de otros anticoagulantes, sin embargo, su mecanismo inhibitorio de la coagulación, es distinto al de mencionados agentes quelantes. Así mismo, es conocido que las proteínas contribuyen significativamente en CAT y que cambios conformacionales inducidos pueden alterar y comprometer su funcionalidad, como en el caso de la albúmina (principal proteína plasmática). Previamente se ha observado que las modificaciones estructurales, pueden alterar fuertemente su capacidad para ligar y transportar compuestos y, por ende, esto suele ocasionar un descenso en sus actividades antioxidantes (Taverna y col., 2013; Bowen y col., 2010; Henry, 2005).

La fuerte asociación que presentan muestras de suero y plasmas (EDTA y citratado) podría estar en relación a propiedades inherentes de las muestras analíticas recolectadas en tubos con citrato de sodio. Este anticoagulante, actúa inhibiendo la cascada de la coagulación al quelar a los iones de calcio, como ya se mencionó estos son importantes como cofactores durante el proceso de coagulación. Sin embargo, el citrato de sodio podría estar interaccionando con la muestra induciendo un efecto en la CAT. Es conocido que el citrato de sodio es ampliamente

utilizado en la industria alimenticia como compuesto antioxidante, ya que este es capaz de preservar a muchos alimentos como las carnes, inhibiendo por un largo periodo de tiempo la peroxidación. Así como han sido descritas las funciones como antioxidante alimenticio del citrato de sodio, este mismo pudiese interaccionar como antioxidante en muestras de plasma recolectadas con este aditivo. Por otro lado, también fue observado que la precisión en estas muestras, resulta ser alta, ya que en la medición del pool de suero y con cada uno de los aditivos, el pool que correspondía a las muestras recolectadas en tubos con citrato de sodio, obtuvo un CV bajo (FRAP:9.64 y DPPH:8.67) (tabla 2 y 3) en las determinaciones de la CAT, indicando que la precisión al medir la CAT con este tipo de muestra es buena.

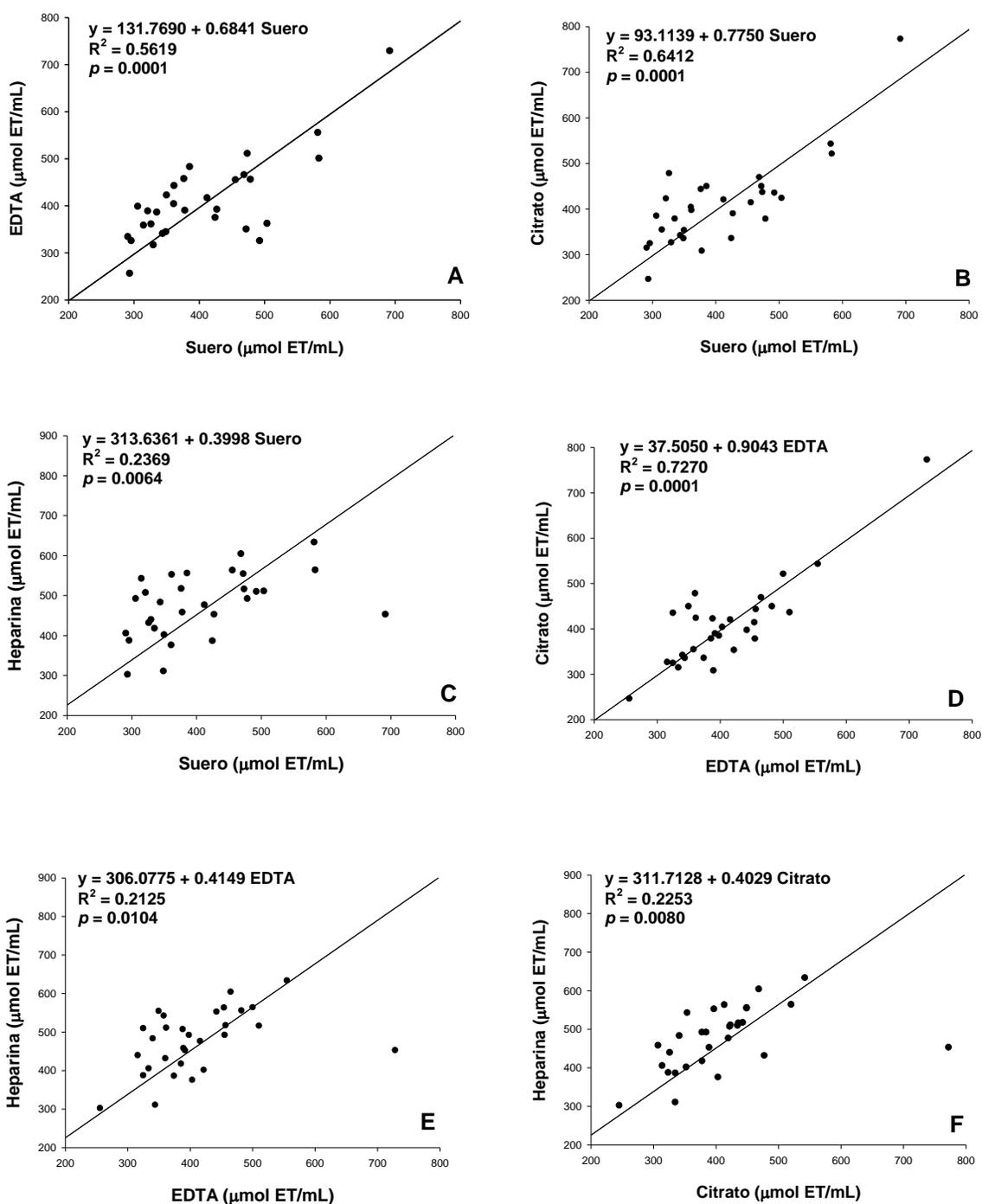


Figura 5. Regresiones lineales del método de DPPH para suero vs EDTA (A), suero vs citrato (B), suero vs heparina (C), EDTA vs citrato (D), EDTA vs heparina (E) y citrato vs heparina (F).

Relación del FRAP por Tipo de Muestra Biológica

En la figura 6 podemos observar que la relación analítica observada entre los distintos tipos de muestra fue alta (mayor al 70%), siendo principalmente las muestras de suero y heparina, las que presentaron la mayor relación analítica con un 83% (figura 6C). Esta fuerte relación, pudiera atribuirse a dos factores inherentes al tipo de muestra, en el caso del suero es bien sabido que se encuentra reducido en proteínas responsables de la coagulación, que pudieran representar alguna actividad antioxidante. Mientras que, en el caso de la heparina de sodio, se sabe que tiene la capacidad de unirse inespecíficamente a proteínas y reducir la capacidad antioxidante de las mismas. Por lo tanto, la relación alta entre ambas podría deberse realmente a la reducción de la actividad de las proteínas. (Bowen y col., 2010).

A diferencia de las relaciones analíticas observadas en el método de DPPH, en el método FRAP se mostró una mejor relación analítica independientemente del tipo de muestra, ya que se observó un rango de relación de 73 al 79% ($p < 0.05$). Esto nos indica que al utilizar el método de FRAP independientemente el tipo de muestra, los resultados analíticos que se obtienen son predichos hasta en un 70%. Aunque el FRAP muestra una adecuada relación analítica con las diversas muestras biológicas utilizadas en el presente estudio, este presenta la desventaja al poseer una mayor imprecisión que el DPPH (tabla 2 y 3). Estudios previos, han evidenciado que el DPPH es un método pragmático y de bajo costo, considerado como estable en la reacción y que a su vez otorga una alta reproducibilidad (Sagar y col., 2011). A diferencia de esto, se observó que a pesar de que el método de FRAP ha sido considerado en desventaja por excluir a la actividad antioxidante de algunos componentes como las proteínas, este presenta una mejor correlación entre las muestras de suero y plasma (EDTA, citrato y heparina) (figura 6), indicando que este podría estar menos influido por el tipo de muestra utilizada para medir la CAT, a diferencia del método DPPH.

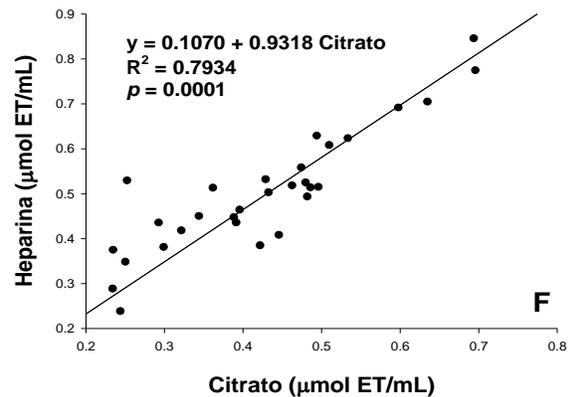
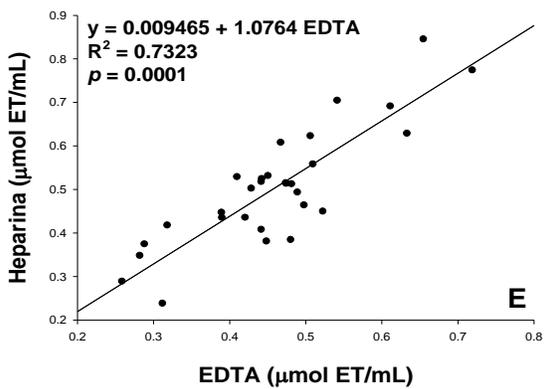
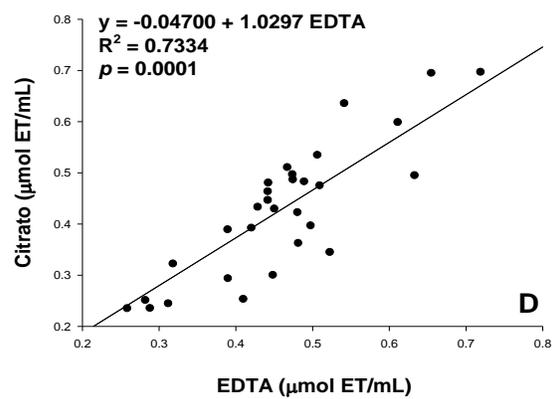
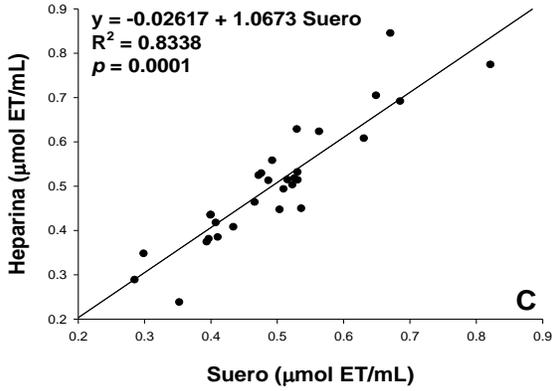
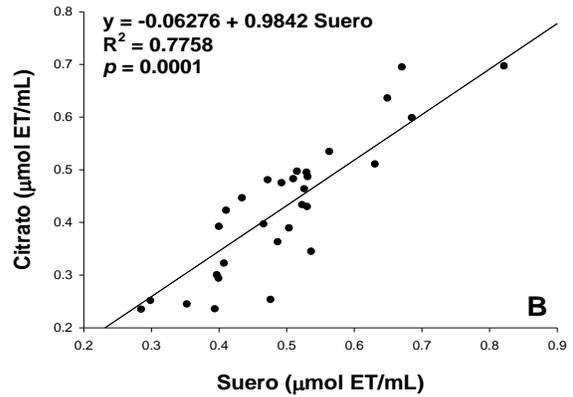
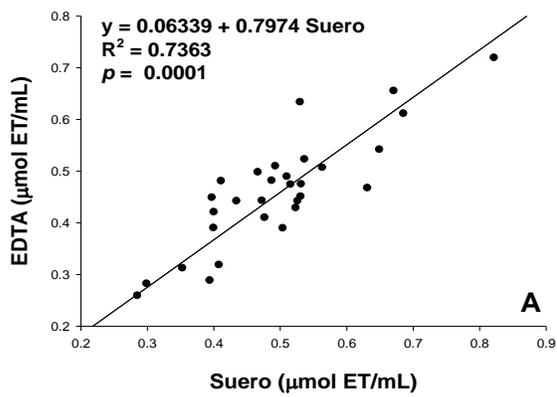


Figura 6. Regresiones lineales del método de FRAP para suero vs EDTA (A), suero vs citrato (B), suero vs heparina (C), EDTA vs citrato (D), EDTA vs heparina (E) y citrato vs heparina (F).

Contribución de los Principales Antioxidantes no Enzimáticos en la Estimación de la CAT

La correlación para el método de DPPH, entre el tipo de muestra, y los principales antioxidantes no enzimáticos (proteínas totales, albúmina y ácido úrico) mostraron que suero y plasma (EDTA, citrato y heparina) se correlacionan de manera distinta con los antioxidantes no enzimáticos. En la tabla 5 observamos que la CAT del suero y plasma recolectado en tubos con heparina de sodio, se correlacionan medianamente con el ácido úrico ($p < 0.05$). Mientras que, en muestras de plasma, recolectadas en tubos con EDTA y citrato de sodio, se observó que la correlación con los antioxidantes no enzimáticos analizados, fue baja. (tabla 5).

Tabla 5. Contribución de los principales antioxidantes no enzimáticos (método de DPPH).

Tipo de muestra analizada por DPPH	Proteínas totales	Albúmina	Ácido úrico
Suero	$r = -0.125774$ $p = 0.507805$	$r = -0.047731$ $p = 0.802226$	$r = 0.457047$ $p = 0.011113$
EDTA	$r = -0.094967$ $p = 0.617650$	$r = 0.054432$ $p = 0.775123$	$r = 0.297833$ $p = 0.109932$
Citrato	$r = -0.254723$ $p = 0.174329$	$r = 0.061974$ $p = 0.744929$	$r = 0.243074$ $p = 0.195558$
Heparina	$r = -0.039355$ $p = 0.836420$	$r = -0.205311$ $p = 0.276419$	$r = 0.464562$ $p = 0.009700$

Correlación de *Pearson* ($p < 0.05$). *r*: Coeficiente de correlación.

El DPPH ha sido considerado como un método capaz de contemplar a la mayoría de los antioxidantes presentes en el suero y plasma, ya que su tiempo prolongado de interacción, permite la participación incluso de antioxidantes débiles. Sin embargo, este no es específico para algún compuesto antioxidante en particular, sino que se estima que es capaz de interaccionar con la mayoría de los antioxidantes presentes en la muestra (Hydzik y col., 2016; Sagar y col., 2011). Aun así, es de notar que la principal contribución a la CAT obtenida en muestras biológicas, podría darse por parte del ácido úrico, debido a la correlación de las muestras de suero y plasma (EDTA, citrato y heparina).

En el caso de la albúmina, se observó que su relación con la CAT medida por DPPH en los distintos tipos de muestra fue muy baja, aun cuando se ha considerado, que la fuerte capacidad antioxidante de esta proteína es capaz de ser medida por este método, ya que esta se

une fuertemente al radical, incluso en presencia de otros antioxidantes. Sin embargo, el comportamiento de la albúmina con el radical, ha sido estudiado principalmente en albúmina de origen no biológico y bajo condiciones controladas. Por lo tanto, en un ambiente heterogéneo como en suero o el plasma, el comportamiento de la albúmina con el radical, podría ser diferente al reportado en algunos estudios (Li y col., 2015).

En cuanto al método de FRAP, se observó que los diferentes tipos de muestras biológicas, presentaron una correlación más alta con el ácido úrico, que, con las proteínas totales y la albúmina, indicando que este podría contribuir significativamente durante la medición de la CAT (tabla 6). Estudios previos sobre el ácido úrico han reportado que este metabolito posee una capacidad antioxidante alta. Incluso se ha evidenciado que tiene la capacidad de regenerar otros compuestos antioxidantes. Otros estudios han demostrado que el ácido úrico contribuye fuertemente en la CAT medida por FRAP, siendo este el principal antioxidante considerado en el método, seguido por otros compuestos como el α -tocoferol y la bilirrubina (Benzie y Strain, 1996).

Tabla 6. Contribución de los principales antioxidantes no enzimáticos al método de FRAP.

Tipo de muestra analizada por FRAP	Proteínas totales	Albúmina	Ácido úrico
Suero	$r = 0.098829$ $p = 0.603356$	$r = -0.135833$ $p = 0.474177$	$r = 0.583201$ $p = 0.000718$
EDTA	$r = 0.306553$ $p = 0.099422$	$r = -0.139581$ $p = 0.461948$	$r = 0.425404$ $p = 0.019099$
Citrato	$r = 0.315093$ $p = 0.089884$	$r = -0.137041$ $p = 0.470215$	$r = 0.462076$ $p = 0.010150$
Heparina	$r = 0.117401$ $p = 0.536675$	$r = -0.172363$ $p = 0.362402$	$r = 0.493008$ $p = 0.005639$

Correlación de *Pearson* ($p < 0.05$). *r*: Coeficiente de correlación.

Las contribuciones de antioxidantes en el FRAP, han sido estimadas, de hasta en un 60 % para el ácido úrico, mientras que para otros componentes como el α -tocoferol, ácido ascórbico, bilirrubinas, proteínas y otros compuestos con capacidad antioxidante, se ha estimado que contribuyen con un 5 %, 15 %, 5 % 10 % y 5 %, respectivamente. El hecho de que la actividad antioxidante de la albúmina no sea considerada en el método, más que un aspecto negativo, esto pudiese ser considerado como una ventaja, ya que la principal contribución al FRAP proviene de

compuestos antioxidantes no proteicos, lo cual puede favorecer en la determinación de antioxidantes exógenos (Benzie y Strain, 1999).

Concordancia Entre DPPH y FRAP

La medición de parámetros fisiológicos está siempre sujeta al error y a la propia variabilidad biológica, ya que en la práctica estos resultados raramente muestran relaciones exactas. En la medición de variables fisiológicas, pueden llegar a existir diferentes métodos de estimación, siendo, por lo general, uno de estos el que mejor determina la magnitud de la variable en estudio. A pesar de esto, si se dispone de un método alternativo al método de referencia, más práctico de utilizar, es de interés por lo tanto el conocer su concordancia entre ambos sistemas (Bland y Altman, 1986.).

Los métodos estadísticos comúnmente utilizados para establecer el comportamiento de datos pareados, son el análisis de correlación y la regresión lineal. La correlación es una técnica estadística útil para mostrar cómo y con qué poder se relacionan pares de variables, el resultado de las correlaciones es expresado mediante un valor de r , llamado coeficiente de correlación, el cual es útil para describir la relación lineal entre las variables, más no su grado de acuerdo. Es por esto, que el coeficiente de correlación y la técnica de regresión puede llegar a resultar inadecuados para la evaluación del acuerdo entre dos métodos que miden una misma variable. Para esto, Bland y Altman (1986) propusieron un gráfico sencillo para evaluar la concordancia entre dos métodos, este consiste en representar la diferencia entre cada pareja de valores frente a la media de cada valor pareado. Los puntos en la gráfica se distribuyen alrededor de la línea media que representa a la media de las diferencias. La distribución de los puntos alrededor de la línea media, indica el acuerdo ente los métodos, teniendo que, a mayor grado de dispersión de los puntos, menor será la concordancia entre los dos métodos. Además, el método de Bland-Altman permite calcular los intervalos de confianza de las diferencias, para así estimar la precisión del resultado (Giavarina, 2015; Molina, 2015; Bland y Altman, 1986.).

Finalmente, este método no indica si el acuerdo entre los métodos es suficiente o el adecuado, como para decidir el uso de un método sobre otro, este simplemente cuantifica el sesgo y el grado de acuerdo entre las mediciones, en un intervalo de confianza del 95%. De este modo la connotación gráfica expresa solo las diferencias entre los métodos empleados para la comparación (Giavarina, 2015).

En las gráficas de Bland-Altman obtenidas para la comparación entre métodos de determinación de la CAT (DPPH y FRAP), no se mostró una dispersión marcada de los puntos (figura 7). Sin embargo, a pesar de que la distribución de los puntos en estas no fue anormal, el método de Bland-Altman ha sido utilizado anteriormente considerando el hecho de que, al medir una misma variable, por dos métodos distintos, estos, a pesar de poseer diferencias, arrojaran valores que oscilaran en rangos cercanos entre sí. Sin embargo, en el caso del método de DPPH y FRAP, a pesar de que ambos son empleados para la estimación de la CAT, estos, expresan proporciones muy diferentes de esta, lo cual hace que al ser tan grande la diferencia entre los datos obtenidos para la misma variable, estos mismos no sean comparables por medio del método de Bland-Altman.

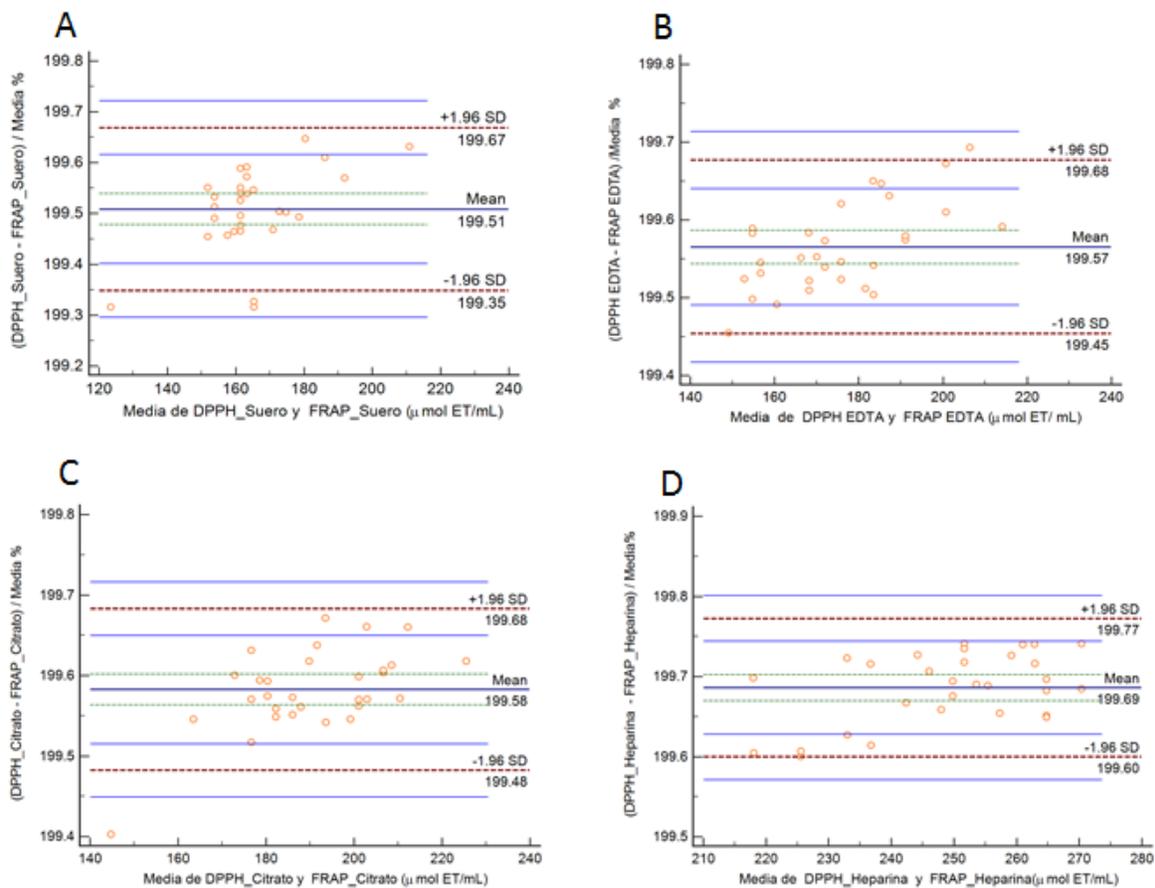


Figura 7. Gráficas de Bland-Altman, comparativas para el método de DPPH y FRAP, en el uso de diferentes aditivos.

Comparación de la CAT en Sujetos Aparentemente Sanos (DPPH)

Al realizar la comparación de la CAT de los sujetos según el tipo de muestra (tabla 7), encontramos que no hay diferencias de las muestras analizadas con suero, citrato y EDTA ($p > 0.05$). Pero encontramos diferencias significativas de las muestras con heparina, respecto al resto de las muestras analizadas ($p < 0.05$). Esto nos indica que se puede analizar de manera indistinta la CAT con suero o plasma (citrato o EDTA). Respecto a las muestras con heparina observamos que hay una sobreestimación promedio de la concentración de la CAT hasta en un 15.0 %, 14.3 % y 13.9 % comparadas con suero, citrato y EDTA, respectivamente. Por otro lado, el suero presentó una tendencia de subestimación de la concentración comparado con el EDTA y citrato, del 1.0 % y 0.42 % respectivamente el cual no representa una variación significativa en los resultados.

Tabla 7. Comparación de la capacidad antioxidante (DPPH) por tipo de muestra de sujetos aparentemente sanos (n=30).

DPPH ($\mu\text{mol ET/mL}$)	
Tipo de muestra	Media \pm DE (IC95%)
Suero	406.36 \pm 98.18 (369.70 - 443.03) ^a
EDTA	409.75 \pm 89.60 (376.29 - 443.21) ^a
Citrato	408.04 \pm 95.02 (372.55 - 443.52) ^a
Heparina	476.09 \pm 80.65 (445.97 - 506.20) ^b

^a Literales distintas por columna indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

DE (IC95%) indica desviación estándar (intervalo de confianza 95%).

Comparación de la CAT en Sujetos Aparentemente Sanos (FRAP)

A diferencia de los resultados obtenidos en la medición de la CAT por DPPH, el método FRAP presentó diferencias significativas ($p < 0.05$) al realizarse en muestras de suero y plasma (EDTA y citrato). Sin embargo, esto mismo no fue observado para las muestras de heparina con respecto a las de suero ($p > 0.05$) (tabla 8). Es conocido que las muestras de suero a diferencia de las de plasma, carecen de algunas proteínas, principalmente aquellas implicadas en el proceso de coagulación. En el caso de la heparina se ha observado que tiene la capacidad de unirse de manera inespecífica a proteínas y péptidos, llegando a afectar algunas detecciones espectrofotométricas. Pudiendo ser esta la causa de la similitud observada al medir la CAT en muestras de suero y en plasma recolectado en tubos con heparina (Bowen y col., 2010).

Tabla 8. Comparación de la capacidad antioxidante (FRAP) por tipo de muestra de sujetos aparentemente sanos (n=30).

FRAP ($\mu\text{mol ET/mL}$)	
Tipo de muestra	Media \pm DE (IC95%) *
Suero	0.49 \pm 0.11 (0.45 - 0.54) ^a
EDTA	0.45 \pm 0.10 (0.41 - 0.49) ^b
Citrato	0.42 \pm 0.12 (0.37 - 0.47) ^c
Heparina	0.50 \pm 0.13 (0.45 - 0.55) ^a

^a: Literales distintas por columna indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

DE (IC95%) indica desviación estándar (intervalo de confianza 95%).

Estudios previos sobre la estimación de la CAT por FRAP en una población asiática sana de individuos adultos han reportado de 0.612–1.634 $\mu\text{mol ET/mL}$ (n =141). Mencionados valores, se observan muy por encima de los obtenidos, en cualquiera de los tipos de muestra

evaluadas en nuestro estudio. Sin embargo, esto puede resultar completamente normal ya que es conocido que los valores normales de la CAT aún no han logrado ser estandarizados, por lo que los métodos existentes para su determinación, suelen usarse de manera comparativa con otros métodos, para establecer así una tendencia entre los resultados (Janaszewska y Bartosz, 2002; Sagar y col., 2011; Benzie y Strain, 1996).

Comparación por Sexo y Tipo de Muestra de la CAT (DPPH)

Encontramos que no existen diferencias en la CAT promedio por DPPH al comparar por sexo (tabla 9) ($p > 0.05$). Esto nos indica que el sexo, probablemente no es una variable que influya en la CAT, medida por este método. Este mismo comportamiento fue observado independientemente del tipo de muestra biológica utilizada. Anteriormente, se había observado que la CAT medida por DPPH no se correlaciona significativamente con la edad, peso, talla o el índice de masa corporal (IMC), a diferencia de otros métodos como el FRAP. Este aspecto del DPPH, pudiese ser reconocido como una ventaja del método, al realizar el estudio clínico de grupos en los cuales los participantes, pueden diferir ampliamente respecto al IMC (Chrzczanowicz y col., 2008).

Tabla 9. Comparación de la CAT (DPPH) en hombres (n=15) y mujeres (n=15).

Tipo de muestra	DPPH ($\mu\text{mol ET/mL}$)	
	Hombres Media \pm DE (IC95%)	Mujeres Media \pm DE (IC95%)
Suero	414.39 \pm 96.77 (360.80 - 467.98) ^a	398.34 \pm 102.30 (341.69 - 454.99) ^a
EDTA	423.63 \pm 72.24 (383.62 - 463.64) ^b	395.88 \pm 27.07 (337.80 - 453.95) ^b
Citrato	409.87 \pm 67.78 (372.34 - 447.41) ^c	406.20 \pm 118.75 (340.43 - 471.96) ^c
Heparina	492.77 \pm 80.61 (448.12 - 537.41) ^d	459.41 \pm 79.86 (415.18 - 503.64) ^d

^a: Literales distintas por filas indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

DE (IC95%) indica desviación estándar (intervalo de confianza 95%).

Comparación por Sexo y Tipo de Muestra de la CAT (FRAP)

Encontramos diferencias significativas entre hombres y mujeres al comparar la CAT en muestras de suero y plasma (EDTA, citrato y heparina) por el método de FRAP ($p < 0.05$) (tabla 10). Mencionadas diferencias pudiesen ser atribuidas a que el método de FRAP posee una correlación significativa con la edad, peso, talla y el IMC, lo cual se ha estimado es capaz de llegar a causar una variación de hasta el 8% en determinaciones de la CAT por este método (Chrczanowicz y col., 2008; Gawron-Skarbek y col., 2014).

Tabla 10. Comparación en medición de la CAT (FRAP) en hombres (n=15) y mujeres (n=15).

Tipo de muestra	FRAP ($\mu\text{mol ET/mL}$)	
	Hombres	Mujeres
	Media \pm DE (IC95%)	Media \pm DE (IC95%)
Suero	0.54 \pm 0.12 (0.47 - 0.61) ^a	0.44 \pm 0.08 (0.40 - 0.49) ^b
EDTA	0.50 \pm 0.10 (0.44 - 0.55) ^c	0.41 \pm 0.09 (0.36 - 0.47) ^d
Citrato	0.48 \pm 0.12 (0.41 - 0.55) ^e	0.36 \pm 0.10 (0.31 - 0.42) ^f
Heparina	0.56 \pm 0.13 (0.48 - 0.63) ^g	0.44 \pm 0.10 (0.38 - 0.50) ^h

^a: Literales distintas por columna indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

DE (IC95%) indica desviación estándar (intervalo de confianza 95%).

Para el método de DPPH fue observado que, al comparar entre sexos, independientemente del tipo de muestra, no se presentaban diferencias significativas ($p > 0.05$) (tabla 9), mientras que para el método de FRAP se encontró que las comparaciones entre sexo si las presentaba ($p < 0.05$) (tabla 10). Esto nos indica que, en el estudio de la CAT, por este método, ciertos aspectos fisiológicos como el sexo deben de ser considerados al momento de establecer una población de estudio. Mientras que en el método de DPPH, posee la ventaja de poder estudiar poblaciones en donde los sujetos de estudio pueden diferir en ciertos parámetros fisiológicos como el sexo, talla, peso e IMC, sin afectar al estudio de la CAT.

CONCLUSIONES

La medición de la CAT por ambos métodos (DPPH y FRAP) en el pool de suero y con cada uno de los aditivos, indicó que en general el método de DPPH resulta más preciso que el de FRAP. Así mismo se observó que la mayor correlación de la CAT con los principales componentes antioxidantes endógenos no enzimáticos fue con el ácido úrico, indicando que este puede llegar a contribuir significativamente en la medición de la CAT.

Por otro lado, se encontró que la CAT medida por DPPH no se ve influida por el sexo del sujeto, a diferencia del método de FRAP, en donde se observó que existían diferencias significativas en la CAT dependientes del género. Finalmente, en las correlaciones intramétodo con respecto a los diferentes tipos de muestra, se observó que el poder de la correlación varía según el tipo muestra utilizada en el método de DPPH, mientras que la CAT medida usando diferentes aditivos presenta una fuerte correlación en todos los casos en el método de FRAP.

RECOMENDACIONES

Es conocido que el organismo humano posee diversos mecanismos antioxidantes, y que, para fines de estudio, solo suelen ser considerados los de principal aportación. Sin embargo, en el caso de algunos antioxidantes como el ácido úrico, el cual se ha observado representa una fuerte correlación con la medición de la CAT, no han sido elucidadas completamente, así como la relación de los mecanismos biológicos que influyen y regulan su elevación, bajo el estrés oxidativo. Por lo que, estudios futuros sobre este analito, pudiesen contribuir a la comprensión del complejo sistema antioxidante. Otro aspecto de relevancia que se pudiera considerar para futuros estudios, es que actualmente los métodos que miden la CAT, suelen emplear radicales, ajenos al cuerpo humano, por lo que la evaluación del efecto antioxidante ante radicales libres de origen biológico, podría ser un aporte muy importante.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Atsumi T, Iwakura I, Kashiwagi Y, Fujisawa S y Ueha T. 1999. Free radical scavenging activity in the nonenzymatic fraction of human saliva: a simple DPPH assay showing the effect of physical exercise. *Antioxidantes & Redox Signaling*. Vol. 1 Número: 4. 542-544 p.
- Benzie, I. F. F. and Strain, J. J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76 p.
- Benzie, I. F. F. and Strain, J. J. 1999. Ferric reducing /antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology*. 0076-6879/99. 16, 18, 20, 22, 23, 27 p.
- Bland JM and Altman DG. 1986. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *The lancet*. 307-309 p.
- Bowen R A R, Hortin G L, Csako G, Otañez O H and Remaley A T. 2010. Impact of blood collection devices on clinical chemistry assays. *Clinical Biochemistry*. 4-25. 15,16 p.
- Cao G and Prior RL. 1998. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clinical Chemistry* 44:6 1309-1315. 1310, 1311 p.
- Chrzczanowicz J, Gawron A, Zwolinska A, Graft-Johnson J, Krajewski W, Krol M, Markowski J, Kostka T and Nowak D. 2008. Simple method for determining human serum 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazil (DPPH) radical scavenging activity—possible application in clinical studies on dietary antioxidants. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 46(3):342-349. 343, 344 p.
- Ener K, Keske M, Aldemir M, Ozcan MF, Okulu E, Ozayar A, Ergin M, Doluoglu OG, Cakmak S and Erel,O. 2015.Evaluation of oxidative stress status and antioxidant capacity in patients with painful bladder syndrome/interstitial cystitis: preliminary results of a randomized study.*Springer* 47:129-1302. 1299 p.
- Erel O. 2004. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*. 277-285. 283, 284 p.
- Garca MF, Aslan M, Tuna B, Kozan A, Cankaya H. 2013. Serum myeloperoxidase activity, total antioxidant capacity and nitric oxide levels in patients with chronic otitis media. *The Journal of Membrane Biology* 246:519-524. 519- 522 p.

- Gawron-Skarbek A, Chrzczanowicz J, Kostka J, Nowak D, Drygas W, Jegier A, and Kostka T. Cardiovascular Risk Factors and Total Serum Antioxidant Capacity in Healthy Men and in Men with Coronary Heart Disease. 2014. Hindaw.3,6 p.
- Giavarina D. Understanding Bland Altman analysis.2015. *Biochemia Medica* 25(2):141-51.
- González-Hernández A. 2010. Principios de bioquímica clínica y patología molecular. 1ª ed. Navarra, España: ELSEVIER. 439-446 p.
- Harper, 2012. *Bioquímica ilustrada*. 29 ed. Mexico, D.F: McGRAW-HILL. 543-547 p.
- Henry JB. 2005. *El Laboratorio en el Diagnóstico Clínico*. 20ª ed. España: Marbán. 13,17 p.
- Henry JB. 2005. *El Laboratorio en el Diagnóstico Clínico*. 20ª ed. España: Marbán. 13,17 p.
- Hydzik P, Krosniak M, Francik R, Gomolka E, Eker ED y Zagrdzki P.2016. Serum antioxidant parameters in patients poisoned by different xenobiotics.*Polish Pharmaceutical Society*. 337-344. 339 p.
- Inhara H, Hashiozume N, Hasagawa T and Yoshida M. 2004. Antioxidant capacities of ascorbic acid, uric acid, α -tocopherol, and bilirubin can be measured in the presence of another antioxidant, serum albumin. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*18:45-49. 46 p.
- Janaszewska, A. and Bartosz, G. 2002. Assay of total antioxidant capacity: comparison of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 62, 231-236 p.
- Li X, Chen D, Wang G, Lu Y. 2015. Probing the interaction of human serum albumin with DPPH in the absence and presence of eight antioxidants. *Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 1144-1152.11145- 1150 p.
- MacLean PD, Drake EC, Ross L and Barclay C. 2007. Bilirubin as an antioxidant in micelles and lipid bilayers: its contribution to the total antioxidant capacity of human blood plasma. *Free Radical Biology & Medicine* 600-609. 601, 602 p.
- Maldonado MD, Moreno H and Calvo JR. 2009. Melatonin present in beer contributes to increase the levels of melatonin and antioxidant capacity of the human serum. *Clinical Nutrition* 28: 188-191. 189, 190 p.
- Mckee T.2003. *Bioquímica: La base molecular de la vida*. 3ª ed. Madrid, España. Mc Graw- Hill. 319-324 p.
- McKenzei SB. 2000. *Hematología clínica*. 2ª ed. México: El manual moderno. 3, 42, 281-283 p.
- Mendez – Gonzalez J, Campos J M y Ordoñez- Llanos J. 2008. El laboratorio clínico y las dislipidemias. *Endocrinología y nutrición*. 55(2):89-96. 92 p.

- Molina M. Otra piedra con la que no tropezar. El método de Bland – Altman para medir acuerdo. 2015. Committee European Education in Anaesthesiology. Disponible en: <http://anestesiario.org/2015/otra-piedra-con-la-que-no-tropezar-el-metodo-de-bland-altman-para-medir-acuerdo/> (Fecha de acceso:18 de octubre de 2016).
- Prasetyo EN, Willibald W, Nyanhongo GS, Guebitz GM. 2012. A unique two- way approach for the validation of total antioxidant capacity of serum samples. *European Journal of Clinical Investigation* 42(4):432-438 p.
- Quintanar – Escorza MA, Calderón- Salinas JV. 2009. La capacidad antioxidante total. Bases y aplicaciones. *REB* 28(3):89-101.89 – 96, 99 p.
- Ruiz- Arguelles GJ.2009. Fundamentos de hematología. 4a ed. México: Editorial Medica Panamericana. 63, 101 p.
- Sagar B, Kedare R y Singh P. 2011. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*. 48(4):412-422. 413, 414 p.
- Sánchez-González N. 2014.Capacidad antioxidante en plasma e ingesta dietética de antioxidantes en mujeres universitarias con normopeso, sobrepeso y obesidad. Universidad autónoma de Nuevo León. México. Disponible en: <http://eprints.uanl.mx/4363/1/1080259407.pdf> (Fecha de acceso:31 de marzo de 2016).
- Shetty, K. R., Kali, A. and Shetty, K. R.2015. Serum total antioxidant capacity in oral carcinoma patients. *Pharmacognosy Research*, 7, 184 p.
- Shirpoor A, Ilkhanizadeh B, Saadatian R, Darvari BS, Behtaj M, Karimipour F, Ghaderi-Pakdel and Saboori E. 2006. Effect of Vitamin E on diabetes-induced changes in small intestine and plasma antioxidant capacity in rat. *Journal of Physiology and Biochemistry* 62(3), 171-178. 172, 173 p.
- Sofic E, Rustembegovic A, Kroyer G, Cao G. 2002. Serum antioxidant capacity in neurological, psychiatric, renal diseases and cardiomyopathy. *Journal of Neural Transmission* 109:711-719. 712, 714-717 p.
- Taverna M, Marie AL, Mira JP, Guidet B. 2013. Specific antioxidant properties of human serum albumin. *Annals of intensive care* 3:4. 2,3 p.
- Valkonen M. y Kuusi T. 1997. Spectrophotometric assay for total peroxy radical trapping antioxidant potential in human serum. *Journal of Lipid Research*, Volume 38. 823,830 p.

Zhang M, Liu N y Liu H.2014. Determination of the total mass of antioxidant substances and antioxidant capacity per unit mass in serum using redox titration. *Bioinorganic Chemistry and Applications*. 928-595. 1,2,3,4 p.

ANEXOS

Anexo 1. Abreviaturas y Siglas

CAT. Capacidad antioxidante total.

DPPH. 2,2 difenil-1-picrilhidrazil.

FRAP. Capacidad de reducción férrica del plasma.

EDTA. Ácido etilendiaminotetraacético.

Trolox. 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromán-2-ácido carboxílico.

TAEC. Capacidad antioxidante de equivalentes trolox.

ROS. Especies reactivas de oxígeno

RNS. Especies reactivas de nitrógeno.

CV. Coeficiente de variación.

DE. Desviación estándar.

IC 95%. Intervalo de confianza 95%.

µmol ET/mL. Micro moles equivalentes trolox por mililitro.

IMC. Índice de masa corporal.