



UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO

FACULTAD DE MEDICINA Y NUTRICIÓN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN



**“EFECTO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE LA RESPUESTA
ANTIOXIDANTE EN LA ACTIVACIÓN DE NRF2/KEAP1 EN
PACIENTES CON NEUROPATÍA PERIFÉRICA DIABÉTICA”**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD

P R E S E N T A :
ANGEL SAUL ALMAGUER BLANCO

D I R E C T O R A D E T E S I S
DRA. EN C. MARTHA ANGÉLICA QUINTANAR ESCORZA.

VICTORIA DE DURANGO, DGO., FEBRERO 2019



UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO

FACULTAD DE MEDICINA Y NUTRICIÓN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN



**“EFECTO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE LA RESPUESTA
ANTIOXIDANTE EN LA ACTIVACIÓN DE NRF2/KEAP1 EN
PACIENTES CON NEUROPATÍA PERIFÉRICA DIABÉTICA”**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD

P R E S E N T A :

ANGEL SAUL ALMAGUER BLANCO

Director de tesis: Dra. en C. Martha Angélica Quintanar Escorza.

Co – Director: Dr en C. Jorge Alberto Burciaga Nava.

Asesor: Dra. en C. Rosa Eréndira Sierra Puente.

Asesor: Dra. en M. Alicia López Betancourt.

VICTORIA DE DURANGO, DGO., FEBRERO 2019



DR. EN C. JUAN HUMBERTO DIAZ GARCÍA
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
LA FACULTAD DE MEDICINA Y NUTRICIÓN
UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO

P R E S E N T E.-

At'n. Dr. en C. Martha A. Quintanar Escorza
Coordinador de la Maestría en Ciencias de la Salud

Por medio del presente nos dirigimos a usted de la manera más atenta con la finalidad de informarle que hemos revisado y aprobado el documento de Tesis titulado: **"EFECTO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE LA RESPUESTA ANTIOXIDANTE EN LA ACTIVACIÓN DE NRF2/KEAP1 EN PACIENTES CON NEUROPATÍA PERIFÉRICA DIABÉTICA"** que ha desarrollado e **M.C ÁNGEL SAÚL ALMAGUER BLANCO**, como proyecto para obtener el **Grado de Maestro en Ciencias de la Salud**. Por lo cual los abajo firmantes autorizamos que la interesada inicie sus trámites de titulación.

Sin más por el momento, nos despedimos de usted no sin antes agradecerle todas las atenciones recibidas.

ATENTAMENTE

Victoria de Durango, Dgo., a 20 de diciembre del 2018.

Dra. en C. Martha Angélica Quintanar Escorza
Director de tesis

Dr. en C. Jorge Alberto Burciaga Nava
Co-Director de tesis

Dra. en C. Rosa Eréndira Sierra Puente
Asesor

Dra. en M. Alicia López Betancourt
Asesor



**DR. en C. JUAN HUMBERTO DIAZ GARCIA
JEFE DE LA DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E
INVESTIGACION DE LA FACULTAD DE MEDICINA Y NUTRICIÓN
UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO**

P R E S E N T E .-

Me es grato comunicarle que después de revisar cuidadosamente y de discutir mis sugerencias y correcciones al documento de tesis titulado **"EFECTO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE LA RESPUESTA ANTIOXIDANTE EN LA ACTIVACIÓN DE NRF2/KEAP1 EN PACIENTES CON NEUROPATÍA PERIFÉRICA DIABÉTICA"** para obtener el grado presenta el alumno **Ángel Saúl Almaguer Blanco**, inscrito en la Maestría en Ciencias de la Salud, considero que la Tesis reúne los requisitos establecidos y por ello emito mi **VOTO APROBATORIO** para que se proceda a la impresión oficial del documento y se realice la réplica oral.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

A T E N T A M E N T E ,

Victoria de Durango, Dgo., a 22 de Enero del 2019.

Dr. en C. Miguel Arturo Reyes Romero



DR. en C. JUAN HUMBERTO DIAZ GARCIA
JEFE DE LA DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E
INVESTIGACION DE LA FACULTAD DE MEDICINA Y NUTRICIÓN
UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO

P R E S E N T E . -

Me es grato comunicarle que después de revisar cuidadosamente y de discutir mis sugerencias y correcciones al documento de tesis titulado **"EFECTO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE LA RESPUESTA ANTIOXIDANTE EN LA ACTIVACIÓN DE NRF2/KEAP1 EN PACIENTES CON NEUROPATÍA PERIFÉRICA DIABÉTICA"** para obtener el grado presenta el alumno **Àngel Saúl Almaguer Blanco**, inscrito en la Maestría en Ciencias de la Salud, considero que la Tesis reúne los requisitos establecidos y por ello emito mi **VOTO APROBATORIO** para que se proceda a la impresión oficial del documento y se realice la réplica oral.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

A T E N T A M E N T E ,

Victoria de Durango, Dgo., a 22 de Enero del 2019.

Dra. en C. Rosa Eréndira Sierra Puente.



DR. en C. JUAN HUMBERTO DIAZ GARCIA
JEFE DE LA DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E
INVESTIGACION DE LA FACULTAD DE MEDICINA Y NUTRICIÓN
UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO

P R E S E N T E.-

Me es grato comunicarle que después de revisar cuidadosamente y de discutir mis sugerencias y correcciones al documento de tesis titulado **"EFECTO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE LA RESPUESTA ANTIOXIDANTE EN LA ACTIVACIÓN DE NRF2/KEAP1 EN PACIENTES CON NEUROPATÍA PERIFÉRICA DIABÉTICA"** para obtener el grado presenta el alumno **Ángel Saúl Almaguer Blanco**, inscrito en la Maestría en Ciencias de la Salud, considero que la Tesis reúne los requisitos establecidos y por ello emito mi **VOTO APROBATORIO** para que se proceda a la impresión oficial del documento y se realice la réplica oral.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

A T E N T A M E N T E ,

Victoria de Durango, Dgo., a 22 de Enero del 2019.

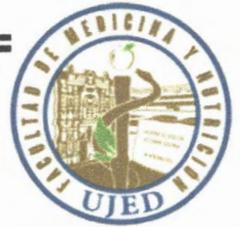
Dra. en C. Claudia Isela Avitia Domínguez



UNIVERSIDAD JUÁREZ DEL ESTADO DE DURANGO

FACULTAD DE MEDICINA Y NUTRICIÓN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN



**“EFECTO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE LA RESPUESTA
ANTIOXIDANTE EN LA ACTIVACIÓN DE NRF2/KEAP1 EN
PACIENTES CON NEUROPATÍA PERIFÉRICA DIABÉTICA”**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD

P R E S E N T A :

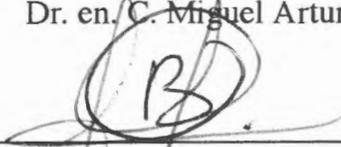
ANGEL SAUL ALMAGUER BLANCO

QUE SOMETE A CONSIDERACIÓN DEL H. JURADO EXAMINADOR COMO
REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO DE

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD

Presidente: 

Dr. en. C. Miguel Arturo Reyes Romero

Secretario: 

Dra. en C. Rosa Eréndira Sierra Puente

Vocal: 

Dra. en C. Claudia Isela Avitia Domínguez

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por Su amable Bondad y Sabiduría, por las experiencias y circunstancias que han dado fruto a este presente.... Por el privilegio de lograr uno de los pasos mas importantes de mi carrera.

Gracias a la Doctora Martha Quintanar Escorza.... Por su apoyo, amable guía, confianza, paciencia y amistad; por nunca perder la fe en mi, ayudándome a vencer cada miedo, cada meta que se presentaba.

Gracias, Doctora, por compartir su privilegiada experiencia, consejos y conocimiento. Por permitirme la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo e investigación.

Un reconocimiento muy especial para el Dr. Reinaldo Milla Villeda, sin cuyo entusiasmo y deseo de situar a nuestro querido Durango en el mapa de los nuevos descubrimientos, nada de esto hubiera sido posible.

Gracias a mis sinodales, Dra. Claudia Avitia, al Dr. Arturo Reyes, Dr. Jorge Burciaga, Dra. Alicia Betancourt y a la Dra. Rosa Eréndira Sierra, por sus oportunas y valiosas observaciones que me ayudaron a perfeccionar el trabajo de tesis.

Agradezco profunda y sinceramente a CONACYT por la beca para la realización de este proyecto.

Numero de becario: 623135.

DEDICATORIA

A mi Padre y a mi Madre, por su amor, apoyo incondicional, su paciencia, comprensión y por estar siempre ahí en los peores momentos, en las alegrías de cada meta superada, por brindarme una cálida sonrisa en cada día que Dios me permite ser mejor para ellos y para las personas que me rodean.

RESUMEN

Introducción: La neuropatía periférica es una complicación frecuente de la DM2 y en la misma el estrés oxidativo. La hiperglucemia, productos de la glucosilación avanzada y otras anormalidades metabólicas, son capaces de inducir disfunción macro y micro vascular. Los productos de la oxidación lipídica, inducida por concentraciones submicromolares de ozono, podrían provocar una respuesta adaptativa, favoreciendo el eustrés oxidativo, principalmente a través de la activación transcripcional de Nrf2, protegiendo a las células de próximos eventos de estrés oxidativo. **Material y Métodos:** Estudio, cuasi-experimental, longitudinal, prospectivo, comparativo. La neuropatía periférica diabética se clasificó con el instrumento modificado "Neuropathy Michigan Score". El estado oxidativo en plasma, se evaluó mediante la cuantificación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico, la capacidad antioxidante, sistema ABTS/peroxidasa. La actividad de unión entre Nrf2 con ARE se determinó mediante el kit TransAM Nrf2. Se administró ozono por insuflación rectal (27 ug/mL) en 12 sesiones. **Resultados:** Se valoraron un total de 25 participantes. Los pies, y los muslos representaron el 92% de los sitios con mayor afección, predominando síntomas como el ardor, dolor, punzadas, adormecimiento y calambres. Después del tratamiento con ozono se observó una disminución sintomatológica estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$). Al inicio del tratamiento, en los pacientes diagnosticados con neuropatía periférica diabética moderada (68%) y en descontrol glicémico, se observó una capacidad antioxidante igual a 0.253 ± 0.007 en equivalentes de Trolox (mM), un daño oxidativo igual a, 0.83 ± 0.17 nmoles MDA/mL y una actividad de Al finalizar el tratamiento con ozono, la capacidad antioxidante se mantiene y el daño oxidativo disminuye (0.249 ± 0.007 en equivalentes de Trolox (Mm), 0.76 ± 0.11 nmoles MDA/mL respectivamente, ($p < 0.05$). **Conclusiones.** El tratamiento con ozono en los pacientes con neuropatía periférica diabética disminuye la gravedad de los síntomas presentes y el daño oxidativo. Nuestros resultados sugieren que los pacientes llegan a un estado de eustrés oxidativo gracias a la activación del complejo proteínico Keap1/Nrf2 generando una mayor capacidad antioxidante que evita el daño oxidativo.

ABSTRACT

Introduction: Peripheral neuropathy is a frequent complication of DM2 and in it oxidative stress. Hyperglycemia, products of advanced glycosylation and other metabolic abnormalities, are capable of inducing macro and micro vascular dysfunction. The products of lipid oxidation, induced by submicromolar concentrations of ozone, could provoke an adaptive response, favoring the oxidative eustress, mainly through the transcriptional activation of Nrf2, protecting the cells from upcoming oxidative stress events. Material and Methods: Study, quasi-experimental, longitudinal, prospective, comparative. Diabetic peripheral neuropathy was classified with the modified instrument "Neuropathy Michigan Score". The oxidative state in plasma was evaluated by quantifying thiobarbituric acid reactive species, antioxidant capacity, ABTS / peroxidase system. The binding activity between Nrf2 with ARE was determined by the TransAM Nrf2 kit. Ozone was administered by rectal insufflation (27 ug / mL) in 12 sessions. Results: A total of 25 participants were evaluated. The feet, and the thighs represented 92% of the sites with greater affection, predominating symptoms such as burning, pain, stinging, numbness and cramps. After treatment with ozone a statistically significant symptomatic decrease was observed ($p \leq 0.05$). At the beginning of the treatment, in the patients diagnosed with moderate diabetic peripheral neuropathy (68%) and in glycemic control, an antioxidant capacity equal to 0.253 ± 0.007 in equivalents of Trolox (mM), an oxidative damage equal to 0.83 ± 0.17 was observed. nmoles MDA / mL and an activity of At the end of the treatment with ozone, the antioxidant capacity is maintained and the oxidative damage decreases (0.249 ± 0.007 in equivalents of Trolox (Mm), 0.76 ± 0.11 nmoles MDA / mL respectively, ($p < 0.05$ CONCLUSIONS: Ozone treatment in patients with diabetic peripheral neuropathy decreases the severity of present symptoms and oxidative damage. Our results suggest that patients reach a state of oxidative eustress thanks to the activation of the protein complex Keap1 / Nrf2. generating a greater antioxidant capacity that prevents oxidative damage.

III INDICE GENERAL

	RESUMEN	I
	ABSTRACT	II
	ÍNDICE GENERAL	III
	ÍNDICE DE FIGURAS	VII
	ÍNDICE DE CUADROS Y TABLAS	X
	ABREVIATURAS	XI
I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	MARCO TEORICO	2
2.1.	Diabetes mellitus	2
2.1.1.	La diabetes según el ADA	2
2.1.1.1.	Diabetes tipo 1	2
2.1.1.2	Diabetes mellitus tipo 2	3
2.1.1.3	Diabetes gestacional	3
2.1.2.	Factores de riesgo para desarrollar diabetes	4
2.1.2.1.	Factores de riesgo y su asociación con los diferentes tipos de diabetes	5
2.1.3.1.	Diabetes en América del Norte	6
2.1.3.2.	Mortalidad	7
2.1.3.3.	Gastos sanitarios	7
2.1.3.4.	Diabetes en México	8
2.1.4	Diagnóstico de la diabetes	9
2.1.4.1.	Criterios diagnósticos para diabetes (ADA 2018)	9
2.2.	Complicaciones de la diabetes mellitus	10
2.2.1.	Lesiones nerviosas (neuropatía) y pie diabético	11
2.2.2.	Patogénesis de la neuropatía diabética periférica.	13
2.2.3.	Factores metabólicos	13
2.2.3.1.	Productos de glucosilación avanzada	14
2.2.3.2.	La vía de polioles y la ATPasa de Na ⁺ /K ⁺	15

2.2.3.3.	Alteraciones hemodinámicas y estrés oxidativo	16
2.2.4.	Clasificación de la neuropatía periférica diabética.	18
2.2.5.	Signos y síntomas de la neuropatía periférica diabética.	18
2.2.6.	Diagnóstico de la neuropatía periférica	19
2.2.7.	Tratamiento de la neuropatía periférica diabética	20
2.3.	Diabetes y estrés oxidativo.	22
2.3.1.	Mecanismos implicados en el daño oxidativo y la diabetes mellitus.	23
2.3.1.1.	El metabolismo de la glucosa y la formación de especies reactivas de oxígeno.	23
2.3.2.	Mecanismos de defensa antioxidante.	24
2.4.	Nrf2, factor de transcripción que responde a estrés oxidativo.	27
2.4.1.	Regulación de Nrf2	29
2.4.2.	Nrf2 y la neuropatía diabética periférica	30
2.5.1.	Ozono	32
2.5.2.	Consideraciones y antecedentes.	32
2.5.3.	Principios básicos en ozonoterapia.	34
2.5.4.	Aplicaciones de la ozonoterapia	35
III	JUSTIFICACIÓN	36
IV	HIPÓTESIS	37
V	OBJETIVOS	38
5.1.	Objetivo principal	38
5.2.	Objetivos secundarios	38
VI	MATERIALES Y MÉTODOS	39
6.1.	Diseño del Estudio	39
6.2.	Lugar y Tiempo	39
6.3.	Población participante	39
6.4.	Criterios de inclusión	40

6.5.	Criterios de exclusión	40
6.6.	Criterios de eliminación	40
6.7.	Calculo de Muestra	41
6.8.	Variables	42
6.9.	Procedimiento	44
6.10.	Toma de muestras biológicas	45
6.11.	Determinación de daño oxidativo a lípidos en plasma, (Lipoperoxidación)	46
6.12.	Capacidad Antioxidante Total en plasma (Sistema ABTS- peroxidasa)	47
6.13.	Extracción de ADN mediante CTAB/DTAB	48
6.14.	Determinación de Nrf2/ARE con TransAM Nrf2 Kit	48
VII	PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN.	49
VIII	ASPECTOS ÉTICOS	50
IX	RESULTADOS	51
9.1.	Clasificación en función al grado de la neuropatía periférica diabética antes y después del tratamiento.	52
9.1.1.	Sitios de mayor afectación de la neuropatía diabética periférica en la población	53
9.2.	Tipo e intensidad de los síntomas.	53
9.2.1.	Tipo e intensidad de los síntomas en pacientes con adecuado control glicémico	55
9.2.2.	Tipo e intensidad de los síntomas en pacientes en descontrol glicémico	56
9.2.3.	Dificultad de realización de actividades cotidianas	57
9.2.4.	Dificultad de realización de actividades cotidianas en pacientes con adecuado control glicémico	58
9.2.5.	Dificultad de realización de actividades cotidianas en pacientes con descontrol glicémico	59

9.3.	Marcadores de estrés oxidativo, capacidad antioxidante y actividad de unión Nrf2/ARE en los participantes.	60
9.3.1	Daño oxidativo y capacidad antioxidante en base al grado de severidad de la neuropatía periférica diabética en pacientes con descontrol y control glicémico	61
9.4.	Daño oxidativo y el grado de severidad de la neuropatía periférica diabética en pacientes con descontrol y control glicémico	63
9.4.1.	Capacidad antioxidante y el grado de severidad de la neuropatía periférica diabética en pacientes con descontrol y control glicémico.	64
9.4.2.	Nrf2/ARE y el grado de severidad de la neuropatía periférica diabética, en pacientes con descontrol y control glicémico	65
9.5.	Lipoperoxidación y componentes del síndrome metabólico en pacientes con descontrol y control glicémico	66
9.5.1.	Lipoperoxidación y componentes del síndrome metabólico en pacientes con descontrol y control glicémico.	67
9.5.2.	Capacidad antioxidante y componentes del síndrome metabólico en pacientes con descontrol y control glicémico.	68
9.6.	Unión de Nrf2/ARE y componentes del síndrome metabólico en pacientes con descontrol y control glicémico.	70
9.7.	Correlación de las variables de estudio.	72
X	DISCUSIÓN	73
XI	CONCLUSIONES	80
XII	PERSPECTIVAS	81
XIII	BIBLIOGRAFÍA	82
	ANEXOS	90

INDICE DE FIGURAS

Figura No. 1	Esquema que resume la patogénesis de la neuropatía	17
Figura No. 2	Manifestaciones clínicas de neuropatía diabética	18
Figura No. 3	Esquema que describe la diabetes produce altas concentraciones de glucosa que afectan la membrana bilipídica de múltiples tejidos en el organismo	31
Figura No. 4	Clasificación de la severidad de la neuropatía diabética, en los participantes del estudio	53
Figura No. 5	Diagrama de cajas y bigotes de los síntomas cardinales de la neuropatía diabética periférica en la totalidad de la población	54
Figura No. 6	Diagrama de cajas y bigotes de los síntomas cardinales de la neuropatía diabética periférica con adecuado control glicémico	55
Figura No. 7	Diagrama de cajas y bigotes de los síntomas cardinales de la neuropatía diabética periférica en descontrol glicémico	56
Figura No. 8	Diagrama de cajas y bigotes, dificultad de realización de actividades cotidianas en la totalidad de la población.	57
Figura No. 9	Diagrama de cajas y bigotes, dificultad de realización de actividades cotidianas en pacientes con adecuado control glicémico	58
Figura No. 10	Diagrama de cajas y bigotes, dificultad de realización de actividades cotidianas en pacientes con descontrol glicémico.	59

Figura No. 11	Daño oxidativo y capacidad antioxidante en base al grado de severidad de la neuropatía periférica diabética en la población.	62
Figura No. 12a 12b	Daño oxidativo y capacidad antioxidante en base al grado de severidad de la neuropatía periférica diabética en población con descontrol y control glucémico.	62
Figura No. 13	Comparación de lipoperoxidación y la severidad de la neuropatía periférica diabética entre pacientes con adecuado control glicémico vs descontrol glicémico.	63
Figura No. 14	Comparación de la capacidad antioxidante y la severidad de la neuropatía periférica diabética entre pacientes con adecuado control glicémico vs descontrol glicémico	64
Figura No. 15	Comparación de la actividad de unión con Nrf2/ARE y la severidad de la neuropatía periférica diabética entre pacientes con adecuado glicémico vs descontrol glicémico.	65
Figura No. 16	Lipoperoxidación y componentes del síndrome metabólico, en pacientes con adecuado control glicémico.	66
Figura No. 17	Lipoperoxidación y componentes del síndrome metabólico, en pacientes con descontrol glicémico.	67
Figura No. 18	Capacidad antioxidante y componentes del síndrome metabólico, en pacientes con adecuado control glicémico.	68

Figura No. 19	Capacidad antioxidante y componentes del síndrome metabólico, en pacientes con descontrol glicémico.	69
Figura No. 20	Unión de Nrf2/ARE y componentes del síndrome metabólico en población, en pacientes con adecuado control glicémico.	70
Figura No. 21	Unión de Nrf2/ARE y componentes del síndrome metabólico en población, en pacientes con descontrol glicémico.	71
Figura No. 22	Correlación entre la hemoglobina glicosilada % y lipoperoxidación en plasma, nmol MDA/ml.	72
Figura No. 23	Severidad de la neuropatía periférica y el estatus antioxidante ante el ozono.	79

ÍNDICE DE CUADROS Y TABLAS

Tabla No. 1.	Características de la población.	51
Tabla No. 2.	Características químico clínicas de la población de estudio.	52
Tabla No. 3.	Comparación de la severidad de los principales síntomas antes y después del tratamiento con ozono	54
Tabla No. 4.	Comparación de la severidad de los principales síntomas antes y después del tratamiento con ozono en pacientes con adecuado control glicémico	55
Tabla No. 5.	Comparación de la severidad de los principales síntomas antes y después del tratamiento con ozono en pacientes con descontrol glicémico	56
Tabla No. 6.	Comparación de las actividades cotidianas antes y después del tratamiento con ozono	57
Tabla No. 7.	Comparación de las actividades cotidianas antes y después del tratamiento con ozono en pacientes con adecuado control glicémico	58
Tabla No. 8.	Comparación de las actividades cotidianas antes y después del tratamiento con ozono en pacientes con descontrol glicémico	59
Figura No. 9	Marcadores de estrés oxidativo, capacidad antioxidante y actividad de unión Nrf2/ARE en los participantes.	60

ABREVIATURAS

4-HHE	4-hidroxihexenal
4-HNE	4-hidroxinonenal
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADTC	Antidepresivos tricíclicos
AGA	Glucemia en ayunas
AIC	Hemoglobina glucosilada
ALAD	Asociación Latinoamericana de Diabetes
ARE	Antioxidant response element
ATG	Alteraciones de la tolerancia a la glucosa
ATP	Adenosín trifosfato
ATP III	National cholesterol education program adult treatment panel iii
CAD	Cetoacidosis diabética
CAT	Catalasa
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
DAR	Deshidroascorbato reductasa
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DMG	Diabetes mellitus gestacional
DN	Neuropatía diabética
EAP	Enfermedad arterial periférica
EC	Enfermedad coronaria
EHH	Estado hiperosmolar hiperglucémico
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
ERO	Especies reactivas de oxígeno
EVC	Enfermedad cardiovascular
G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa

GST	Glutación sulfhidril transferasa
H ₂ O	Agua
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HO-1	Hemo-oxigenasa
IDF	International Diabetes Federation
IDPc	Isocitrato deshidrogenasa citosólica
IMC	Índice de Masa Corporal
ISRSN	Inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina y noradrenalina
Keap1	Kelch-like ECH- associated protein 1
Maf	Muscle aponeurotic fibrosarcoma
MDA	Malondialdehido
NAC	Región de América del Norte y el Caribe
NAPDH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NDD	Neuropatía Distal Diabética
NHANES	National Health and Nutrition Examination Survey
Nrf2	Factor nuclear de transcripción eritroide de tipo 2
O ₂ -	Radical superóxido
OH	Radical hidroxilo
PaO ₂	Presión parcial de oxígeno
PGA	Productos de glucosilación avanzada
PKC	Proteinquinasa C
PSD	Polineuropatía simétrica distal
-SH	Grupo sulfhidrilo
SM	Síndrome metabólico
SOD	Superóxido dismutasa
SSTTM	Vacutainer para suero con gel separador
TR	Tiorreductasa

I. INTRODUCCION

El término diabetes mellitus define alteraciones metabólicas de múltiples etiologías caracterizadas por hiperglucemia crónica y trastornos en el metabolismo de los hidratos de carbono, las grasas y las proteínas, resultado de defectos en la secreción de insulina, en la acción de la misma o en ambas. La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica crónica y compleja que puede originar múltiples complicaciones micro y macrovasculares en órganos blanco, así como neuropatías. En México, la diabetes mellitus afecta al 8% de la población adulta fluctuando entre 6.5 y 10 millones de personas, con una incidencia de 400 mil nuevos casos por año. La neuropatía periférica diabética es una neuropatía sensitivo motora simétrica que afecta predominantemente a extremidades inferiores y que se caracteriza por quemazón, dolor punzante, sensación de hormigueo y analgesia total o parcial. La hiperglicemia se ha relacionado consistentemente con el estrés oxidativo y con la degeneración neural que ocurre en la neuropatía. Se ha demostrado que un control estricto de la glicemia reduce en un 60% la incidencia de neuropatía, sin embargo, aun con un excelente control glicémico por períodos largos, su incidencia es de 20%. El paciente con neuropatía periférica diabética está obligado a un tratamiento multidisciplinario riguroso, con gran afectación del estilo de vida además del aumento del costo de mantenimiento terapéutica. Los productos de la oxidación lipídica, inducida por concentraciones submicromolares de ozono, podrían provocar una respuesta adaptativa, favoreciendo el eustrés oxidativo, principalmente a través de la activación transcripcional de Nrf2, protegiendo a las células de próximos eventos de estrés oxidativo y mejorando la sintomatología del paciente. En este proyecto se evaluó la respuesta antioxidante ante la agresión de un oxidante, como es el ozono, esclareciendo los posibles mecanismos de adaptabilidad celular implicados en la mejoría sintomatológica de los pacientes sometidos a esta terapia coadyuvante.

II. MARCO TEORICO

2.1. Diabetes mellitus

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica grave que sobreviene cuando el páncreas no produce suficiente insulina (hormona que regula la glucemia) o cuando el organismo no puede usar eficazmente la insulina que produce. Las concentraciones de glucosa plasmática anormalmente altas (hiperglucemia), consecuencia común de la diabetes mellitus mal controlada, pueden, a la larga, lesionar gravemente el corazón, los vasos sanguíneos, los ojos, los riñones y los nervios. La OMS reporta que más de 400 millones de personas padecen diabetes mellitus (1).

Por crónica degenerativa se entiende que la diabetes mellitus es una enfermedad que no es curable, que si no es diagnosticada y tratada de manera oportuna, adecuada, integral y se mantiene un buen control de la misma, puede afectar a los demás órganos y altera las funciones metabólicas normales del organismo, ocasionando un deterioro anormal o prematuro. Esto ocasiona una serie de complicaciones de gran costo e impacto en la salud de la persona, así como discapacidad o muerte (2).

2.1.1. La diabetes según el ADA clasifica en:

2.1.1.1. Diabetes mellitus tipo 1

Es causada por una reacción autoinmunitaria en la que el sistema autoinmunitario del organismo ataca las células beta, productoras de insulina, que se encuentran en los islotes pancreáticos. Como resultado, el organismo produce poca o ninguna insulina, provocando una deficiencia relativa o absoluta de dicha hormona. Las causas de este proceso destructivo no se entienden plenamente, pero se sabe que los factores implicados son una combinación

genética y/o medioambientales, como infecciones virales, toxinas o algunos factores dietéticos (3).

Esta enfermedad puede desarrollarse a cualquier edad, pero la diabetes mellitus tipo 1 suele aparecer con más frecuencia en niños o adolescentes.

2.1.1.2 Diabetes mellitus tipo 2

La diabetes mellitus tipo 2 es la forma más frecuente de diabetes, y representa alrededor del 90% del total de casos de dicha afección. En la diabetes mellitus tipo 2, la hiperglucemia es el resultado de una producción inadecuada de insulina y la incapacidad del organismo de responder plenamente a dicha hormona, que se define como resistencia a la insulina.

Durante un estado de resistencia a la insulina, ésta es ineficaz y, por lo tanto; en un principio se dispara la producción de insulina a fin de reducir el aumento de los niveles de glucosa, pero con el tiempo puede desarrollarse un estado de producción relativamente inadecuada de insulina. La diabetes mellitus tipo 2 se ve con más frecuencia en adultos mayores, pero aparece cada vez con más frecuencia en niños, adolescentes y jóvenes adultos debido al aumento de los niveles de obesidad, a la falta de actividad física y a las deficiencias de la dieta (4).

2.1.1.3 Diabetes mellitus gestacional

La hiperglucemia que se detecta por primera vez durante el embarazo se clasifica como diabetes mellitus gestacional (DMG) o bien diabetes mellitus en el embarazo. Se calcula que la mayoría de los casos (75–90%) de hiperglucemia durante el embarazo son diabetes gestacional. La DMG es un tipo de diabetes que suele afectar a las mujeres embarazadas durante el segundo y tercer trimestre del embarazo, aunque puede darse en cualquier momento del mismo. (1).

2.1.2. Factores de riesgo para desarrollar diabetes

Síndrome metabólico como factor de riesgo.

El síndrome metabólico (SM) es un conjunto de anomalías metabólicas consideradas como un factor de riesgo para desarrollar enfermedad cardiovascular y diabetes.

Se ha descrito a la insulinoresistencia como el pilar para el desarrollo de las alteraciones que conforman el mismo, como son; el aumento de la presión arterial, elevación de la glicemia de ayunas, aumento de triglicéridos, disminución del colesterol HDL, así como una condición de obesidad abdominal. La relación entre obesidad abdominal e insulinoresistencia, ha sugerido a la primera como origen o factor desencadenante del síndrome (5).

Las definiciones propuestas por el *National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III* (ATP III) y la C (IDF) son las más utilizadas en las diferentes publicaciones; sin embargo, se han realizado actualizaciones para diferentes poblaciones según la etnia y ubicación geográfica, como es el caso de la Asociación Latinoamericana de Diabetes (ALAD), que define un perímetro abdominal determinado para la región América Latina (4).

Las adipoquinas producidas por el tejido adiposo abdominal actuarían directa o indirectamente en el desarrollo de los componentes del síndrome.

El síndrome metabólico ha sido considerado un equivalente diagnóstico de prediabetes, por ser predictor de diabetes (4).

2.1.2.1 Factores de riesgo y su asociación con los diferentes tipos de diabetes

Tipo 1. No se conocen con exactitud las causas de la diabetes mellitus tipo 1. La creencia general es que este tipo de diabetes obedece a una interacción compleja entre los genes y factores ambientales, aunque no se ha demostrado que ningún factor ambiental en particular haya causado un número de casos importante. La mayoría de los casos de diabetes de tipo 1 se producen en niños y adolescentes (6).

Tipo 2. El riesgo de diabetes mellitus tipo 2 se ve determinado por la interacción de factores genéticos y metabólicos. Dicho riesgo se eleva cuando factores étnicos, un antecedente de diabetes en la familia y un episodio anterior de diabetes gestacional se combinan con la presencia de edad avanzada, sobrepeso y obesidad, alimentación malsana, falta de actividad física y tabaquismo y/o alcoholismo (1).

Se calcula que el sobrepeso y la obesidad, además de la falta de actividad física, dan origen a una gran proporción de la carga mundial de diabetes. Un perímetro de la cintura aumentado y un mayor índice de masa corporal (IMC) se asocian con un mayor riesgo de diabetes mellitus de tipo 2, aunque puede ser que la relación varíe en distintas poblaciones (7).

Distintas prácticas alimentarias se asocian con un peso malsano, el riesgo de diabetes mellitus de tipo 2 o ambas cosas. Algunas de ellas son el consumo elevado de ácidos grasos saturados, una alta ingesta de grasas y un consumo insuficiente de fibra alimenticia vegetal. El alto consumo de bebidas azucaradas, que en general contienen una gran cantidad de azúcares libres, aumenta la probabilidad de sufrir sobrepeso u obesidad, sobre todo en los niños. Algunos datos recientes apuntan, además, a la presencia de una asociación entre un

consumo elevado de bebidas azucaradas y el riesgo de diabetes mellitus de tipo 2 (4,8).

La nutrición en la primera infancia influye en el riesgo de padecer diabetes mellitus de tipo 2 en etapas posteriores de la vida. Entre los factores que parecen aumentar dicho riesgo figuran el retraso del crecimiento fetal, la insuficiencia ponderal del recién nacido (especialmente si va seguida de un crecimiento rápido de recuperación en el periodo postnatal) y el alto peso al nacer (4).

La diabetes gestacional. Entre los factores y marcadores del riesgo de DMG figuran la edad (mientras más años tiene una mujer en edad reproductiva, más alto es su riesgo de padecer DMG); el sobrepeso o la obesidad; el aumento de peso excesivo durante el embarazo; la presencia de antecedentes familiares de diabetes; el haber padecido DG durante un embarazo previo; el haber tenido un hijo mortinato o con una anomalía congénita; y el exceso de glucosa en la orina durante el embarazo. La diabetes en el embarazo y la DG aumentan el riesgo futuro de obesidad y diabetes mellitus de tipo 2 en la descendencia (9).

2.1.3.1 Diabetes en América del Norte

Prevalencia

Con un 13,0% (de 10,8 a 14,5%) de los adultos de 20 a 79 años afectados, *Región de América del Norte y el Caribe (NAC)* tiene la mayor prevalencia de diabetes en comparación con las otras regiones de la *International Diabetes Federation (FID)*. Se estima que, en el año 2017, 45.9 (38,2 a 51,3) millones de personas padecieron diabetes, de entre 20 y 79 años de edad, de las cuales 17,3 millones (37,6%) no están diagnosticadas.

La gran mayoría de las personas con diabetes viven en zonas urbanas (83,2%). La mayoría de las personas en NAC vive en los EEUU, México y

Canadá, lo que también explica el gran número de personas con diabetes. Más del 92% de los países y territorios de la región tienen un índice de prevalencia comparativa ajustada por edad de diabetes por encima del promedio mundial (4).

En NAC, hay otros 54,4 millones de personas, o el 15,4% de los adultos de 20 a 79 años, que tienen alteración de la tolerancia a la glucosa (ATG), lo que les pone en alto riesgo de desarrollar diabetes mellitus tipo 2. Para 2045, se estima que 62,2 millones de adultos vivirán con diabetes y otros 70,4 millones tendrán ATG (10).

2.1.3.2. Mortalidad

El número total de muertes en la región atribuibles a la diabetes en personas de 20 a 79 años ha sido de 285.926 (14% de toda la mortalidad). Más de la mitad (66,5%) de estas muertes han tenido lugar en países de altos ingresos. Más varones (160,624 [131,257-176,964]) que mujeres (125,302 [109,989-138,221]) han muerto por causas relacionadas con la diabetes en esta región en 2017, y la diferencia es estadísticamente importante. La mortalidad relacionada con la diabetes en NAC no se ha limitado a los grupos de más edad, ya que más de un tercio (36,9%) de las muertes se refieren a adultos menores de 60 años (4).

2.1.3.3 Gastos sanitarios

En 2017, las personas con diabetes en NAC han gastado 377.300 millones de USD en asistencia sanitaria. Esta cifra supera a la de cualquier otra región del mundo, lo que corresponde al 52% del total gastado a nivel mundial, debido principalmente a los 348 millones USD gastados sólo en los EEUU (4).

2.1.3.4 Diabetes en México

México está en la lista de los 10 países con mayor número de personas que viven con diabetes. Los datos de la Encuesta Nacional de Salud 2000 (Ensa 2000), así como de las Encuestas Nacionales de Salud y Nutrición 2006 y 2012 (Ensanut 2006 y 2012), muestran que la diabetes mellitus tipo 2 por diagnóstico médico previo (excluyendo los casos que desconocían su condición) aumentó, de 5.8% en la Ensa 2000,1 a 7.0% en la Ensanut 2006 y a 9.2% en la Ensanut 2012.

Esta última prevalencia representa a poco más de 6.4 millones de personas que se sabían afectadas por la enfermedad en México en 2012. Esta tendencia creciente concuerda con las proyecciones para prevalencia de diabetes diagnosticada a partir de datos de las encuestas nacionales referidas; estimaron que, para 2030, dicha prevalencia alcanzaría de 12 a 18%, y para 2050, de 14 a 22% (11).

El aumento en la prevalencia de diabetes puede deberse al envejecimiento de la población, al incremento en la prevalencia de la obesidad relacionada con cambios en los estilos de vida (aumento en la densidad calórica de la dieta, reducción en la actividad física), así como a cambios en otros factores relacionados con la diabetes (12).

En el 2016, la prevalencia de la diabetes mellitus tipo 2 incrementó relativamente en 31.4% respecto a la de 2006; en los adultos de 40 a 59 años se elevó en 39.6%, y en los de 60 años y más de edad, 38.3% siendo exclusivamente en los adultos de 60 años y más (13.2% relativamente a la de 2012).

La edad en que se está diagnosticando a los individuos con diabetes mellitus tipo 2 aumentó, entre 2000 y 2016, de 47.3 años a 49 años. La prevalencia de

diabetes por diagnóstico médico previo en localidades urbanas es superior que en localidades rurales: 6.2% vs 4.1% en 2000, 7.6% vs 4.8% en 2006, 9.7% vs 7.0% en 2012 y de 9.5% vs 9.2% en 2016, aunque la diferencia ha disminuido a lo largo del tiempo (12).

El 48.1% de las personas con diabetes tiene adicionalmente diagnóstico previo de hipertensión. Esta prevalencia aumenta a 50.4%, si viven en áreas urbanas, y a 60%, si tienen 60 años o más de edad. El 50.4% de las personas con diabetes también tienen diagnóstico médico previo de colesterol alto, que aumenta a 52.6%, si viven en zona rural, y a 55.5%, si tienen entre 40 y 59 años de edad. El 40.4% de las personas con diabetes tienen además obesidad; esta prevalencia aumenta a 49.7% si tienen entre 40 y 59 años de edad (11).

2.1.4 Diagnóstico de la diabetes

2.1.4.1 Criterios diagnósticos para diabetes (ADA 2018)

La diabetes puede ser diagnosticada con base en los niveles de glucosa en plasma, ya sea a través de una prueba rápida de glucosa en plasma o de una prueba de glucosa en plasma 2 horas después de haber ingerido 75 gramos de glucosa vía oral o con una prueba de hemoglobina glucosilada (A1c) (13). Los criterios se muestran en la siguiente lista:

- Glucosa en ayuno ≥ 126 mg/dL (no haber tenido ingesta calórica en las últimas 8 horas).
- Glucosa plasmática a las 2 horas de ≥ 200 mg/dL durante una prueba oral de tolerancia a la glucosa. La prueba deberá ser realizada con una carga de 75 gramos de glucosa disuelta en agua.

- Hemoglobina glucosilada (A1c) $\geq 6.5\%$. Esta prueba debe realizarse en laboratorios certificados de acuerdo a los estándares A1c del DCCT.
- Paciente con síntomas clásicos de hiperglicemia o crisis hiperglucémica con una glucosa al azar ≥ 200 mg/dL.

El *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES) indica que un punto de corte de A1c $\geq 6.5\%$ detecta un tercio más de pacientes con diabetes sin diagnosticar que una prueba de glucosa en ayuno ≥ 126 mg/dL. Es importante tomar en cuenta la edad, raza/etnia y la presencia de anemia o de alguna hemoglobinopatía cuando se usa la A1c para diagnosticar diabetes.

Los estudios epidemiológicos muestran hasta el momento que la A1c es solo útil para adultos, sin embargo; sigue en discusión si debe seguir siendo el mismo punto de corte tanto para adultos como adolescentes y niños (14).

Las alteraciones de la tolerancia a la glucosa (ATG) y de la glucemia en ayunas (AGA) son trastornos intermedios en la transición de una glucemia normal a la diabetes mellitus (sobre todo la de tipo 2), aunque dicha transición no es inevitable. Las personas que padecen ATG o AGA tienen un mayor riesgo de sufrir infartos de miocardio y accidentes cerebrovasculares (2).

2.2. Complicaciones de la diabetes mellitus

Al no controlarse adecuadamente, cualquier tipo de diabetes puede acabar generando complicaciones que afectan a distintas partes del organismo, lo que resulta en hospitalizaciones frecuentes y muerte prematura. Las personas con diabetes corren un mayor riesgo de desarrollar una serie de graves problemas de salud potencialmente letales, aumentando los costos de la atención sanitaria y disminuyendo la calidad de vida. Los niveles de glucemia persistentemente altos causan lesiones vasculares generalizadas, que afectan al corazón, la vista, los

riñones y los nervios. La diabetes es una de las principales causas de enfermedad cardiovascular (ECV), ceguera, insuficiencia renal y amputación de miembros inferiores (4).

Durante el embarazo, una diabetes mal controlada aumenta el riesgo de complicaciones maternas y fetales. No existen estimaciones mundiales detalladas sobre complicaciones de origen diabético, pero, donde se dispone de datos (principalmente en países de altos ingresos), la prevalencia y la incidencia varían enormemente entre países (9).

Las complicaciones diabéticas se pueden dividir en complicaciones agudas y crónicas. Las complicaciones agudas incluyen hipoglucemia, cetoacidosis diabética (CAD), estado hiperosmolar hiperglucémico (EHH), coma diabético hiperglucémico, convulsiones o pérdida de conciencia e infecciones. Las complicaciones microvasculares crónicas son la nefropatía, la neuropatía y la retinopatía, mientras que las complicaciones macrovasculares crónicas son la enfermedad coronaria (EC) que conduce a la angina o el infarto de miocardio, la enfermedad arterial periférica (EAP) que contribuye al accidente cerebrovascular, la encefalopatía diabética y el pie diabético. Además, la diabetes también se ha asociado a un aumento de los índices de cáncer, (15) discapacidad física y cognitiva, tuberculosis (16) y depresión (17).

2.2.1 Lesiones nerviosas (neuropatía) y pie diabético

La neuropatía diabética se define como el daño nervioso periférico, somático o autonómico, atribuible sólo a la diabetes mellitus. La neuropatía periférica es primordialmente de tipo sensorial, que inicialmente se presenta en la región distal de las extremidades inferiores (18).

Un alto nivel de glucosa en sangre puede causar daño a los nervios de todo el organismo. El daño nervioso puede ser bastante importante y hacer que otras lesiones pasen desapercibidas, lo que provoca ulceración, infecciones

graves y, en algunos casos, amputación. La neuropatía diabética es una alteración de la actividad normal de los nervios de todo el organismo y puede alterar las funciones autonómicas, motoras y sensoriales (4).

La neuropatía periférica es la forma más común de neuropatía diabética y afecta a los nervios distales de las extremidades, particularmente los de los pies. Altera principalmente la función sensorial simétricamente, causando sensaciones anormales y entumecimiento progresivo. La neuropatía también puede conducir a la disfunción eréctil, así como a problemas digestivos y urinarios, además de algunos otros problemas, como la disfunción autonómica cardíaca (19).

Su prevalencia aumenta con el tiempo de evolución de la enfermedad y con la edad del paciente, relacionándose su extensión y gravedad con el grado y duración de la hiperglucemia (20).

Aproximadamente 30 millones de pacientes en todo el mundo sufren alguna forma de ND, la complicación más frecuente tanto de la diabetes mellitus tipo 1 como del tipo 2, por lo que el padecimiento se considera un importante problema de salud pública. La ND está presente en un 40 a 50% después de 10 años del comienzo de la enfermedad, tanto en los tipo 1 como en los tipo 2, aunque menos del 50% de estos pacientes presentan síntomas (20).

En México, se ha reportado que el 60% de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 presentan alguna forma de neuropatía diabética y su frecuencia depende de la duración de la diabetes (18).

El diagnóstico es clínico, no hay necesidad de realizar estudios electrofisiológicos cuando la historia y los hallazgos físicos son consistentes con el diagnóstico de ND (21).

2.2.2. Patogénesis de la neuropatía diabética periférica.

Si bien la hiperglucemia y la deficiencia de insulina son consideradas importantes promotores de ND, el desorden probablemente resulte de una serie compleja de interacciones metabólicas, vasculares y neurotróficas. En primer término, las alteraciones metabólicas inician el daño crónico con la subsecuente pérdida axonal de fibras provistas o no de mielina. A mediano y largo plazo el resultado es la aparición de polineuropatía sistémica distal (PSD).

Los estudios en los que se ha intentado dilucidar la participación de éstos y otros factores, tropiezan con la dificultad de que los nervios periféricos son tejidos de organización histológica sumamente compleja (compuestos por fibras con y sin revestimiento de mielina) y por el hecho de que las fibras nerviosas están embebidas en una matriz en la que son importantes muchas otras estructuras (células de Schwann, microvasos endoneurales y perineurales, así como arteriolas epineurales) (19).

2.2.3. Factores metabólicos

En base a la evidencia disponible es posible deducir que las intervenciones terapéuticas que mejoran el control metabólico pueden modificar la historia natural de la ND. De manera similar se ha postulado que las estrategias destinadas a corregir las alteraciones fisiopatológicas que provocan lesión tisular en pacientes diabéticos, pueden influir en la expresión clínica de las complicaciones de la enfermedad.

Existen excelentes revisiones a las cuales referirse para descripciones detalladas de todos estos mecanismos. A continuación, se enumeran las más importantes:

- Glucosilación de proteínas (22) y lípidos (23).
- Incremento en la actividad de la vía de polioles y alteración funcional de la ATPasa de Na⁺/K⁺ (22).
- Alteraciones hemodinámicas (22).
- Estrés oxidativo (24).

2.2.3.1 Productos de glucosilación avanzada

La formación de productos de glucosilación avanzada (PGA) es un importante promotor de la aparición de complicaciones microvasculares y entre ellas de PSD (25).

Este proceso no enzimático conduce a la asociación de azúcares reductores (glucosa, fructosa o galactosa) con grupos amino libres de proteínas, lípidos o ácidos nucleicos para formar -de manera reversible- productos como bases de Schiff y ketaminas o productos de Amadori, a través de la vía metabólica descrita por Wolf con la acumulación de productos de glucooxidación. (22). Estos productos siguen reordenamiento químico y a través de reacciones de deshidratación, fragmentación y entrecruzamiento para formar PGA irreversibles que se depositan en tejidos periféricos, incluidos los sistemas nervioso central y periférico (26).

Muchas enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica y otras son producidas por fenómenos similares (26).

Para explicar cómo ocurre la lesión luego de formación de PGA se ha postulado que la mielina modificada en este proceso es identificada por macrófagos “carroñeros” que se unen a receptores específicos de PGA. Este fenómeno parece provocar desmielinización segmentaria a través de digestión de proteínas de mielina.

La glucosilación también afecta a otras proteínas del citoesqueleto axonal, como tubulina, neurofilamentos y actina, que una vez alteradas resultan en enlentecimiento de conducción axonal, atrofia y degeneración axonal (27).

2.2.3.2 La vía de polioles y la ATPasa de Na⁺/K⁺

El resultado final, de la activación de esta vía, es la generación de sorbitol y fructosa, con depleción compensatoria de osmolitos como mioinositol y taurina. La depleción del mioinositol está asociada con alteraciones del potencial redox celular y obedece a perturbaciones del metabolismo fosfoinositídico, responsable a su vez de la reducción concomitante de la actividad de la ATPasa de Na⁺/K⁺ que explica en parte las alteraciones tempranas de velocidad de conducción nerviosa. Esto ocurre merced a la participación de un segundo mensajero, la proteinquinasa C (PKC).

Ciertas isoformas de PKC han sido implicadas como mediadores de la disfunción vascular inducida por diabetes. Evidencia experimental ha señalado que el daño tisular puede ser reproducido con activadores de PKC, mientras que ciertos inhibidores enzimáticos han resultado de utilidad para atenuar los efectos de la lesión (28).

Para explicar la actividad deficiente de la ATPasa de Na⁺/K⁺ se han postulado además mecanismos tales como perturbación de la síntesis de óxido nítrico, pseudohipoxia o deficiencia de prostaciclina.

La asociación del estrés oxidativo con activación de la vía de los polioles resulta de la deficiencia de NADPH, que es utilizado en la interconversión de glucosa en sorbitol y fructosa, y por tanto no puede estar disponible para su rol como cofactor en el reciclamiento de glutatión a partir de glutatión oxidado. Algo similar ocurre en la síntesis de óxido nítrico, vía metabólica en la que concurre deficiencia de sintetasa de óxido nítrico, (Figura 1) (28).

2.2.3.3. Alteraciones hemodinámicas y estrés oxidativo

La reducción del flujo sanguíneo endoneural capaz de provocar isquemia es un mecanismo que también ha sido implicado en la patogénesis de PSD.

En biopsias de tejido nervioso humano las consecuencias histopatológicas de estas alteraciones incluyen engrosamiento de la membrana basal vascular, agregación plaquetaria, hiperplasia de células endoteliales y oclusión vascular.

Muchas teorías han sido propuestas para relacionar la vía metabólica de los polioles con la aparición de isquemia vascular, y un área importante en la cual estos dos mecanismos convergen a través del estrés oxidativo (24).

La acumulación de sorbitol se asocia a una variación del potencial redox intracelular, que predispone a la célula a daño por especies reactivas de oxígeno. Adicionalmente, la isquemia induce formación de especies reactivas de oxígeno, que a su vez exacerban la lesión a través de mayor estrés oxidativo.

Funcionalmente, la reducción del volumen circulante está asociada con incremento de la resistencia vascular, disminución de la PaO₂ y perturbación de características de permeabilidad vascular tales como pérdida de la barrera de carga aniónica y disminución de la selectividad de carga.

Existe correlación entre las anomalías del flujo sanguíneo cutáneo y expresión clínica de PSD, (Figura 1) (22).

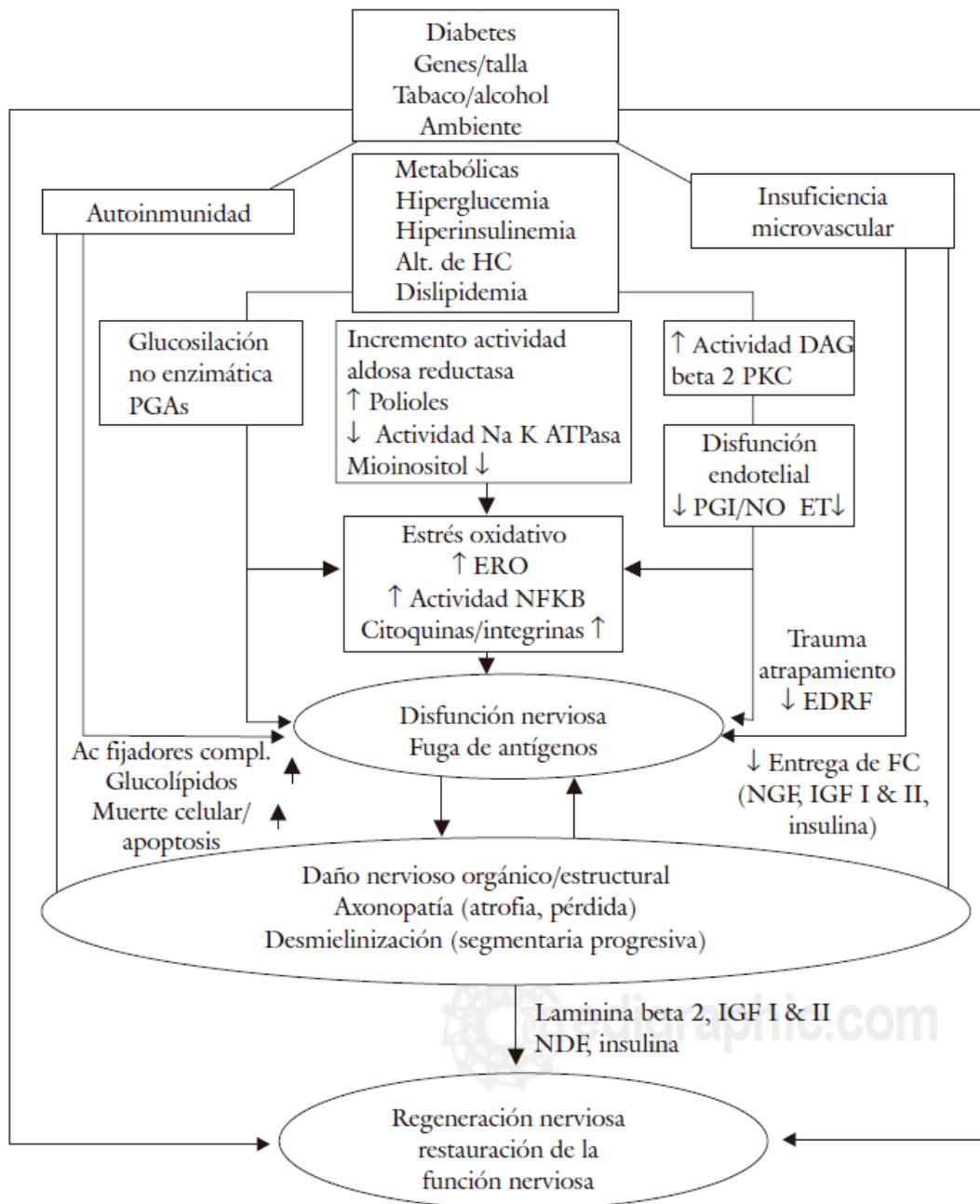
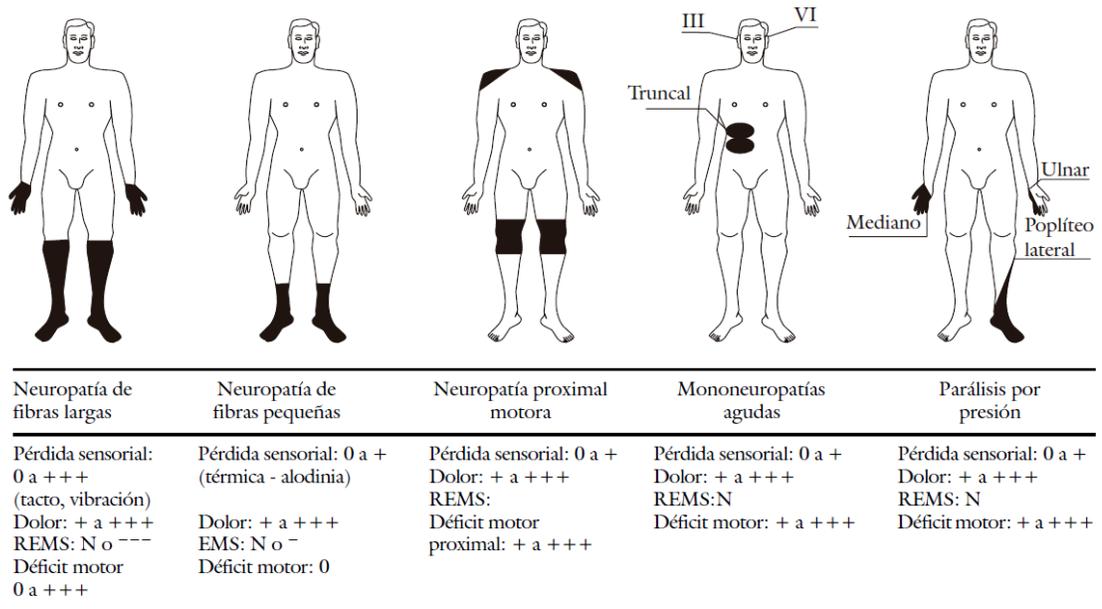


Figura No. 1. Esquema que resume la patogénesis de la neuropatía. PGAs: productos de glucosilación avanzada, PKC: proteinquinasa C, PGI: prostaglandina I, NO: óxido nítrico, EDRF: factor relajador derivado del endotelio; NGF: factor de crecimiento nervioso, IGF: factor de crecimiento de tipo insulínico, ERO: Especies reactivas de oxígeno, NFKB: factor nuclear K B, DAG. Diacilglicerol (19).

2.2.4. Clasificación de la neuropatía periférica diabética.

La ND se ha clasificado de diversas maneras, de acuerdo con las fibras nerviosas afectadas, en motora y sensitiva; en relación con su topografía, en focal y difusa, o por la existencia de síntomas, en sintomática o asintomática (Figura 2). En más de la mitad de los casos, la neuropatía es asintomática y convierte al paciente de forma silenciosa en una víctima de complicaciones devastadoras, algunas veces porque es silente y otras, porque sus manifestaciones heterogéneas son de difícil interpretación (29).

Figura No. 2. Manifestaciones clínicas de neuropatía diabética (19).



2.2.5. Signos y síntomas de la neuropatía periférica diabética.

La sintomatología más frecuente es el dolor, se presenta entre el 54 y el 75% de los pacientes, generalmente con distribución simétrica y distal, en forma de botas o guantes, con característica urente o lancinante, de predominio nocturno y se exagera con el reposo; puede acompañarse de parestesias o disestesias que son expresadas como hormigueos, pinchazos, entumecimiento,

falsa percepción de frío-calor, sensación de caminar sobre algodones. En otras ocasiones, se pueden presentar la hiperalgesia, alodinia (dolor producido por estímulos normalmente no dolorosos) o hipoestesia (29).

2.2.6. Diagnóstico de la neuropatía periférica

En un intento de estandarizar las medidas utilizadas para el diagnóstico de la neuropatía diabética, la Conferencia de San Antonio reconoció cuatro estrategias diferenciadas para establecer dicho diagnóstico: a) medidas clínicas; b) análisis morfológicos y bioquímicos; c) evaluación electrofisiológica; y d) test sensitivos cuantitativos. Los cuestionarios más utilizados son: el *Neuropathy Disability Score* (NDS), *Neuropathy Symptoms Score* (NSS), y *Memphis Neuropathy Instrument* (MNI), que han demostrado ser reproducibles, rápidos de aplicar y con una sensibilidad adecuada para ser utilizados en un programa de cribaje (18).

La utilización de estos cuestionarios permite poner en evidencia la pérdida de síntomas y la aparición de signos compatibles con la presencia de polineuropatía. Dentro de las escalas aceptadas y de uso frecuente para evaluación NDP se encuentra *The Michigan Neuropathy Screening Instrument*, (MNSI).

Este instrumento para la detección de la neuropatía periférica fue validado por Moghtaderi en el 2006 (30), reportando una sensibilidad de 79% y una especificidad de 94%.

Al identificar en forma temprana la neuropatía diabética en el primer nivel de atención se podrá realizar una intervención oportuna en cuanto a su prevención y tratamiento (14).

El ND suele tener un impacto significativo en la calidad de vida de la persona. Frecuentemente es difícil de tratar, porque es resistente a muchas medicaciones, y por los efectos adversos asociados. El control de la DM y de los factores de riesgo asociados, ha demostrado ser capaz de reducir la incidencia de las complicaciones microvasculares.

2.2.7. Tratamiento de la neuropatía periférica diabética

El manejo inicial incluye mejoría en el estilo de vida, control glucémico y tratamiento farmacológico. Se debe mejorar aquello que produzca daño macrovascular, específicamente la hipertensión arterial, la dislipidemia, la obesidad y el tabaquismo. Además, se recomienda el manejo de la depresión, la ansiedad y el insomnio. Se debe hacer énfasis en modificaciones en el estilo de vida, seguimiento de la dieta para diabético y un programa de ejercicio que mejore el flujo sanguíneo arterial, sobre todo en extremidades inferiores (13).

En la atención de nivel primario, los aspectos más importantes del tratamiento son el control de la glucemia (mediante intervenciones no farmacológicas y si es necesario, farmacológicas), los cuidados de los pies, y los medicamentos analgésicos.

Los antiinflamatorios no esteroides pueden alterar la función renal en pacientes diabéticos vulnerables, mediante el mecanismo de inhibición de la síntesis de prostaglandinas. Asimismo, su uso crónico puede causar hemorragia del tubo digestivo, especialmente en ancianos. Los fármacos ibuprofeno (600 mg cuatro veces al día) y sulindaco (200 mg dos veces al día) reducen significativamente las puntuaciones en escalas que miden parestesias en pacientes diabéticos.

Los antiinflamatorios no esteroides no deben utilizarse en monoterapia de la neuropatía diabética. Deben tener un papel adyuvante, para el alivio del dolor en el corto plazo en pacientes con un riesgo bajo de disfunción renal y de hemorragia gastrointestinal que reciban una educación y un monitoreo adecuado sobre efectos adversos

Los antidepresivos tricíclicos (ADTC) son los agentes de primera línea en el tratamiento de la NDD, si bien sus efectos secundarios limitan su uso, e

incluyen xerostomía, constipación, mareo, visión borrosa, retención urinaria (efectos anticolinérgicos); sedación, hipotensión postural (efectos histaminérgicos y α 1-adrenérgicos); arritmias (31).

Hasta una tercera parte de los enfermos no toleran sus efectos secundarios, sobre todo la sedación, lo que obliga a suspenderlos. Los más utilizados son la desipramina, la imipramina y la amitriptilina, a dosis variables (dosis respuesta) y acumulativas (31).

Los inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina y noradrenalina (ISRSN), la duloxetina y la venlafaxina, bloquean a los transportadores de serotonina y noradrenalina, lo que se traduce en una disminución de la percepción del dolor (31).

Los antiepilépticos tienen acción central y periférica y disminuyen la excitabilidad nerviosa. La carbamacepina es el fármaco mejor conocido, empleado para tratar la NDD, en sus efectos adversos (somnolencia, mareo, ataxia). Sin embargo, no existen ensayos clínicos de calidad, sobre su eficacia en la NDD (31).

La gabapentina, a dosis de 900 mg/día hasta 3600 mg/día indujo una disminución del dolor mayor al 50% en el 60% de los pacientes, en comparación con el placebo que produjo este efecto en 33%. La pregabalina, a dosis de 300 a 600 mg/día redujo en 50% o más el dolor en un 39% a 46% de los pacientes, en comparación con el 22% con placebo; esta eficacia fue similar a la obtenida con duloxetina (31).

2.3. Diabetes y estrés oxidativo.

Los avances en el estrés oxidativo y la señalización redox han conducido a definiciones mejoradas para consideraciones de salud y enfermedad. Estrés oxidativo se define en un sentido patológico, mientras que el equilibrio fisiológico entre agentes oxidantes y agentes reductores se denomina eustres oxidativo (32).

Son muchas las enfermedades que se asocian con estrés oxidativo, la diabetes mellitus no es la excepción. Sin embargo, son pocas las enfermedades que cumplen los criterios para considerarse como enfermedad oxidativa. El empleo de diferentes modelos que estudian los efectos del incremento de la concentración de glucosa ha permitido proponer que los procesos oxidativos están involucrados con la patogénesis, la progresión, las complicaciones y el mal pronóstico de la diabetes mellitus (33).

Los datos experimentales son sólidos y a pesar de lo complejo y variado de las reacciones que se inducen debido al incremento de la concentración de glucosa, se han logrado conocer diversos mecanismos de daño que involucran directa o indirectamente oxidantes y en los que participa el estatus antioxidante.

La sobreproducción de especies reactivas de oxígeno producidas por el incremento de la actividad de la cadena transportadora de electrones, la autooxidación de la glucosa, la vía del sorbitol, la glicación de proteínas, los productos de glicación avanzada, el gasto excesivo de cofactores reducidos; aunado a la reducción de las defensas antioxidantes, la capacidad redox de la célula y la capacidad amortiguadora antioxidante, genera un estado prooxidante que condiciona el daño oxidativo a proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y carbohidratos, lo cual puede contribuir en diferentes formas al desarrollo de las diferentes manifestaciones de la enfermedad del paciente diabético.

Sin embargo, a pesar de los avances en modelos y mecanismos de daño, no se ha tenido aún información científica suficientemente sólida para que el tratamiento antioxidante se integre a las recomendaciones oficiales de agencias internacionales en el tratamiento de la diabetes mellitus y sus complicaciones (33).

2.3.1. Mecanismos implicados en el daño oxidativo y la diabetes mellitus.

Se han propuesto varios mecanismos para explicar cómo es que la hiperglicemia en general y el estado metabólico propio de la DM en particular pueden generar daño y estrés oxidativo en órganos cuyas células no dependen prioritariamente de la insulina para la entrada de la glucosa, como son las células endoteliales, las neuronas, las células renales, entre otras. Varias de estas propuestas serán presentadas y analizadas en los siguientes apartados (33).

2.3.1.1 El metabolismo de la glucosa y la formación de especies reactivas de oxígeno.

La formación de las especies reactivas de oxígeno (ERO) es inherente al metabolismo aeróbico por medio del cual se obtiene energía de las diferentes moléculas en las células y en este sentido la glucosa no es la excepción; aún más, la glucosa es la principal molécula que se oxida para dar energía y la más abundante en la célula y en el organismo para fines metabólicos.

En el metabolismo las ERO son producto de una reducción parcial del oxígeno, los electrones que adquiere son donados anómalamente por reacciones oxido-reductoras que lo reducen parcialmente por error, la reducción del oxígeno en el metabolismo es un paso necesario, indispensable, pero esos electrones adecuadamente otorgados, deberían de reducir el oxígeno hasta agua con la combinación de dos protones en la reacción. La reducción parcial da lugar a las más frecuentes ERO, el radical superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo (OH^\cdot), el peróxido de hidrogeno (H_2O_2), siendo los dos primeros radicales libres, llamados así por contener electrones desapareados.

2.3.2. Mecanismos de defensa antioxidante.

Para evitar que se desborde el insulto oxidativo, las células y los organismos aeróbicos requieren generar y mantener defensas antioxidantes de manera óptima e incrementarlas acorde al tamaño de la agresión.

Los mecanismos homeostáticos antioxidantes con los que el organismo enfrenta el daño oxidativo son específicos, afines, numerosos y diversos; reflejando la necesidad de hacer frente a la multiplicidad de formas de radicales libres y especies reactivas; también son numerosos los compartimientos donde actúan en el organismo y en las células (34).

Los mecanismos antioxidantes se pueden clasificar de diversas formas, la siguiente se basa en las líneas de defensa en el organismo:

- Macromoléculas que acomplejan especies reactivas y evitan su acción. Por ejemplo, proteínas que acumulan o transportan metales de transición, como la transferrina y la ceruloplasmina o como el oxígeno, la hemoglobina y la mioglobina (34).
- Enzimas antioxidantes con gran afinidad para catalizar con altas velocidades la reacción de reducción parcial de una especie reactiva. Por ejemplo: el superóxido dismutasa (SOD) cataliza la dismutación del O_2 a H_2O_2 ; la glutatión peroxidasa (GPx) que es una enzima dependiente de selenio y cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o lipoperóxidos (L-OOH); la glutatión sulfhidril transferasa (GST) que cataliza el ataque nucleofílico del cosustrato GSH sobre el centro electrófilo de un gran número de oxidantes y la catalasa (CAT) que reduce el H_2O_2 a H_2O (34).
- Cosustratos antioxidantes, son empleados por las enzimas para poder reducir parcialmente a los radicales libres y las especies reactivas. Por ejemplo; el glutatión y el NADPH. El glutatión es un tripéptido (L-g-

glutamilcisteinil- glicina) con gran facilidad para ceder electrones (muy nucleofílico) debido a su grupo sulfhidrilo (-SH) y su potencial redox. Una vez que queda oxidado se puede regenerar gracias a la enzima glutatión reductasa (GR) que lo reduce con la oxidación de NADPH. El NADPH tiene un potencial redox muy negativo y por ende es un importante donador de electrones e hidrógenos, con lo que puede pasar a NADP⁺ que en su forma oxidada diversas enzimas lo emplean como cosustrato (34).

- Enzimas que regeneran sustratos o cosustratos antioxidantes. Por ejemplo, las enzimas que regeneran al glutatión reducido, la vitamina E y el NADPH. El glutatión se mantiene casi todo en forma reducida principalmente a través de glutatión reductasa (GR), una flavoenzima que gracias a la oxidación del NADPH cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH) (34).
- La vitamina E al actuar como antioxidante se oxida a tocoferilquinona; para continuar su trabajo antioxidante se requiere que se reduzca nuevamente a vitamina E, tal reducción la pueden llevar a cabo el ascorbato (vitamina C) o el glutatión con la catálisis de las enzimas tocoferilquinona reductasa o una GPx, respectivamente. El ascorbato se oxida a deshidroascorbato y se puede reducir a ascorbato con NADPH o con GSH por enzimas tales como las deshidroascorbato reductasa (DAR) o por la glutatión peroxidasa (GPx) (34).
- El NADPH se regenera principalmente a través de la vía de las pentosas a partir del NADP⁺ por acción de la deshidrogenasa de la glucosa-6-P y la deshidrogenasa de gluconato-6-P; sin embargo; en algunas células la enzima mállica/NADP⁺ (MDP) que oxida malato a piruvato puede contribuir a la formación de NADPH o bien obtenerse a partir de la isocitrato deshidrogenasa citosólica (IDPc) dependiente de NADP⁺ que cataliza la reacción de isocitrato a alpha-cetoglutarato (34).

- Antioxidantes endógenos. Los antioxidantes son moléculas nucleofílicas con gran afinidad y que se comportan como compuestos muy susceptibles para que los oxiden las especies reactivas (electrofilicas); es decir, ofrecen electrones a las especies reactivas para evitar que estas ataquen a las macromoléculas nucleofílicas necesarias para la función y estructura celular (proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos). Una vez que los radicales libres reaccionan con los antioxidantes se reducen parcialmente o se unen en forma de aductos, reduciendo su reactividad y oxidando al antioxidante. Ejemplos de estos antioxidantes en los organismos son: el glutatión, el NADPH, la albúmina, el ácido úrico, la coenzima Q, la bilirrubina y la melatonina (34).
- Antioxidantes exógenos. Son antioxidantes que provienen de la dieta, tales como la vitamina E (alpha- tocoferol), la vitamina C (ácido ascórbico), el beta-caroteno (provitamina A), el cobre, el selenio, el zinc, el manganeso, los polifenoles, los licopenos, los ácidos egálicos, los flavonoides, la quercitina, la hespiridina, las catequinas y los taninos.
- Sistemas de reparación. Son sistemas que tratan de recuperar la función de las macromoléculas dañadas, reparar el daño establecido o destruir la macromolécula que pudiera causar daño a la economía celular (34).

Hay mecanismos de reparación específicos que sustituyen las bases mal apareadas, oxidadas, desaminadas o que añaden la base faltante y otros que degradan un tramo de nucleótidos en una hebra alrededor de la región alterada, posteriormente una polimerasa de ADN y una ligasa de ADN reparan el tramo.

Los enlaces tiol (sulfhidrilo) de las proteínas pueden ser nuevamente reducidos por la enzima tiorreductasa (TR) empleando glutatión como donador de electrones y regulando sistemas efectores y de balances oxido-reductores como señales intracelulares y como moléculas efectoras. La enzima metionina sulfóxido reductasa, reduce los sulfóxidos de metionina de las proteínas dañadas, en una reacción dependiente del NADPH.

Los daños producidos por radicales libres en términos generales marcan las proteínas para su degradación. El reconocimiento de los sitios oxidados o halogenados o bien la exposición de regiones hidrofóbicas determinan la ubiquitinación de las proteínas y su degradación en el proteosoma. En el caso de los lipoperóxidos se pueden reducir mediante GPx de fosfolípidos o son eliminados a través de las fosfolipasas como la fosfolipasa A2, que aumenta su actividad durante la agresión oxidativa (33,34)

2.4. Nrf2, factor de transcripción que responde a estrés oxidativo.

El factor de transcripción Nrf2 regula la expresión inducible de numerosos genes de enzimas detoxificantes y antioxidantes, mediante su unión a una secuencia específica del ADN conocida como ARE (de sus siglas en inglés: "Antioxidant Response Element"), que puede ser activada por diversos compuestos oxidantes y/o electrófilos de naturaleza química muy diversa (35).

La actividad del factor Nrf2 se encuentra constitutivamente reprimida debido a su unión con una proteína citoplásmica llamada Keap1 y al citoesqueleto. Dicha unión fomenta la permanente degradación de Nrf2 por el proteosoma, por lo que el control primario de su función radica principalmente en su distribución subcelular, más que en la síntesis de novo (35).

Se ha sugerido que el sistema Nrf2-Keap1 contribuye a la protección contra varias patologías como el cáncer, la toxicidad hepática y la inflamación entre otras (36).

El origen del factor Nrf2 está relacionado con los estudios de la proteína NF-E2, que en el de ratón contiene 373 aminoácidos y una aparente masa molecular de 45 kDa, por lo que a veces se le ha denominado p45. NF-E2 se expresa únicamente en células del tipo eritroide o megacariocitos. Se une a un sitio de reconocimiento parecido al de AP1(GCTGAGTCA) y regula la expresión de genes de globina tejido específicos. NF-E2 funciona como heterodímero junto con las proteínas Maf pequeñas (muscle aponeurotic fibrosarcoma) (35).

La primera evidencia del papel de Nrf2 en la protección contra el estrés oxidativo proviene del estudio de Venugopal y Jaiswal en 1996, donde se demostró que la sobreexpresión del cDNA de Nrf1 y Nrf2 aumentaba la expresión e inducción de NQO1 en respuesta a antioxidantes y xenobióticos. Además, los autores reportaron que Nrf1 y Nrf2 regulaban positivamente a ARE, mientras que c-Fos y Fra1 lo hacían de manera negativa (37).

El papel de Nrf2 se confirmó cuando se obtuvieron los primeros ratones génicamente modificados y carentes de este factor (Nrf2 $-/-$). Los ratones Nrf2 $-/-$ tuvieron un desarrollo aparentemente normal, por lo que se descartó que Nrf2 fuera esencial para la eritropoyesis murina, el crecimiento o el desarrollo (38).

No obstante, estos ratones no podían inducir la expresión de los genes responsables de la detoxificación de agentes carcinogénicos y de protección contra el estrés oxidativo, en particular los genes de fase II como NQO1, GCL, GST, HO-1, antes mencionados. Estudios más recientes han demostrado que Nrf2 también contribuye a la actividad de proteosoma 26S, todo lo cual confirma la crítica participación de Nrf1 y Nrf2 en la protección contra el estrés oxidativo y los xenobióticos (39).

El papel de Keap1, en contraste con NF-E2, Nrf2 se expresa de manera constitutiva en la mayoría de las células, de modo que su actividad se mantiene estrictamente regulada. En otras palabras, la célula debe conservar un determinado estado redox para permanecer en homeostasis, un cambio en dicho estado puede modificar la actividad de diversas enzimas y factores de transcripción. Por lo que Nrf2 no se encuentra libre y activo todo el tiempo, sino únicamente cuando se generan condiciones de estrés oxidativo. Aun cuando ha sido relativamente sencillo encontrar niveles constitutivos del ARNm para Nrf2, ha resultado difícil detectar a la proteína madura, sugiriendo su rápida degradación dentro de la célula. La vida media de Nrf2 es muy corta y se ha estimado en un tiempo menor de 20 minutos en macrófagos y en varias líneas celulares (35).

El uso de inhibidores del proteosoma indica que la degradación de Nrf2 ocurre mediante la vía de ubiquitinación y reconocimiento del proteosoma. Todo parece indicar que la célula sintetiza y degrada a Nrf2 de manera sistemática, por lo que el control primario de su función radica principalmente en su distribución subcelular, más que en la síntesis (40).

2.4.1. Regulación de Nrf2

La degradación de Nrf2 es un evento constitutivo que no requiere ninguna modificación post-transcripcional del sustrato y se ha sugerido que esto puede deberse a que Keap1 funciona como un adaptador de sustratos a la proteasoma. En cuanto al mecanismo de degradación de proteínas por la proteasoma, hay que comentar que su selectividad y especificidad están dadas por una proteína modificadora de 76 aminoácidos llamada ubiquitina (UBQ) que se pega a las proteínas que se van a degradar. Las proteínas ubiquitinadas (o poliubiquitinadas) son reconocidas por un complejo de proteasas conocido como proteosoma 26S que desdobra y digiere a las proteínas (35).

Se ha encontrado que varios inductores de la vía mediada por ARE poseen la particularidad química de interactuar con grupos sulfhidrilos, ya sea por oxidación o por alquilación. Esto sugiere que los grupos sulfhidrilos reactivos dentro de estas proteínas podrían actuar como sensores para la activación de la vía ARE. De modo que el alto contenido de cisteínas en Keap1 lo señala como un candidato excelente para identificar estos inductores. De esta manera, la proteína Keap1 tendría una función dual, por un lado ser un adaptador de la ligasa Cul-3 para la degradación de Nrf2 y al mismo tiempo un sensor de estrés oxidativo (39).

Aún no se ha determinado con certeza cuales son las cisteínas que se modifican como respuesta a los inductores de estrés y electrófilos, que son las responsables directas de la transformación estructural en Keap1 y la liberación de Nrf2. Aunque se ha sugerido a la cisteína 183 como un posible candidato, o bien las cisteínas 273 y 288. En general se han propuesto 7 residuos de cisteína

cuyos tioles se oxidan o se modifica covalentemente permitiendo la disociación del complejo Nrf2-Keap1 (35).

2.4.2. Nrf2 y la neuropatía diabética periférica

Diversas rutas metabólicas están involucradas en la historia natural de la neuropatía diabética periférica. Avances recientes apuntan hacia rutas neuro inflamatorias y referentes al distrés oxidativo ya que estas involucran la fisiopatología de la neuropatía periférica diabética.

En la población mexicana, Osorio. *et al.* 2014, encontraron valores disminuidos de Nrf2 tanto en pacientes prediabéticos como diabéticos; además, un incremento de malondialdehido y actividad de la enzima superóxido dismutasa fue determinada en sujetos diabéticos (41).

Se ha descrito a Nrf2 como un conector de estas rutas metabólicas y ha esclarecido, en gran medida, la historia natural de esta enfermedad. Nrf2 actúa como un factor de transcripción favoreciendo la activación de enzimas citoprotectoras. Sin embargo; debido a los bajos niveles de esta proteína en pacientes con neuropatía diabética periférica, existe una disminución de la actividad de ARE, favoreciendo la señalización de rutas neuroinflamatorias (Figura 3) (42).

La utilización de activadores para Nrf2, tanto naturales como sintéticos, podrían tener un gran valor terapéutico en el manejo de la neuropatía diabética periférica, la mayoría de los activadores interactúan con el residuo de cisteína tior de Keap1 favoreciendo la liberación de Nrf2 del complejo proteínico Keap1/Nrf2.

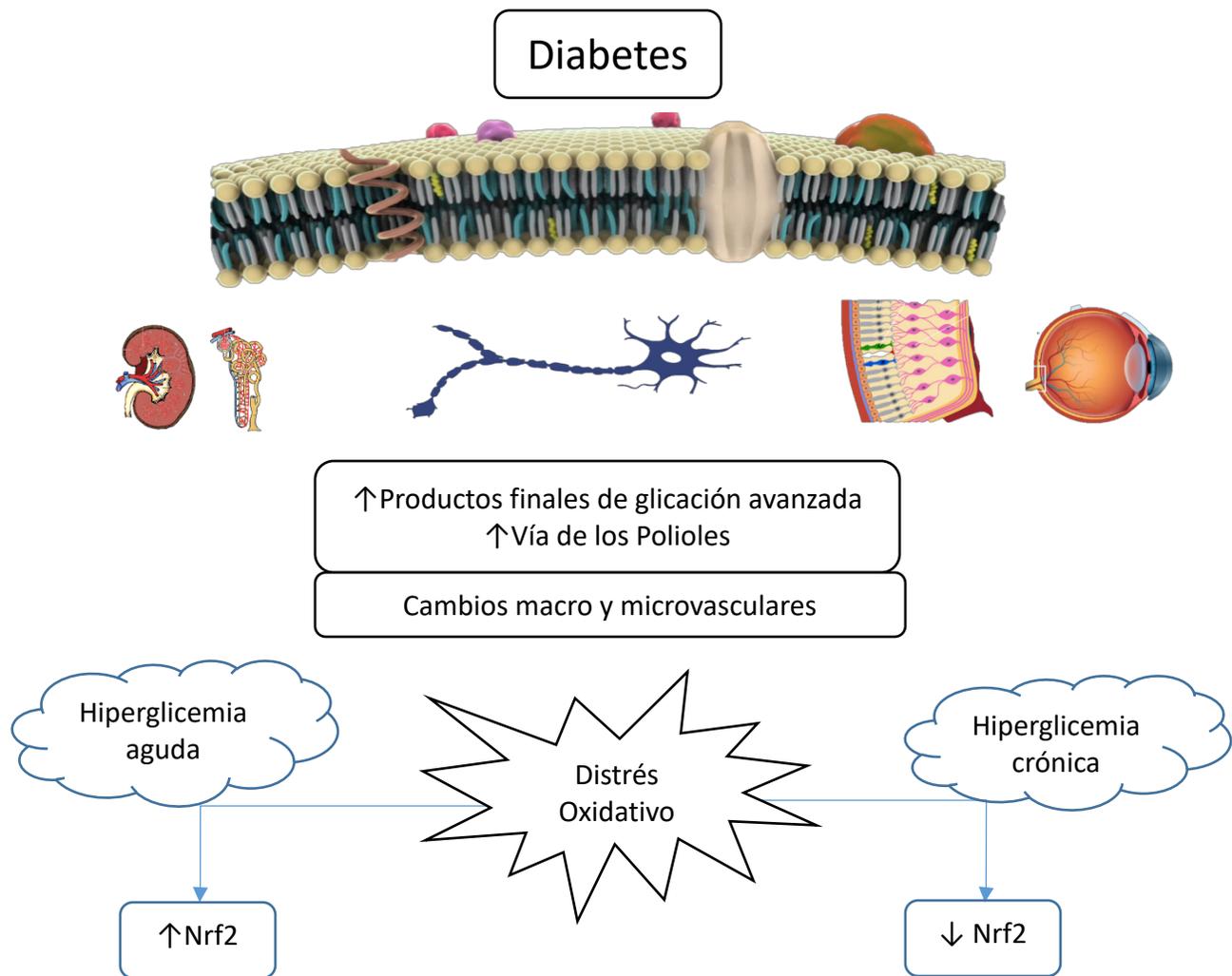


Figura No. 3. Esquema que describe la diabetes produce altas concentraciones de glucosa que afectan la membrana bilipídica de múltiples tejidos en el organismo, como son riñón, estructura de los nervios, retina etc. La activación de la vía de los polioles, además del aumento de productos de glicación avanzada, favorecen la aparición de cambios micro y macrovasculares produciendo un distrés oxidativo. Los valores de Nrf2 aumentan ante un estado hiperglucémico agudo, sin embargo, dicha proteína, disminuye cuando la hiperglicemia es crónica y persistente.

2.5.1. Ozono

El ozono es el gas más importante de la estratósfera, alcanzando su máxima concentración (por encima de los $1000\mu\text{g}/\text{m}^3$) a una altura de 20-30 km. Es un gas de naturaleza inestable, color azul cielo, perceptible a concentraciones entre $98,16\mu\text{g}/\text{m}^3$ - $19,63\mu\text{g}/\text{m}^3$. Está compuesto por tres átomos de Oxígeno (es una forma alotrópica de éste).

Posee una elevada velocidad de descomposición que oscila en el orden de 105-106 mol/s. El ozono es 1,6 veces más denso y 10 veces más soluble en agua (49,0 mL en 100 mL de agua a 0°C) que el oxígeno y aunque el ozono no es una molécula radical, es el tercer oxidante más potente después del flúor y el perisulfato.

El ozono se produce por tres fuentes fundamentales de energía: Electrólisis química, descargas eléctricas, y radiaciones de luz UV. El ozono es un gas inestable que no puede ni envasarse ni almacenarse, por tanto, debe usarse de inmediato pues tiene una semivida de 40 min a 20°C (43,44)

2.5.2. Consideraciones y antecedentes.

Considerando que desde el descubrimiento del ozono por el químico alemán Christian Friedrich Schönbein en 1840, su uso médico se ha ido incrementando en diferentes lugares del mundo; hay más interés por los profesionales de la salud en conocer cómo funciona y cuáles son sus beneficios; el número de ozono terapeutas aumenta en diferentes lugares del mundo; y un número creciente de pacientes se benefician de la ozonoterapia. No obstante, su afianzamiento no ha sido fácil, aún hay resistencia en la comunidad médica y su reconocimiento en el plano legal requiere de mayores y coordinados esfuerzos (45).

Investigaciones pre-clínicas y clínicas con un rigor científico considerable sobre el uso de la ozonoterapia, se han realizado en Alemania, Cuba, Italia, Rusia y otros países, arrojando resultados que avalan su uso a través de diferentes

protocolos médicos. Teniendo en cuenta que los estudios preclínicos, genotóxicos, toxicológicos y clínicos avalan la aplicación e inocuidad de esta terapia médica en un rango bastante amplio de dosis.

La investigación y la experiencia clínica sobre el ozono médico avanzan a pesar de los diferentes obstáculos que enfrentan, significando un permanente reto para los investigadores y las asociaciones de ozonoterapia, principalmente por la falta de las ayudas financieras que se requieren para seguir adelante con la necesaria investigación científica.

Es necesario trabajar con objetivos concretos, planificando globalmente el accionar para que con esfuerzos mancomunados se pueda ir avanzando con mayor precisión y firmeza en la terapia del ozono. Reconociendo que existen variabilidades que la comunidad médica desea estandarizar, que ya existen avances al respecto y que se deben tener en cuenta; se hace necesario continuar en el establecimiento de definiciones médicas de procedimientos y protocolos donde se precisen, las aplicaciones óptimas, y una guía de buenas prácticas para superar en forma más eficiente las posibilidades de mala praxis.

La ozonoterapia a sido regularizada en Rusia en el 2007 por el Servicio Federal de Control en Área de Salud Pública y Desarrollo Social, siendo el primer país del mundo en hacerlo; en Cuba en el 2009 por el Ministerio de Salud Pública; en España por las Comunidades Autónomas de Baleares y Canarias (2007), Madrid (2009) y Galicia, Castilla-La Mancha, y Castilla y León (2010); que avances significativos hayan sido dados en Italia a favor de la ozonoterapia por las Regiones de Lombardía (2003), Emilia-Romagna (2007) y Marche (2009) y que favorables decisiones judiciales hayan sido adoptadas por el Tribunal Administrativo del Lazio (1996 y 2003) (45).

2.5.3. Principios básicos en ozonoterapia.

El ozono a concentraciones terapéuticas ha mostrado la capacidad de promover cambios en diversos aspectos fisiológicos. Ya que es un agente oxidante potente en el momento en que se encuentra disuelto en el plasma instantáneamente es inactivado por moléculas antioxidantes como son el ácido úrico, el ácido ascórbico, el glutatión reducido, la cisteína y la albúmina, mientras que el ozono remanente reacciona con los ácidos grasos polinsaturados, los cuales van a formar como resultado de la reacción química de oxidación lipídica especies reactivas del oxígeno como H_2O_2 y moléculas aldehídicas como son el 4-hidroxinonenal (4-HNE) y el 4-hidroxihexenal (4-HHE). El H_2O_2 rápidamente entra en las células sanguíneas y se establece un gradiente en donde intracelularmente se encuentra el 10% del H_2O_2 de lo que se encuentra fuera de la célula (44,46).

Esta flujo de H_2O_2 dentro de la célula provoca una serie de reacciones bioquímicas que producen cambios en células de la sangre como son: la activación de la glucólisis en los eritrocitos con un incremento en la producción de ATP y 2,3-difosfoglicerato, así como un incremento en la liberación de oxígeno por parte de la hemoglobina a nivel tisular; a nivel de los leucocitos ocurre un aumento en la actividad fagocítica y un incremento en la liberación de interleucinas como la IL-8 y el FNT γ ; finalmente, a nivel plaquetario se observó un aumento en la liberación de factor de crecimiento plaquetario, Factor de crecimiento tisular beta 1 e IL-8, lo que tiene relevancia, por ejemplo la cicatrización de úlceras (44,47).

Los productos de la oxidación de los lípidos como el 4-HNE y el 4-HHE van a pasar por tres procesos: desintoxicación, dilución y excreción. Al ser transportados por la albumina van a recorrer todo el cuerpo dando el mensaje de un estado oxidativo e incrementando la activación de la síntesis de la γ -glutamato cisteína ligasa, γ -glutamil transferasa, γ -glutamil transpeptidasa, la hemo-oxigenasa-I (HO-1) y enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, la

GSH-peroxidasa, la catalasa y la G6PDH una enzima crítica durante la eritropoyesis (46,48).

La HO-1 se considera que es inducida por el estrés oxidativo en general y se ha observado que previene y mejora estados patológicos asociados con cardiomiopatía, isquemia crónica de las extremidades, hipertensión, endotoxemia, trasplante de órganos, infecciones crónicas, enfermedades pulmonares, diabetes y enfermedades autoinmunitaria (47).

Existe consenso de la relevancia de la inducción de moléculas protectoras durante el estrés oxidativo repetido, lo que se ha denominado un efecto hormético del ozono. La hormesis se define como el efecto benéfico obtenido a bajos niveles de exposición de un agente que es dañino a altos niveles, característicamente desde un aspecto farmacológico este fenómeno produce curvas en forma de U invertida, en donde una dosis menor produce un efecto terapéutico mientras una dosis mayor lo inhibe (44,47,49).

2.5.4. Aplicaciones de la ozonoterapia

Los efectos de la terapia coadyuvante con ozono han demostrado una mejora del estado redox además de su relación con Keap1/Nrf2. (50).

En el 2010 se hizo un estudio en ratas diabéticas tipo 1 inducidas por estreptozotocina, donde se encontró una mejora significativa de los marcadores de estrés oxidativo y capacidad antioxidante en tejido renal (51).

En el 2012, en pacientes con enfermedad coronaria, el ozono resultó benéfico para la mejora de los marcadores de estrés oxidativo, Así como grandes beneficios en la enfermedad oclusiva arterial periférica. (52)

En el 2016, para el tratamiento de la artritis reumatoide, el grupo tratado con metotrexato y ozono resultó en una mejora de los marcadores de estrés oxidativo con respecto al grupo que solo recibió como tratamiento metotrexato (53).

III. JUSTIFICAIÓN

La hiperglucemia, productos de la glucosilación avanzada y otras anomalías metabólicas, son capaces de inducir disfunción macro y micro vascular dando lugar a un gran número de complicaciones entre ellas la neuropatía diabética.

Un factor considerable es el desarrollo progresivo de un estrés oxidativo crónico, disminuyendo los mecanismos antioxidantes innatos (33).

Los medicamentos antidiabéticos, a pesar de ser de gran utilidad, no son totalmente capaces de restablecer el sistema redox.

Los productos de la oxidación lipídica, inducida por concentraciones submicromolares de ozono, podrían provocar una respuesta adaptativa, favoreciendo el eustrés oxidativo, principalmente a través de la activación transcripcional de Nrf2, protegiendo a las células de próximos eventos de estrés oxidativo (50).

Ante la ausencia de una evaluación adecuada y oportuna de la neuropatía diabética, el paciente está obligado a un tratamiento multidisciplinario riguroso, con gran afectación del estilo de vida además del aumento del costo de manutención terapéutica (4).

Su categorización y asociación con un tratamiento coadyuvante oportuno, como la ozonoterapia, podría frenar o enlentificar la historia natural de la neuropatía diabética, disminuyendo la sintomatología, y mejorando el control terapéutico.

IV. HIPÓTESIS

La ozonoterapia disminuye la respuesta antioxidante en la activación de Nrf2/Keap1 en pacientes con neuropatía periférica diabética.

V. OBJETIVOS

5.1. Objetivo principal

Evaluar el efecto de la ozonoterapia sobre la respuesta antioxidante en la activación de Nrf2/Keap1 en pacientes con neuropatía periférica diabética.

5.2. Objetivos secundarios

- 1.- Caracterizar socio demográficamente a los participantes del estudio.
- 2.- Cuantificar los parámetros químico clínicos de los participantes del estudio.
- 3.1.- Evaluar el daño oxidativo en plasma (lipoperoxidación) en MDA.
- 3.2.- Cuantificar capacidad antioxidante total en el plasma.
- 3.3.- Cuantificar el factor nuclear de transcripción Nrf2.
- 4.- Realizar, como intervención, doce sesiones de terapia con ozono.
- 5.- Cuantificar los parámetros químico clínicos de los participantes del estudio después del tratamiento con ozono.
- 6.- Evaluar el efecto antioxidante global en pacientes diagnosticados con neuropatía periférica diabética después del tratamiento con ozono.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Diseño del Estudio

En este estudio longitudinal, cuasi-experimental, prospectivo, comparativo se integraron participantes diabéticos con neuropatía periférica diabética. El protocolo del estudio fue sometido y aprobado por el Comité de Ética en Investigación del Hospital General de Durango 450, con el número de folio 125. de acuerdo con la Declaración de Helsinki y el segundo título Capítulo 1, Artículo 17, párrafo 2 de la Ley General de Salud en Materia de investigación (Anexo A).

6.2. Lugar y tiempo

La aplicación de la historia clínica (Anexo B), la extracción de sangre, además de la aplicación del tratamiento con ozono, se efectuó en la Clínica de Neuropatía y Hernia de Disco dirigida por él, Dr. Reinaldo Humberto Milla Villeda, en la ciudad de Victoria de Durango, México. Los estudios paraclínicos de los participantes fueron efectuados en sangre seca en el laboratorio de análisis clínicos del Hospital General Materno Infantil de la ciudad de Durango, Dgo., México. Las determinaciones de los marcadores oxidativos y antioxidantes se llevaron a cabo en el Laboratorio de Investigación en Bioquímica de la Facultad de Medicina y Nutrición de la Universidad Juárez del Estado de Durango. La extracción de ADN se llevó a cabo en colaboración con el departamento de Inmunobiología Molecular del Centro de Investigación Biomédica, Facultad de Medicina Universidad Autónoma de Coahuila. Subdirector del centro Dr. en C. Francisco Carlos López Márquez y QFB. María Elena Gutiérrez Pérez. En el periodo comprendido Mayo-Noviembre del 2018.

6.3 Población participante

Todos los participantes fueron diagnosticados con diabetes y neuropatía diabética periférica mediante los criterios diagnósticos de ADA 2018, y el

instrumento de recolección *Neuropathy Michigan Score* modificado (Anexo B) respectivamente. La severidad de la neuropatía diabética periférica se determinó mediante el puntaje global de: Cuestionario dirigido acerca del tipo, cronicidad y severidad de los principales síntomas cardinales aunada a una exploración clínica que abarca, presencia ausencia de alteraciones anatómicas en las extremidades, presencia ausencia de reflejos osteotendinosos, y determinación del grado de sensibilidad por medio del monofilamento de Semmes-Weinstein.

6.4. Criterios de inclusión:

- Hombres y mujeres diagnosticados con diabetes mellitus, con neuropatía periférica diabética.
- Sujetos entre cuarenta y cinco y setenta y cinco años de edad.
- Sujetos que aceptaron participar.

6.5. Criterios de exclusión:

- Sujetos que consumieran antioxidantes por arriba de dosis farmacológicas.
- Mujeres embarazadas o lactando.
- Sujetos con ingesta de alcohol crónica.
- Sujetos diagnosticados con cáncer.
- Sujetos con alteraciones hematológicas.

6.6. Criterios de eliminación:

- Sujetos que decidieran no seguir participando en el estudio.
- Sujetos que no completaron el total de las muestras o sesiones de administración de ozono.

6.7. Calculo de Muestra

En base a antecedentes previos en la población mexicana Osorio *et al*, 2014 (41) se calculó el tamaño de muestra, utilizando el programa GRANMO Jaume Marrugat, et al. 2012, a partir de la diferencia de las medias del grupo control vs los sujetos diabéticos sin control del factor de transcripción Nrf2, aplicando un intervalo de confianza del 95%, con una distribución unilateral, además de una potencia de estudio del 80% y una proporción prevista de pérdida de seguimiento de 0.02, arrojando una $n=26$

Variable.	Definición Conceptual.	Definición operacional.	Unidades medición.	Tipo de medición. Valor.
Daño oxidativo a lípidos.	Es la alteración en los lípidos en los sistemas biológicos por una agresión oxidativa.	- Concentración de malondialdehído producto final de la lipoperoxidación.	Equivalentes de milimolar, en plasma.	Cuantitativa. Continua.
Capacidad antioxidante.	Es la respuesta antioxidante de un sistema biológico ante una agresión oxidativa.	- Niveles de concentración de sistemas compensadores antioxidantes en el plasma.	Equivalentes de milimolar, en plasma, Trolox.	Cuantitativa. Continua.
Nrf2/ARE.	Es el factor de transcripción nuclear eritroide 2 que induce la expresión de proteínas antioxidantes de fase 2.	- Unión de Nrf2 con respuesta elemental antioxidante.	Equivalentes de milimolar.	Cuantitativa. Continua.

6.8. Variables

Variable	Definición Conceptual	Definición Operacional	Unidades Medición	Tipo de medición Valor
Control glucémico	Medidas que facilitan el mantener los valores de glucemia dentro de los límites de la normalidad	< 110 mg/dl. 111- 140 mg/dl. 141- 200 mg/dl. >200 mg/dl.	mg/dl	Cuantitativa Continua
Tiempo de evolución de DM2	Curso clínico de la enfermedad desde su inicio hasta la fecha.	5 a 10 años. 11 a 20 años. Mayor 20 años.	Años y meses	Cuantitativa Continua
Neuropatía Diabética Variable dependiente	Daño nervioso periférico, somático o autonómico, atribuible sólo a la diabetes mellitus	Suma de Mediciones de Annals of the Rheumatic Diseases (ARD)	Nula Leve Moderada Severa	Cualitativa Continua
Ozono Variable independiente	(O ³) es una variedad alotrópica del oxígeno.	Concentración de ozono en µg/ml. Ventana terapéutica 5-60µg/ml	µg/ml	Cuantitativa Continua

Variable.	Definición conceptual.	Definición operacional.	Unidades medición.	Tipo de medición. Valor.
Edad.	Es el tiempo que ha transcurrido desde el nacimiento de un ser vivo.	<ul style="list-style-type: none"> - Adolescencia, desde la pubertad hasta los 18 o 20 años. - Juventud, de 18 o 20 a 40 años. - Adulterez, de 40 a 60 o 65 años. - Vejez, de 60 o 65 años en adelante. 	Años y meses.	Cuantitativa. Continua.
Sexo.	Es el conjunto de características genotípicas y fenotípicas presentes en los sistemas, funciones y procesos de los cuerpos humanos.	<ul style="list-style-type: none"> - Femenino. - Masculino. 	M. F.	Cualitativa. Nominal. Dicotómica.
Ocupación.	Empleo, trabajo asalariado, al servicio de un empleador; profesión, acción o función que se desempeña para ganar el sustento; vocación profesional.	<ul style="list-style-type: none"> - Tareas, desempeño de actividades diarias de la embarazada según su realización. 	Nominal.	Cualitativa. Continua.

6.9. Procedimiento

Un total de 25 pacientes con diabetes mellitus tipo 2, diagnosticados con neuropatía periférica diabética; cumplieron con los criterios de inclusión y desearon participar de forma voluntaria, firmaron un consentimiento informado (Anexo C), así mismo se aclararon dudas y se aplicó el instrumento de medición (*Neuropathy Michigan Score*).

Posteriormente se determinaron las pruebas de paraclínicas complementarias; hemoglobina glucosilada (HbA1c), química sanguínea, albúmina, perfil de lípidos y biometría hemática, siendo procesadas por medio de técnicas de química seca, en el laboratorio de análisis clínicos del Hospital General Materno Infantil de la ciudad de Durango.

En lo que respecta al tratamiento con ozono, cada participante recibió de forma gratuita 12 sesiones de ozonoterapia por medio de la insuflación rectal, la cual consiste en la aplicación por medio de una sonda estéril desechable, con un orificio en el extremo proximal y otro en los primeros 2 cm, calibre 8 FR, con una longitud de 38.5cm (semejante a la punta de un lápiz), debidamente lubricada, siendo esta última aplicada por el personal calificado de la Clínica de Dolor y Hernia de Disco del Dr. Milla Villeda, 10 cm en el esfínter anal. La dosis que se utilizó fue entre 25-35 ug/ml en una mezcla de oxígeno y ozono, nivel hospitalario de 95%, respectivamente, en periodo aproximado de 35 días, cada tercer día, al término de cada sesión se anotó la fecha en la que acudió el participante en su respectiva historia clínica.

Al finalizar el tratamiento con ozono, nuevamente se aplicó el instrumento de medición *Neuropathy Michigan Score*, y se determinaron las pruebas paraclínicas complementarias; HbA1c, química sanguínea, albúmina, perfil de lípidos y biometría hemática.

6.10. Toma de muestras biológicas

Para la obtención de la muestra sanguínea del participante, se solicitó ayuno de 12 horas. Al momento de su visita se le pidió que tomara asiento, se descubriera el brazo y lo colocara sobre la mesa en forma perpendicular al profesional en salud. Subsecuentemente se colocó un torniquete, con el objeto de localizar la vena, dicho esto se realizó asepsia con alcohol, se procedió a hacer la punción venosa mediante un sistema de extracción por vacío. A cada uno de los participantes se les extrajo un total de 10 mililitros de sangre, repartidos en un tubo de heparina otro con SSTTM para suero con gel separador, y finalmente otro con EDTA.

Para prevenir la coagulación de la sangre se utilizaron tubos heparinizados (95 USP/5 ml), posteriormente la muestra se centrifugó a 3500 RPM durante 10 min, y el plasma fue removido por aspiración. Se hicieron alícuotas de plasma en tubos Eppendorf de 2 ml, que se mantuvieron en ultra congelación a -21°C.

El total del plasma fue repartido en 3 alícuotas, una de ellas para determinar el daño oxidativo, lipoperoxidación, por la técnica de especies reactivas de ácido tiobarbitúrico, la segunda para la determinación de la capacidad antioxidante global, por la técnica de ABTS Peroxidasa, y la determinación de Nrf2/ARE.

6.11. Determinación de daño oxidativo a lípidos en plasma, (Lipoperoxidación)

La oxidación de los lípidos se determinó en plasma, cuantificando las TBARS, de estas especies el MDA es el más abundante, estable y mejor caracterizado. La reacción consiste en que dos moléculas de TBA reaccionan con una de MDA para formar un pigmento rojo, el cual tiene una absorbancia máxima λ 532 nm.(34)

- El plasma fue resuspendido en solución amortiguadora de fosfatos (4.3 mM Na_2HPO_4 , 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.4 mM, KH_2PO_4 , pH 7.4), butirilhidroxitolueno (BHT) 0.01 M y ácido tricloroacético al 30%.
- La mezcla se incubó a 4°C por 2 hrs, al cabo de los cuales se centrifugó a 2000 RPM por 15 min. Se colectó el sobrenadante, el cual contiene el MDA, y se le adicionó EDTA 0.1 mM y TBA al 1%.
- La mezcla se incubó a la temperatura de ebullición en baño maría por 15 min.
- La absorbancia del complejo colorido se determinó en un espectrofotómetro λ 532 nm.
- Los resultados se expresaron en nmoles de equivalentes de MDA por ml de plasma, por interpolación de concentraciones conocidas en una curva estándar de MDA.

6.12. Capacidad Antioxidante Total en plasma (Sistema ABTS-peroxidasa)

La capacidad antioxidante total se determinó en plasma por ensayo colorímetro usando 2,20-Azino-di-[3-etilbenzotiazolina-sulfonato] (ABTS). El ensayo se basa en la capacidad de los antioxidantes presentes en la muestra para inhibir la oxidación de ABTS a ABTS^{*+}. La cantidad de ABTS^{*+} producido se evalúa mediante la lectura de la absorbancia a λ 450 nm. La absorbancia es inversamente proporcional a la concentración de antioxidantes. La capacidad antioxidante en el plasma, se compara con la de Trolox (análogo del tocoferol soluble en agua). (34,54)

- Se colocan partir de 50 μ L de plasma en 100 μ L de solución amortiguadora de fosfatos (4.3 mM Na₂HPO₄, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.4 mM, KH₂PO₄, pH 7.4)
- Sucesivamente se adicionaron, 50 μ L de peroxidasa, 25 μ L de H₂O₂ y 50 μ L de ABTS.
- Se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente, en oscuridad.
- Posteriormente se midió la absorbancia en una longitud de onda de λ 450nm.

6.13. Extracción de ADN mediante CTAB/DTAB

Se utilizó el micro método de extracción de ADN por CTAB/DTAB: Descrito por Gustincinich en 1991, se basa en el empleo de dos detergentes, bromuro de dodecil trimetil amonio (DTAB) y bromuro de hexadecil trimetil amonio (CTAB). El DTAB lisa las células blanco y el CTAB, detergente catiónico, se une al ADN para precipitarlo.

6.14. Determinación de Nrf2/ARE con TransAM Nrf2 Kit

Una vez obtenido el extracto nuclear se procede a determinar la actividad de Nrf2 con ARE mediante el kit TransAM Nrf2

- El Kit contiene una placa con 96 pozos en los cuales se ha inmovilizado el oligonucleótido que contiene el sitio de unión ARE (5' – GTCACAGTGA CT CAGCAGAATCTG-3).
- El activo de Nrf2 que está unido en el extracto celular, se une específicamente con este oligonucleótido.
- El anticuerpo primario usado para detectar Nrf2 reconoce el epítipo en la proteína.
- La adición del segundo anticuerpo, HRP conjugado, provee un método de detección colorimétricamente sensible a través de espectrofotómetro a una longitud de onda λ 450 nm.

VII PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN.

En el presente estudio se utilizaron parámetros de estadística descriptiva, caracterizando socio demográficamente a la población, prevalencia y tiempo de evolución de los participantes. Además de pruebas de normalidad, aplicación de t de Student para muestras pareadas, rangos y signos de Wilcoxon antes y después de los valores obtenidos, regresión lineal, correlaciones y análisis de conglomerados k de medias, se realizó a un análisis de regresión logística.

Los datos fueron capturados con en el paquete de Excel y el procesamiento de la información se realizará con el paquete estadístico SPSS 25, R-Commander.

VIII ASPECTOS ÉTICOS

Investigación de riesgo mayor al mínimo, de acuerdo a la Ley General de Salud, conforme al artículo 17.

Se consideran los aspectos, tanto básicos como de investigación médica además de asistencia profesional (Investigación clínica), en base a la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial y CIOMS.

Sometido y aprobado por el núcleo académico de la Maestría en Ciencias de la salud, FAMEN-UJED.

Sometido y aprobado por el Comité de Ética en Investigación del Hospital General de Durango 450, con el número de folio 125.

IX RESULTADOS

El presente estudio incluyó a 25 participantes, entre hombres y mujeres mestizos mexicanos de la ciudad de Durango., Dgo, México, procedentes del centro del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) clínica prospera Salud Tierra y Libertad, y de la consulta privada del Dr. Humberto Reinaldo Milla Villeda. Se corroboró el diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2 con base en los criterios propios de ADA 2018 (14). La media de la edad fue de 58 ± 8 años; El porcentaje de la población fue de 20% y 80% para hombres y mujeres; con base en la OMS, se observó que sólo el 16% están en normo peso, mientras que fueron clasificados con sobrepeso, obesos y obesos de alto riesgo. (32, 44, 8%; respectivamente) al resto de los participantes (tabla No. 1). Las características químico clínicas se encuentran descritas en la tabla No. 2

Tabla No. 1. Características de la población

Variable	
Edad (años)	58 ± 8
Índice de masa corporal ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}$)	29 ± 5
Tiempo de evolución diabéticos (años).	16 ± 9
Tensión Arterial media mmHg	100.4 ± 7.34

Tabla No. 1. Características antropométricas, tiempo de evolución con diabetes y tensión arterial media de los participantes del estudio. Los valores se expresan como media \pm desviación estándar.

Tabla No. 2. Características químico clínicas de la población de estudio

Estudio	Antes	Después	Significancia estadística
Hb1Ac (%).	8.3 ± 2.3 (%)	8.2 ± 1.8 (%)	NS
Glucosa (mg/dL)	150.2 ± 72	131.6 ± 36.5	NS
Albúmina (g/dL)	3.8 ± .2	3.8 ± .3	NS
Triglicéridos (mg/dL)	216.31 ± 112.0	245.25 ± 165.4	NS
Colesterol (mg/dL)	174 ± 41.2	185 ± 38.7	NS
Hemoglobina (g/%)	13.4 ± 1.3	13 ± 1.3	NS
Creatinina (mg/dL)	0.69 ± 0.06	0.70 ± 0.07	NS
BUN (mg/dL)	16.3 ± 5.4	16.2 ± 6.3	NS
Urea (mg/dL)	35.0 ± 11.6	36.2 ± 10.3	NS

Tabla No. 2. Los valores se expresan como media ± desviación estándar, p valor que denota la diferencia del antes y después del tratamiento con ozono; NS: No existe diferencia significativa. Prueba realizada, Wilcoxon de rangos con signo para muestras relacionadas.

9.1. Clasificación en función al grado de la neuropatía periférica diabética antes y después del tratamiento.

En el presente estudio se observó que sólo el 8% de los participantes corresponden a una neuropatía periférica diabética de severidad leve, mientras la gran mayoría el fueron caracterizados como moderada y el resto, fue clasificado como severa (68, 24% respectivamente), (Figura 4a).

Después del tratamiento con ozono se elimino el grupo con neuropatía diabética periférica severa debido a que ningún participante, obtuvo el puntaje necesario para dicha caracterización. El resto de la población fue clasificado como neuropatía periférica moderada y la gran mayoría, fue clasificada como neuropatía periférica leve (4, 96% respectivamente), (Figura 4b).

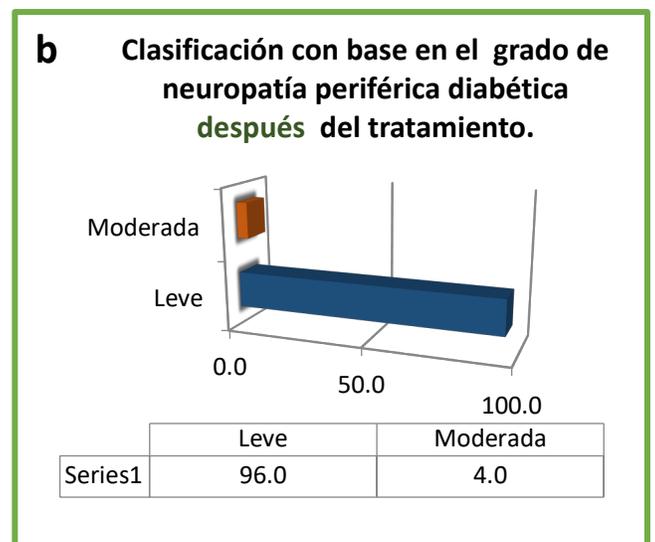
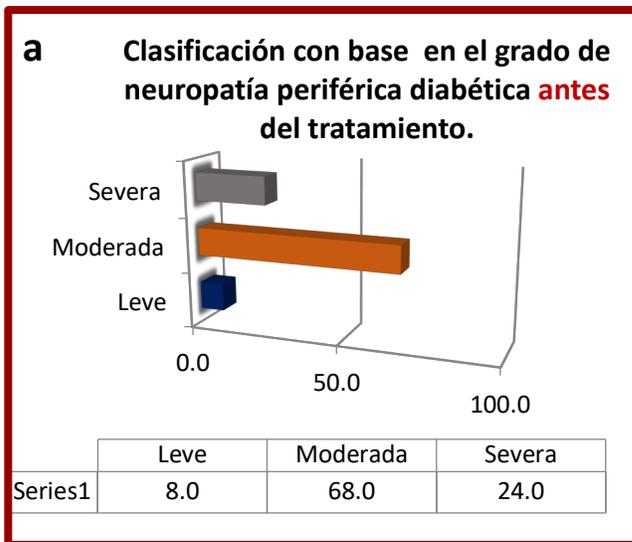


Figura No. 4. Clasificación de la severidad de la neuropatía diabética, en los participantes del estudio. a) antes del tratamiento b) después del tratamiento.

9.1.1. Sitios de mayor afectación de la neuropatía diabética periférica en la población

Se observó un predominio de síntomas en miembros inferiores, siendo los pies (88%) el principal sitio de afectación seguido de los muslos (52%), además de molestias en manos (40%) y nuca (24%).

9.2. Tipo e intensidad de los síntomas

Al realizar la prueba de normalidad se determinó que la mayoría de las variables sintomatológicas no siguen una distribución normal, por lo que procedió al análisis inferencial de las medianas a través de la prueba de rangos y signos de Wilcoxon y/o t de Student para muestras relacionadas.

Tipo e intensidad de los síntomas en pacientes con neuropatía periférica diabética

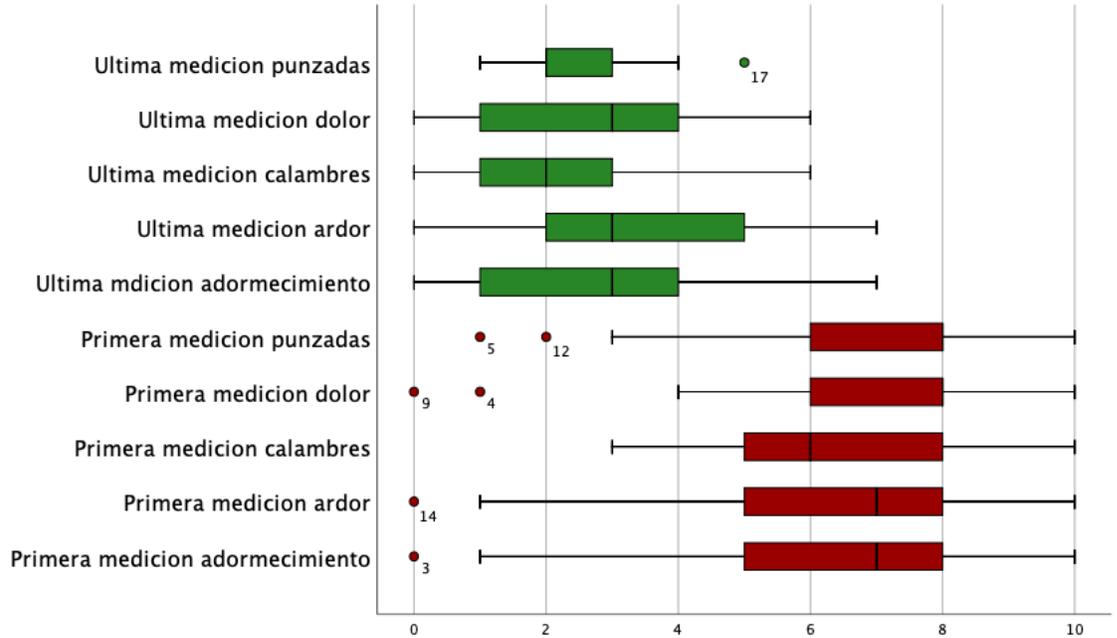


Figura No. 5. Diagrama de cajas y bigotes de los síntomas cardinales de la neuropatía diabética periférica en la totalidad de la población, con base en la escala Downie antes (rojo) y después (verde) del tratamiento con ozono.

Síntomas cardinales de la neuropatía diabética periférica	Antes (promedio)	Después (promedio)	<i>p</i>
Ardor	6.3 ± 2.9	3.3 ± 2.0	0.001
Dolor	7.0 ± 2.5	2.9 ± 1.7	0.001
Punzadas	6.7 ± 2.3	2.4 ± 1.1	0.001
Adormecimiento	6.0 ± 2.9	2.8 ± 1.9	0.001
Calambres	6.4 ± 2.2	2.2 ± 1.6	0.001

Tabla No. 3. Comparación de la severidad de los principales síntomas antes y después del tratamiento con ozono; ardor, dolor, punzadas, adormecimientos, calambres. Se observaron diferencias significativas ($p < 0.001$) de cada síntoma después del tratamiento con ozono. Prueba de rangos y signos de Wilcoxon.

9.2.1. Tipo e intensidad de los síntomas en pacientes con adecuado control glicémico

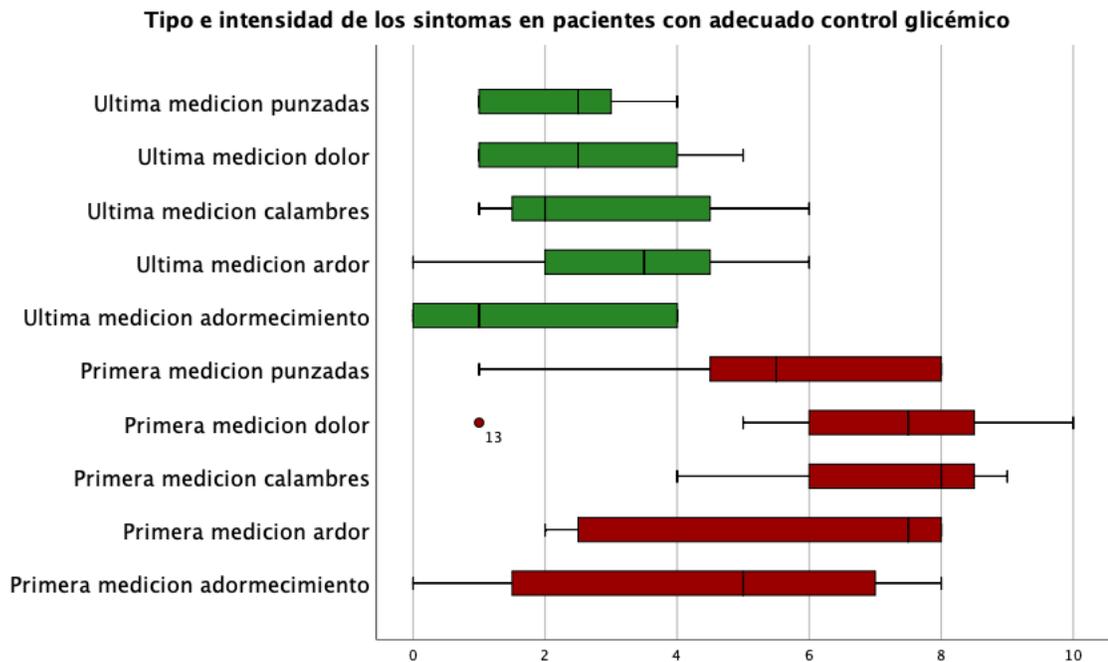


Figura No. 6. Diagrama de cajas y bigotes de los síntomas cardinales de la neuropatía diabética periférica con adecuado control glicémico con base en la escala Downie antes (rojo) y después (verde) del tratamiento con ozono.

Síntomas cardinales de la neuropatía diabética periférica	Antes (promedio)	Después (promedio)	<i>p</i>
Ardor	5.7 ± 2.8	3.2 ± 1.9	0.017
Dolor	6.8 ± 1.9	2.6 ± 1.5	0.018
Punzadas	5.6 ± 2.4	2.2 ± 1.1	0.017
Adormecimiento	4.3 ± 3.0	1.7 ± 1.9	0.042
Calambres	7.2 ± 1.7	2.8 ± 1.8	0.011

Tabla No. 4. Comparación de la severidad de los principales síntomas antes y después del tratamiento con ozono en pacientes con adecuado control glicémico; ardor, dolor, punzadas, adormecimientos, calambres. Se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) de cada síntoma después del tratamiento con ozono. Prueba de rangos y signos de Wilcoxon.

9.2.2. Tipo e intensidad de los síntomas en pacientes en descontrol glicémico

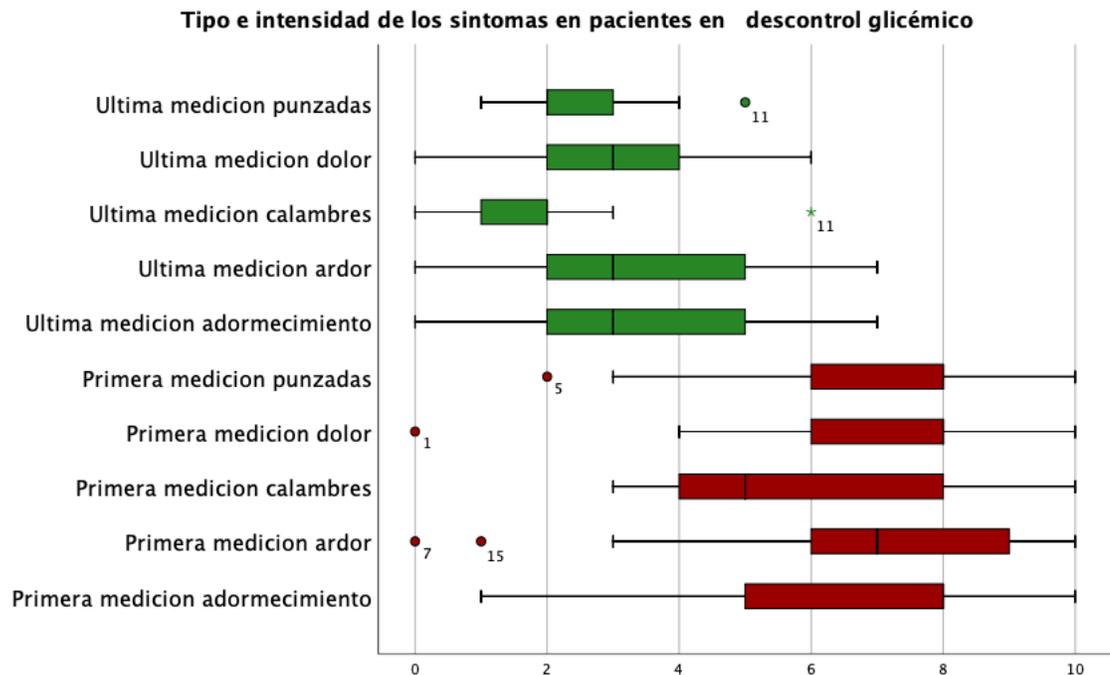


Figura No. 7. Diagrama de cajas y bigotes de los síntomas cardinales de la neuropatía diabética periférica en descontrol glicémico con base en la escala Downie, antes (rojo) y después (verde) del tratamiento con ozono.

Síntomas cardinales de la neuropatía diabética periférica	Antes (promedio)	Después (promedio)	<i>p</i>
Ardor	6.5 ± 2.9	3.3 ± 2.0	0.000
Dolor	7.0 ± 2.4	3.1 ± 1.7	0.000
Punzadas	7.2 ± 2.1	2.5 ± 1.1	0.000
Adormecimiento	6.8 ± 2.6	3.3 ± 1.8	0.000
Calambres	6.0 ± 2.4	1.8 ± 1.4	0.000

Tabla No. 5. Comparación de la severidad de los principales síntomas antes y después del tratamiento con ozono en pacientes con descontrol glicémico; ardor, dolor, punzadas, adormecimientos, calambres. Se observaron diferencias significativas ($p < 0.00001$) de cada síntoma después del tratamiento con ozono. Prueba de rangos y signos de Wilcoxon.

9.2.3. Dificultad de realización de actividades cotidianas

Al realizar la prueba de normalidad se determinó que las variables referentes a las actividades cotidianas no siguen una distribución normal, se procederá al análisis inferencial de las medianas a través de la prueba de rangos y signos de Wilcoxon.

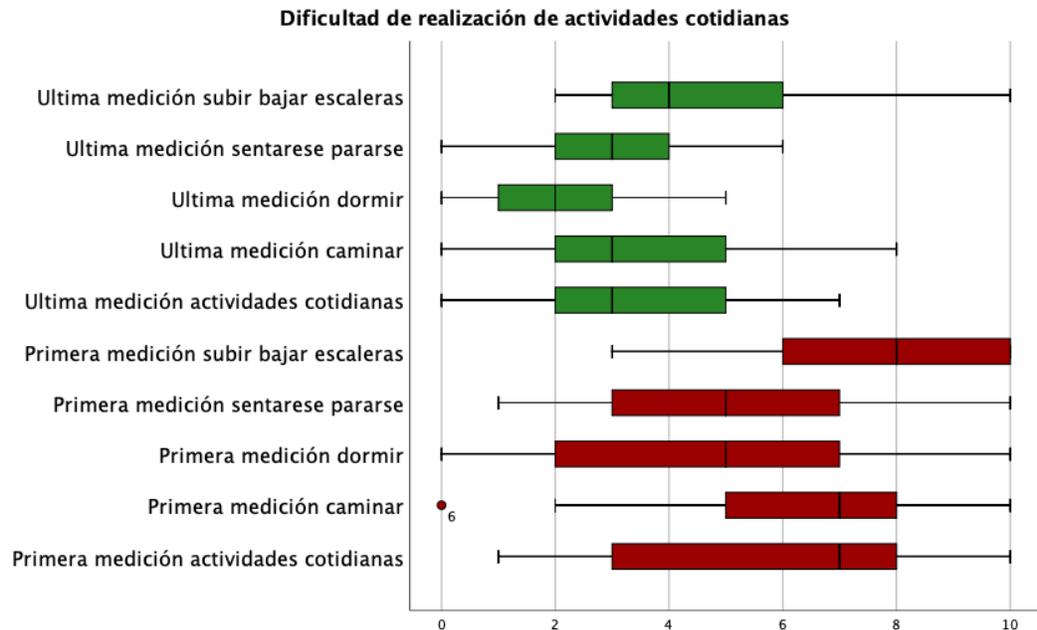


Figura No. 8. Diagrama de cajas y bigotes, dificultad de realización de actividades cotidianas en la totalidad de la población, con neuropatía diabética periférica en base en la escala Downie antes (rojo) y después (verde) del tratamiento con ozono.

Dificultad de realización de actividades cotidianas	Antes (promedio)	Despues (promedio)	<i>p</i>
Caminar	6.6 ± 2.5	3.4 ± 1.8	0.001
Subir y bajar escaleras	7.4 ± 2.3	4.6 ± 2.2	0.001
Dormir	4.5 ± 3.2	2.2 ± 1.6	0.001
Sentarse pararse	5.0 ± 2.5	2.7 ± 1.4	0.001
Actividades cotidianas	5.6 ± 2.5	3.4 ± 2.0	0.001

Tabla No. 6. Comparación de las actividades cotidianas antes y después del tratamiento con ozono; caminar, subir bajar escaleras, sentarse pararse, actividades cotidianas, dormir. Se observaron diferencias significativas ($p < 0.001$) de cada actividad después del tratamiento con ozono. Prueba de rangos y signos de Wilcoxon.

9.2.4. Dificultad de realización de actividades cotidianas en pacientes con adecuado control glicémico

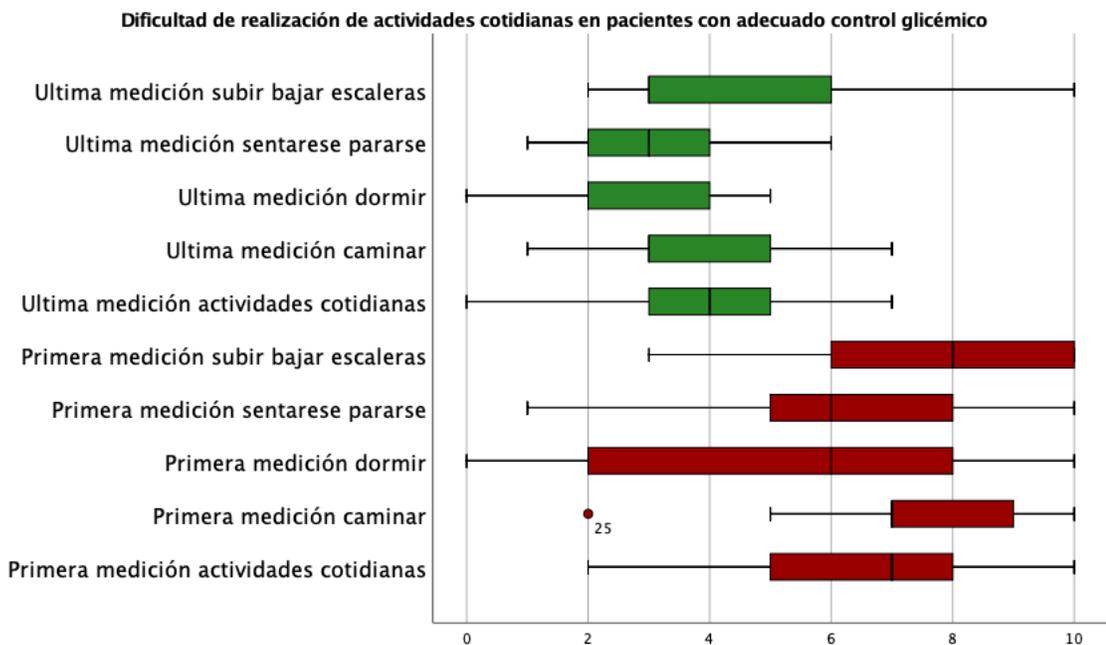


Figura No. 9 Diagrama de cajas y bigotes, dificultad de realización de actividades cotidianas en la totalidad de la población, con neuropatía diabética periférica en base en la escala Downie antes (rojo) y después (verde) del tratamiento con ozono.

Dificultad de realización de actividades cotidianas	Antes (promedio)	Después (promedio)	<i>p</i>
Caminar	5.3 ± 3.2	3.5 ± 2.5	0.001
Subir y bajar escaleras	6.8 ± 2.6	4.7 ± 1.4	0.001
Dormir	2.7 ± 2.4	1.3 ± 1.3	0.001
Sentarse pararse	3.3 ± 1.0	2.0 ± 1.5	0.001
Actividades cotidianas	4.2 ± 2.7	2.8 ± 2.3	0.001

Tabla No. 7. Comparación de las actividades cotidianas antes y después del tratamiento con ozono en pacientes con adecuado control glicémico; caminar, subir bajar escaleras, sentarse pararse, actividades cotidianas, dormir. Se observaron diferencias significativas ($p < 0.001$) de cada actividad después del tratamiento con ozono. Prueba de rangos y signos de Wilcoxon.

9.2.5. Dificultad de realización de actividades cotidianas en pacientes con descontrol glicémico

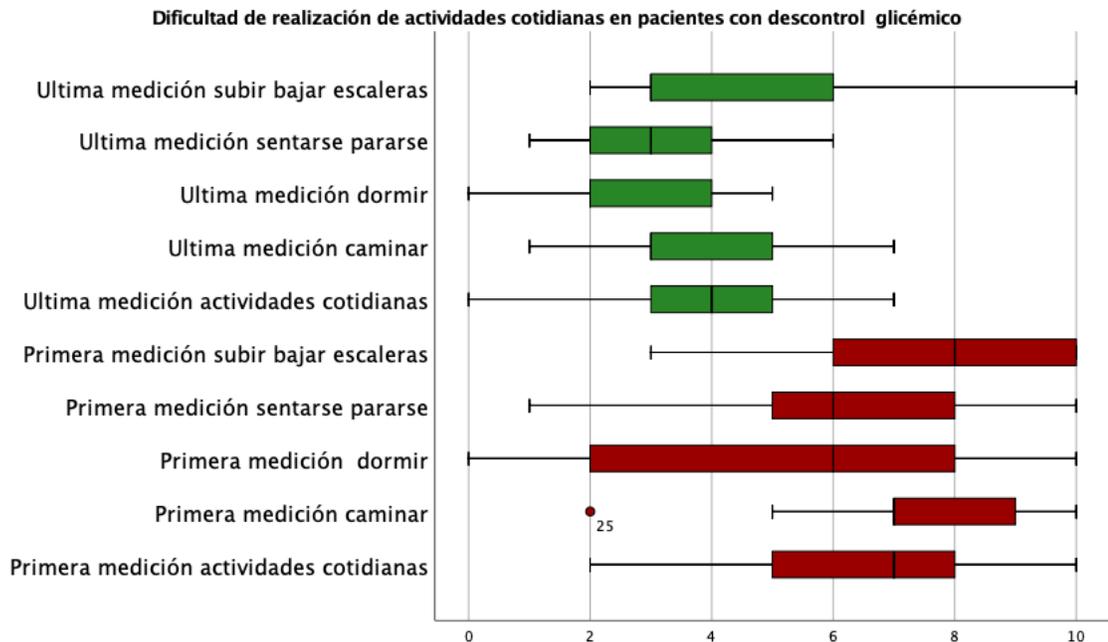


Figura No. 10. Diagrama de cajas y bigotes, dificultad de realización de actividades cotidianas en la totalidad de la población, con neuropatía diabética periférica en base en la escala Downie antes (rojo) y después (verde) del tratamiento con ozono.

Dificultad de realización de actividades cotidianas	Antes (promedio)	Despues (promedio)	<i>p</i>
Caminar	7.2 ± 1.9	3.4 ± 1.5	0.001
Subir y bajar escaleras	7.7 ± 2.1	4.5 ± 2.6	0.000
Dormir	5.4 ± 3.2	2.5 ± 1.6	0.000
Sentarse pararse	5.7 ± 2.6	3.0 ± 1.3	0.000
Actividades cotidianas	6.3 ± 2.2	3.7 ± 1.8	0.000

Tabla No. 8. Comparación de las actividades cotidianas antes y después del tratamiento con ozono en pacientes con descontrol glicémico; caminar, subir bajar escaleras, sentarse pararse, actividades cotidianas, dormir. Se observaron diferencias significativas ($p < 0.001$) de cada actividad después del tratamiento con ozono. Prueba de rangos y signos de Wilcoxon.

9.3. Marcadores de estrés oxidativo, capacidad antioxidante y actividad de unión Nrf2/ARE en los participantes.

Tabla No. 9. Marcadores del estrés oxidativo en los participantes

Variables	Total de la población de estudio (n=25)			Pacientes con descontrol glicémico (n=18)			Pacientes con adecuado control glicémico (n=7)		
	Antes	Despues	<i>p</i>	Antes	Despues	<i>p</i>	Antes	Despues	<i>p</i>
Lipoperoxidación (nmol MDA/mL plasma)	0.83 ± 0.16	0.76 ± 0.11	0.015*	0.82 ± 0.14	0.76 ± 0.10	0.069	0.83 ± 0.23	0.76 ± 0.13	0.433
Actividad de union Nrf2/ARE (450nm)	0.20 ± 0.04	0.18 ± 0.06	0.013*	0.21 ± 0.03	0.19 ± 0.07	0.379	0.20 ± 0.05		0.037
Capacidad antioxidante Total* (Eq. de trolox [mM])	0.249 ± 0.007	0.235 ± 0.007	0.037*	0.250 ± 0.007	0.251 ± 0.006	0.377	0.247 ± 0.006	0.257 ± 0.009	0.04

*Estadísticamente significativo ($p < 0.05$), según la prueba estadística rangos con signo de Wilcoxon.

MDA: Malondialdehído.

Nrf2/ARE: Factor nuclear eritroide tipo 2, respuesta elemental antioxidante.

9.3.1. Daño oxidativo y capacidad antioxidante en base al grado de severidad de la neuropatía periférica diabética en pacientes con descontrol y control glicémico.

Aplicando la estadística inferencial, se utilizó el diagrama de dispersión X, Y1, Y2 con condiciones y variables de agrupación.

En la valoración de inicio, la mayoría de los sujetos con neuropatía periférica diabética moderada presentan mayor daño oxidativo, así como una menor capacidad antioxidante. Al compararse con la medición final, se observa, gráficamente, una disminución en el daño oxidativo así y un aumento de la capacidad antioxidante (Figura No. 11 y 12)

Para corroborar si las varianzas de dispersión, de las variables en cuestión, antes y después del tratamiento con ozono, poseen diferencias significativas entre sí, se procedió a la clasificación por conglomerado con k de medias, usando el método estadístico F para dos varianzas.

Los supuestos de este método estadístico se basan en la distancia euclídea existente entre cada caso y el centro de su conglomerado, confirmando la heteroscedasticidad de las variables en cuestión.

Realizando la prueba estadística de ANOVA, a los centros de clústeres, iniciales y finales, se observó que el grupo de conglomerados de las variables referentes al daño oxidativo en plasma, antes y después (0.602, 0.930 vs 0.678, 0.804, $p < 0.007$) es estadísticamente significativo; referente a la capacidad antioxidante (0.249, 0.249 vs 0.256, 0.249, $p > 0.194$) tanto antes como después, no mostro ser estadísticamente diferente.

Daño oxidativo y capacidad antioxidante en base al grado de severidad de la neuropatía periférica diabética.

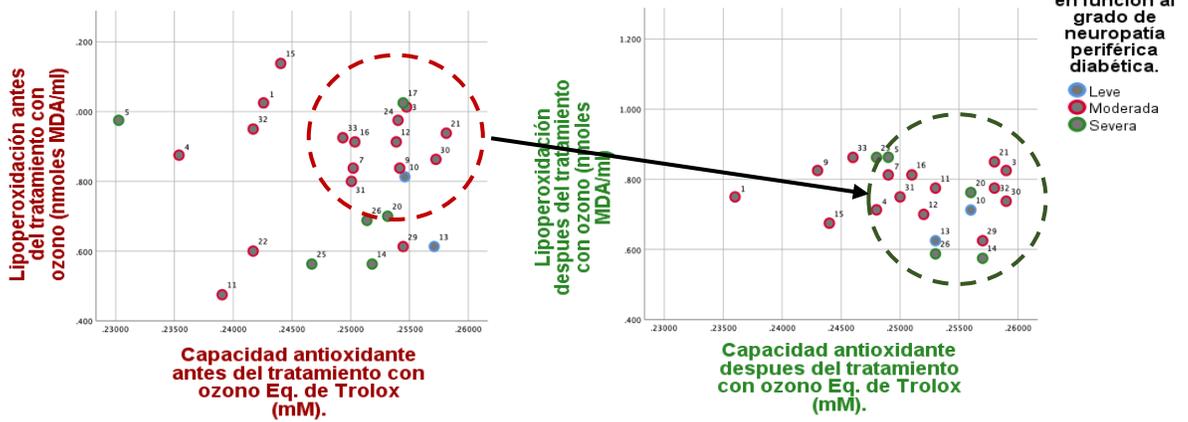


Figura No. 11. Diagramas de dispersión, clasificación en función al grado de neuropatía periférica diabética, los valores de daño oxidativo en plasma (eje y) capacidad antioxidante en plasma (eje x), después del tratamiento con ozono.

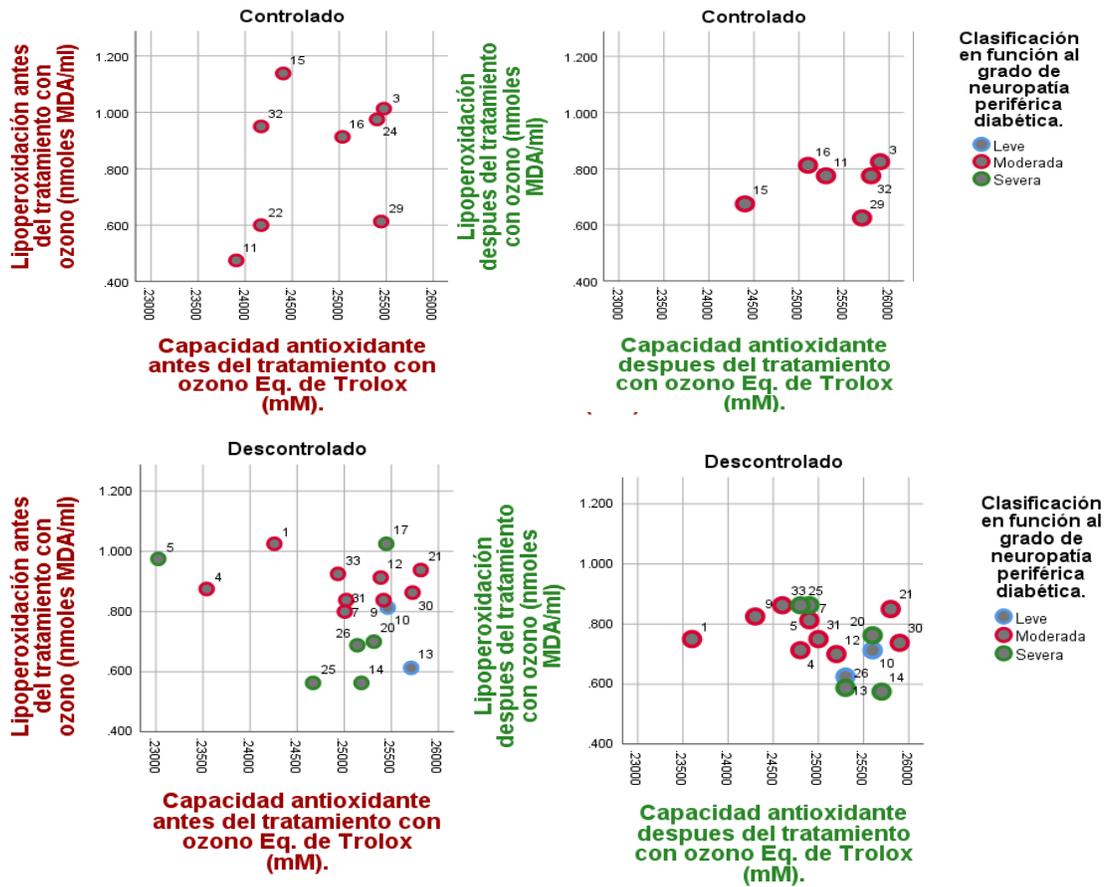


Figura No. 12a, 12b. Diagramas de dispersión, control y descontrol glucémico como variable de agrupación, su clasificación en función al grado de neuropatía periférica diabética, los valores de daño oxidativo en plasma (eje y) capacidad antioxidante en plasma (eje x), después del tratamiento con ozono.

9.4. Daño oxidativo y el grado de severidad de la neuropatía periférica diabética en pacientes con descontrol y control glicémico.

Se comparó el daño oxidativo (lipoperoxidación) y la severidad de la neuropatía periférica diabética, tanto en sujetos con adecuado con control glicémico y descontrol terapéutico (Figura No. 13).

Se distinguió un predominio en la disminución del daño oxidativo en los participantes con neuropatía leve y moderada con valores glicémicos adecuados del 57% vs 42% de la población. En el 77.7% de la población, clasificada con neuropatía periférica moderada y severa y con descontrol glicémico, el daño oxidativo disminuyó.

Comparación de lipoperoxidación y la severidad de la neuropatía periférica diabética entre pacientes con adecuado control glicémico vs descontrol glicémico

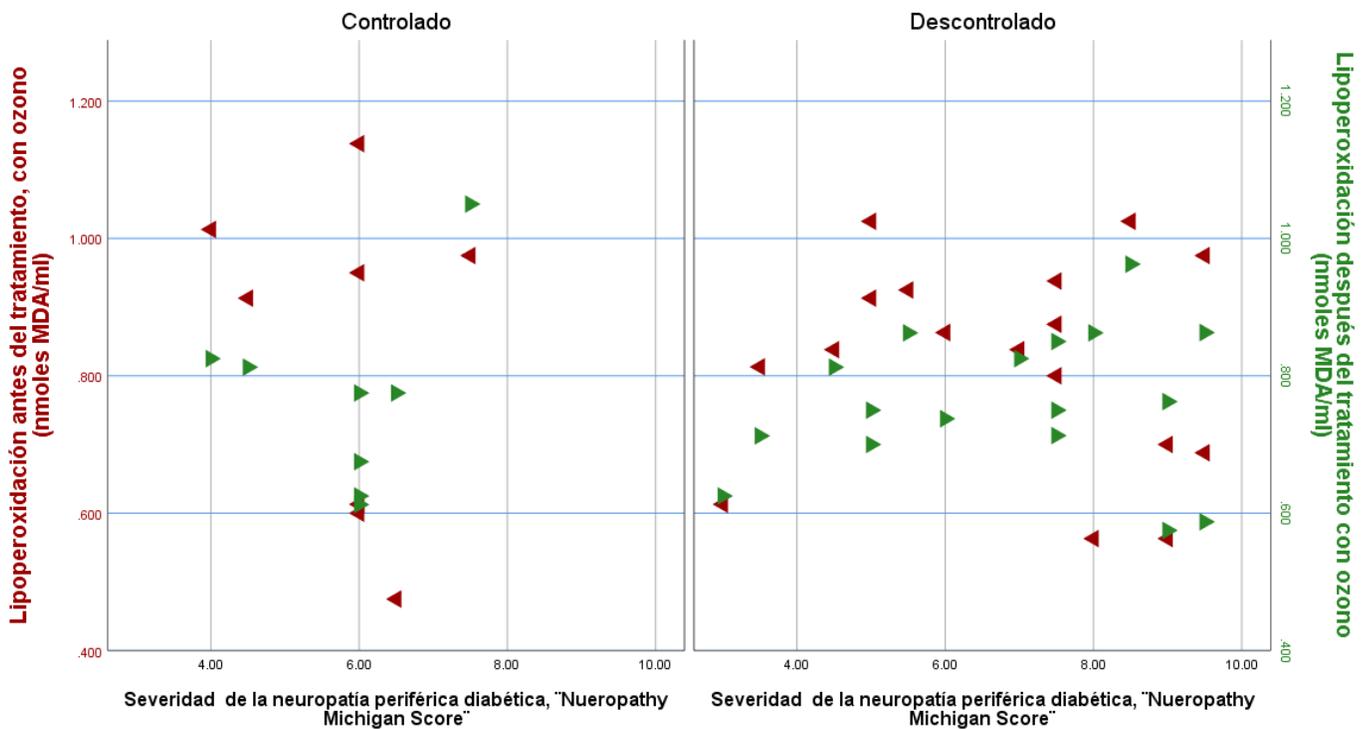


Figura No. 13. Diagrama de dispersión X1, Y1 y Y2, condición descontrol/control glucémico como variable de agrupación, severidad en base al grado de neuropatía periférica diabética (eje x), los valores de daño oxidativo en plasma (eje y) antes y después del tratamiento

9.4.1 Capacidad antioxidante y el grado de severidad de la neuropatía periférica diabética en pacientes con descontrol y control glicémico.

Se comparó la capacidad antioxidante y la severidad de la neuropatía periférica diabética, tanto en sujetos con adecuado control glicémico y descontrol terapéutico (Figura No. 14).

Se distinguió un predominio en el aumento de la capacidad antioxidante en los participantes con neuropatía leve y moderada con valores glicémicos adecuados del 87.5% vs 12.5% de la población. En el 50% de la población, clasificada con neuropatía periférica moderada y severa y con descontrol glicémico, la capacidad antioxidante aumentó.

Comparación de la capacidad antioxidante y la severidad de la neuropatía periférica diabética entre pacientes con adecuado control glicémico vs descontrol glicémico

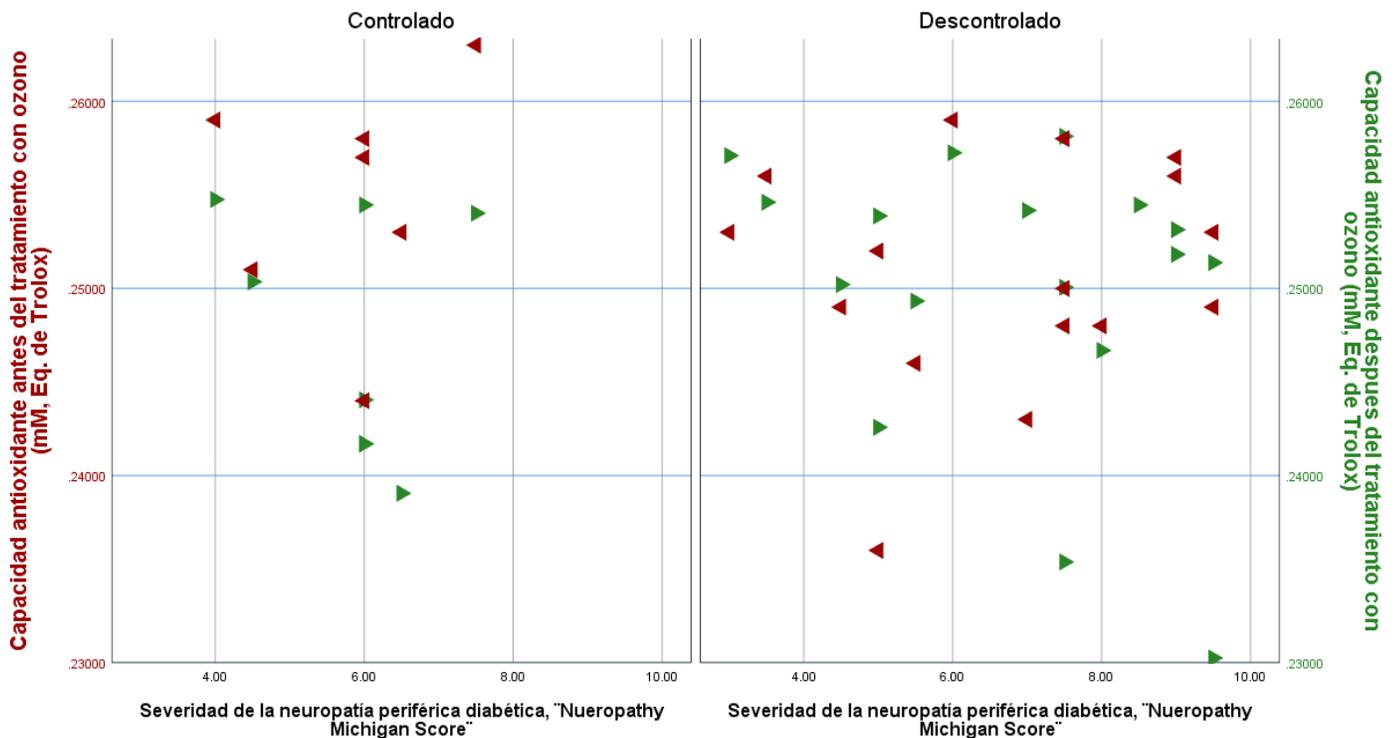


Figura No. 14. Diagrama de dispersión X1, Y1 y Y2, condición el descontrol/control glucémico como variable de agrupación, su clasificación en función al grado de neuropatía periférica diabética (eje x), los valores de la capacidad antioxidante en plasma (eje y) antes y después del tratamiento.

9.4.2. Nrf2/ARE y el grado de severidad de la neuropatía periférica diabética, en pacientes con descontrol y control glicémico

Se comparó la actividad de Nrf2/ARE y la severidad de la neuropatía periférica diabética, tanto en sujetos con adecuado con control glicémico y descontrol terapéutico (Figura No. 15).

Se distinguió un predominio en la disminución de la unión de Nrf2/ARE en los participantes con neuropatía leve y moderada con valores glicémicos adecuados del 25% vs 75% de la población. En el 66.6% de la población, clasificada con neuropatía periférica moderada y severa y con descontrol glicémico, la actividad de unión de Nrf2/ARE disminuyó.

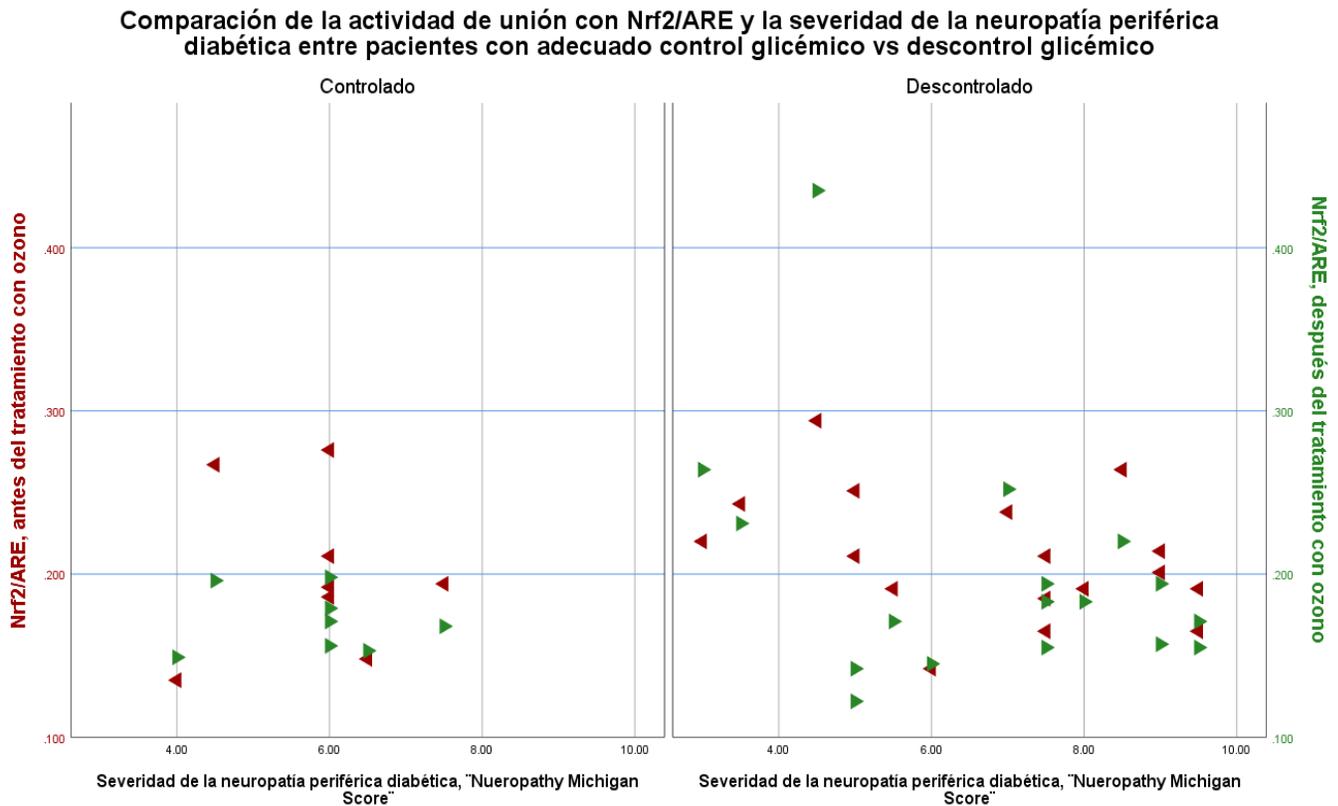


Figura No. 15. Diagrama de dispersión X1, Y1 y Y2, condición, el descontrol/control glucémico como variable de agrupación, su clasificación en función al grado de neuropatía periférica diabética (eje x), la actividad de unión Nrf2/ARE (eje y) antes y después del tratamiento.

9.5. Lipoperoxidación y componentes del síndrome metabólico en pacientes con descontrol y control glicémico

En la valoración inicial, los participantes, con adecuado control glicémico, que fueron únicamente diagnosticados sólo con diabetes mellitus presentan un rango mayor de daño oxidativo, al aumentar el número de componentes del síndrome metabólico elevando la mediana del daño oxidativo disminuyendo el rango de la misma, lo que sugiere que a mayores componentes asociados mayor y significativo es el daño oxidativo (Figura No. 16).

Después del tratamiento con ozono, los pacientes únicamente diagnosticados con diabetes mellitus, así como en aquellos que padecen dos componentes del síndrome metabólico, se observó una disminución del daño oxidativo en plasma, además de un acortamiento del rango de la propia, sugiriendo que el tratamiento con ozono, disminuye el daño oxidativo en pacientes diagnosticados sólo con diabetes y en aquellos con diabetes e hipertensión.

Lipoperoxidación y componentes del síndrome metabólico.

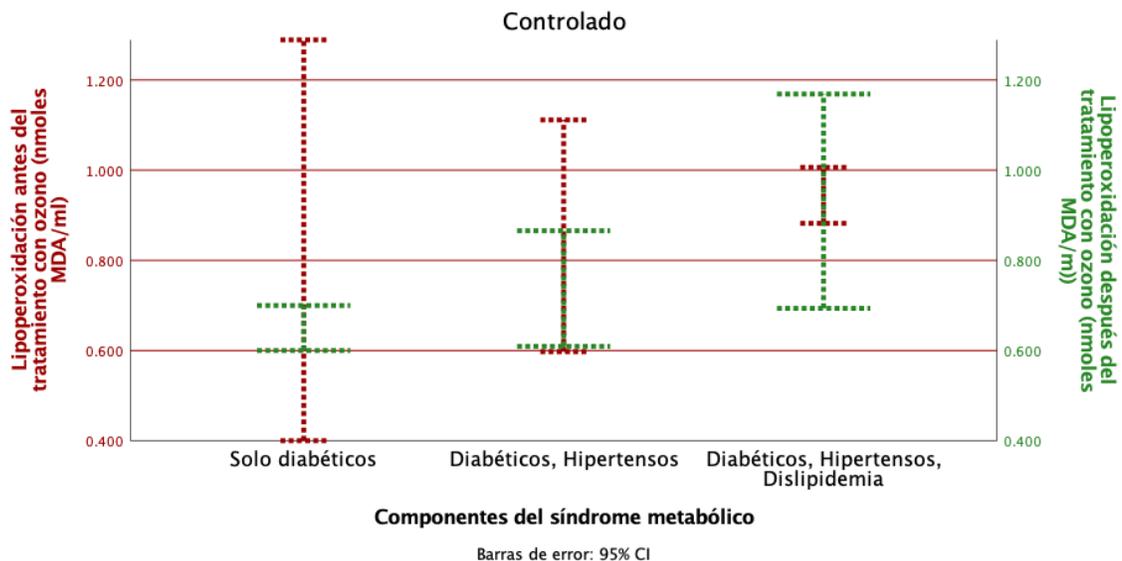


Figura No. 16. Comparación de la tendencia entre las medianas del daño oxidativo, con barras de error, entre los participantes con adecuado control glicémico y el número de componentes del síndrome metabólico, antes (rojo) y después (verde) del tratamiento con ozono.

9.5.1. Lipoperoxidación y componentes del síndrome metabólico en pacientes con descontrol y control glicémico.

En la valoración inicial, antes del tratamiento con ozono, los participantes, con descontrol glicémico, se observó un aumento del daño oxidativo que se incrementa conforme al número de componentes del síndrome metabólico (Figura No. 17).

Después del tratamiento con ozono, se observó una disminución en la mediana del daño oxidativo tanto en participantes sólo diagnosticados con diabetes, como aquellos con diabetes e hipertensión y diabéticos, hipertensos y dislipidémicos.

Lipoperoxidación y componentes del síndrome metabólico.

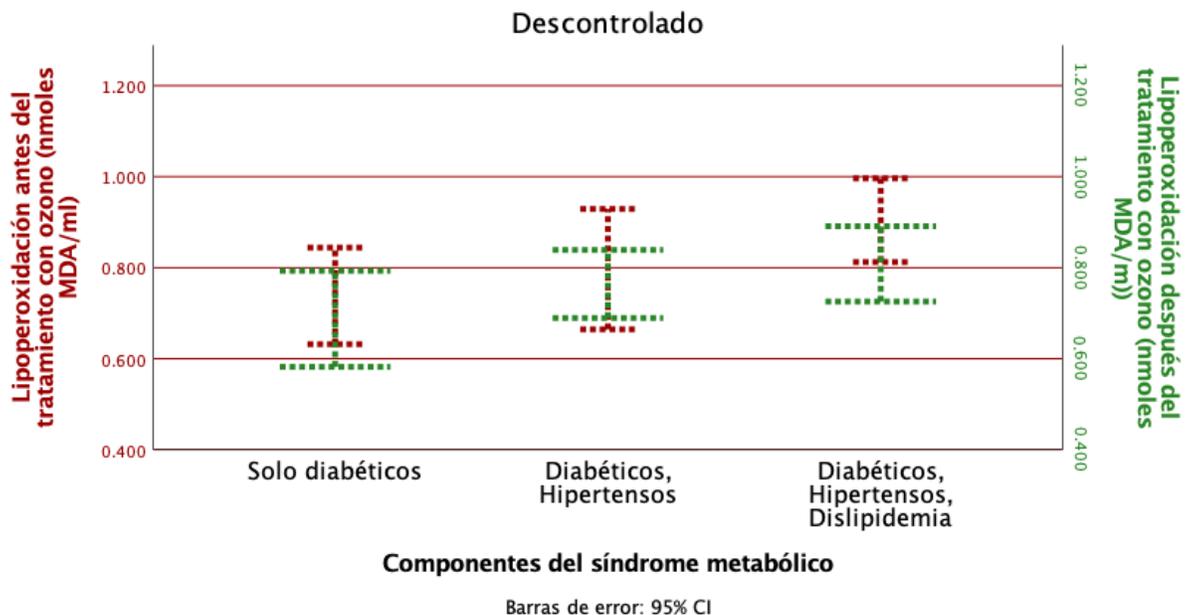


Figura No. 17. Comparación de la tendencia entre las medianas del daño oxidativo, con barras de error, entre los participantes con descontrol glicémico y el número de componentes del síndrome metabólico, antes (rojo) y después (verde) del tratamiento con ozono.

9.5.2. Capacidad antioxidante y componentes del síndrome metabólico en pacientes con descontrol y control glicémico.

En los participantes, con adecuado control glicémico, sólo los diagnosticados con diabetes mellitus, tanto antes y después del tratamiento con ozono, no se observó diferencia de la capacidad antioxidante. En los pacientes diagnosticados con diabetes mellitus e hipertensión se observa, una variabilidad de medianas importante. En aquellos sujetos que presentan tres componentes del síndrome metabólico, después del tratamiento con ozono se observó una disminución de la amplitud del rango además de una disminución del daño oxidativo mas no de la mediana (Figura No. 18).

Capacidad antioxidante y componentes del síndrome metabólico

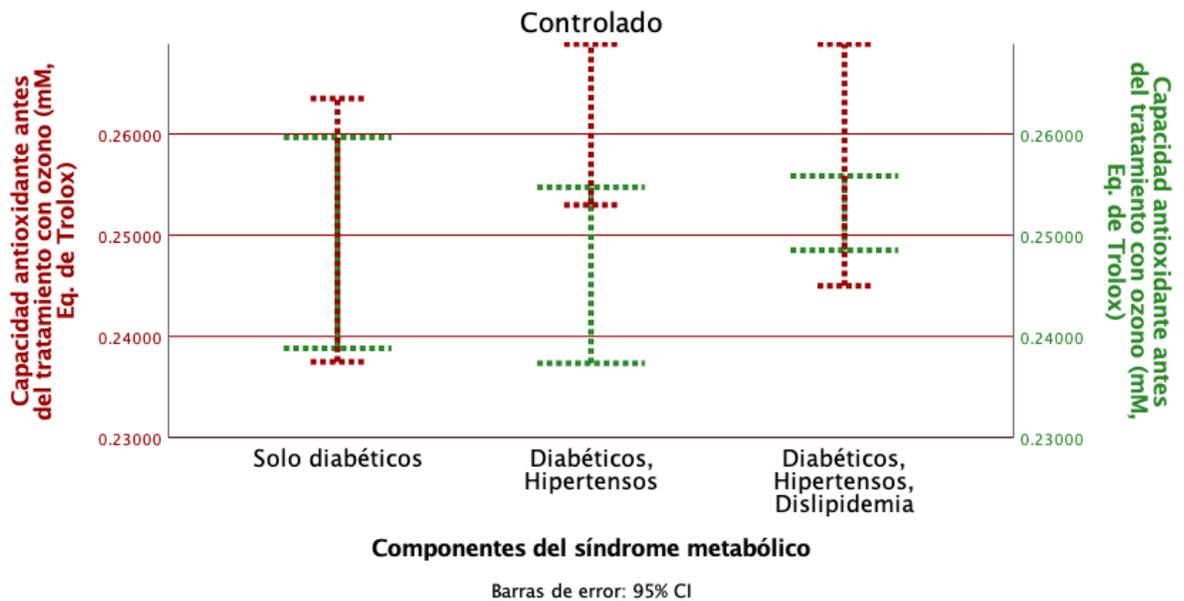


Figura No. 18. Comparación de la tendencia entre las medianas de la capacidad antioxidante, con barras de error, entre los participantes con adecuado control glicémico y el número de componentes del síndrome metabólico, antes (rojo) y después (verde) del tratamiento con ozono.

En contraste con aquellos sujetos con descontrol glicémico, antes del tratamiento con ozono se observó una tendencia al aumento de la capacidad antioxidante sin importar el número de componentes del síndrome metabólico. En la valoración final, la capacidad antioxidante disminuye conforme la suma de los componentes del síndrome metabólico (Figura No. 19).

Capacidad antioxidante y componentes del síndrome metabólico

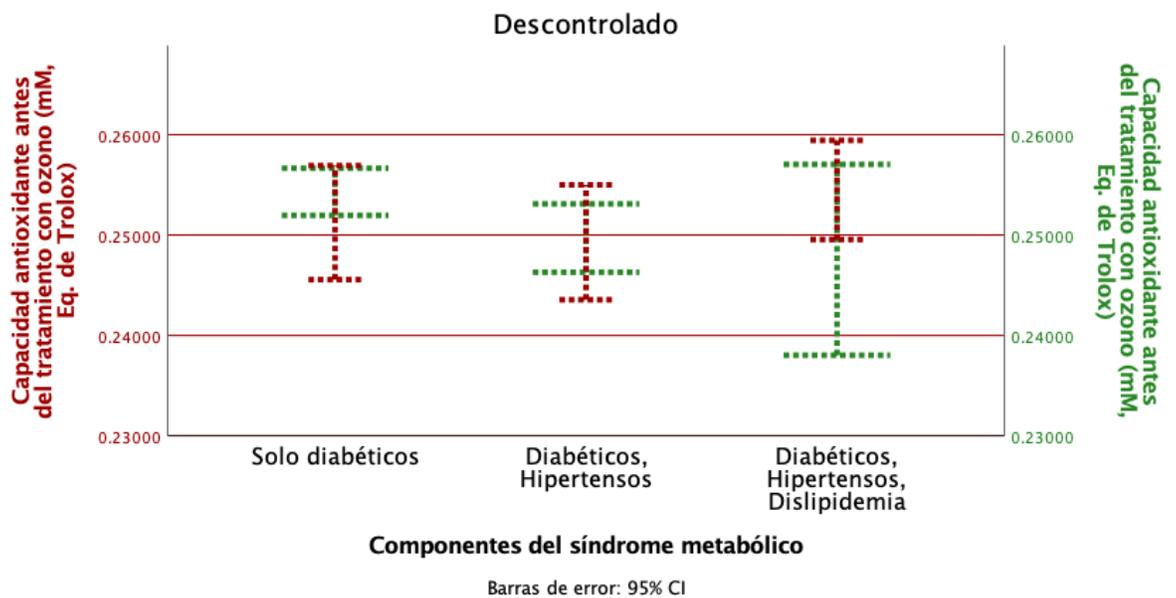


Figura No. 19. Comparación de la tendencia entre las medianas de la capacidad antioxidante, con barras de error, entre los participantes con descontrol glicémico y el número de componentes del síndrome metabólico, antes (rojo) y después (verde) del tratamiento con ozono.

9.6. Unión de Nrf2/ARE y componentes del síndrome metabólico en pacientes con descontrol y control glicémico.

Se comparó la actividad de unión de Nrf2/ARE, con el número de componentes de síndrome metabólico, se observó un predominio en la disminución de la actividad de la proteína sin importar el número de componentes de síndrome metabólico, tanto en participantes con un control glicémico adecuado, como aquellos con descontrol terapéutico (Figura No. 20 y 21).

Unión de Nrf2/ARE y componentes del síndrome metabólico

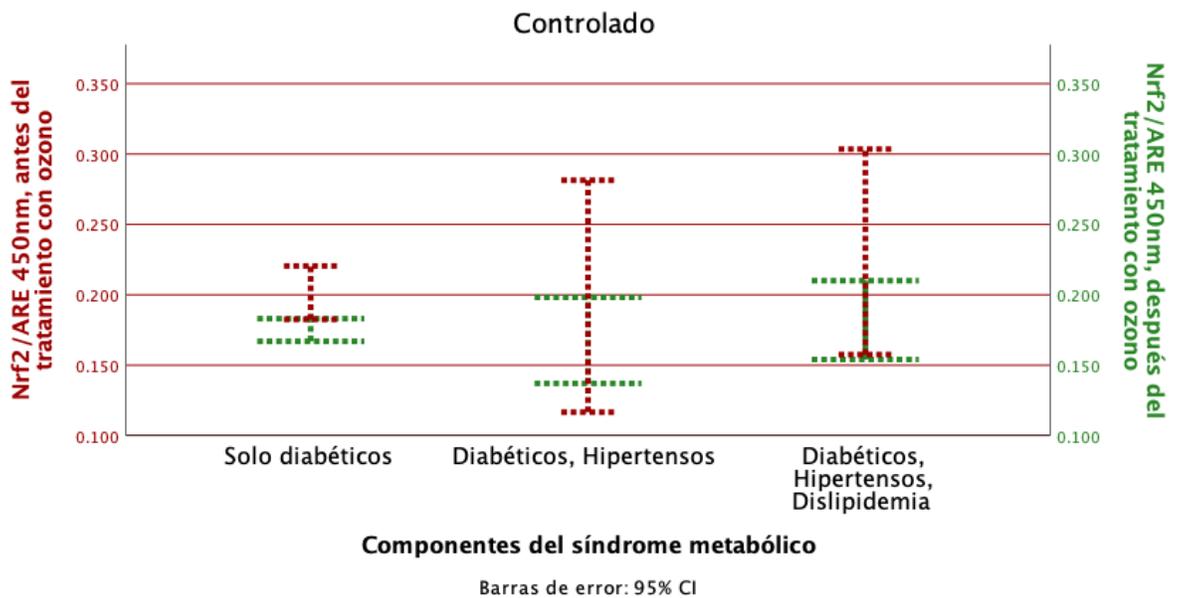


Figura No. 20. Comparación de la tendencia entre las medianas de la actividad de unión Nrf2/ARE, con barras de error, entre los participantes con un adecuado control glicémico y el número de componentes del síndrome metabólico, antes (rojo) y después (verde) del tratamiento con ozono.

Unión de Nrf2/ARE y componentes del síndrome metabólico

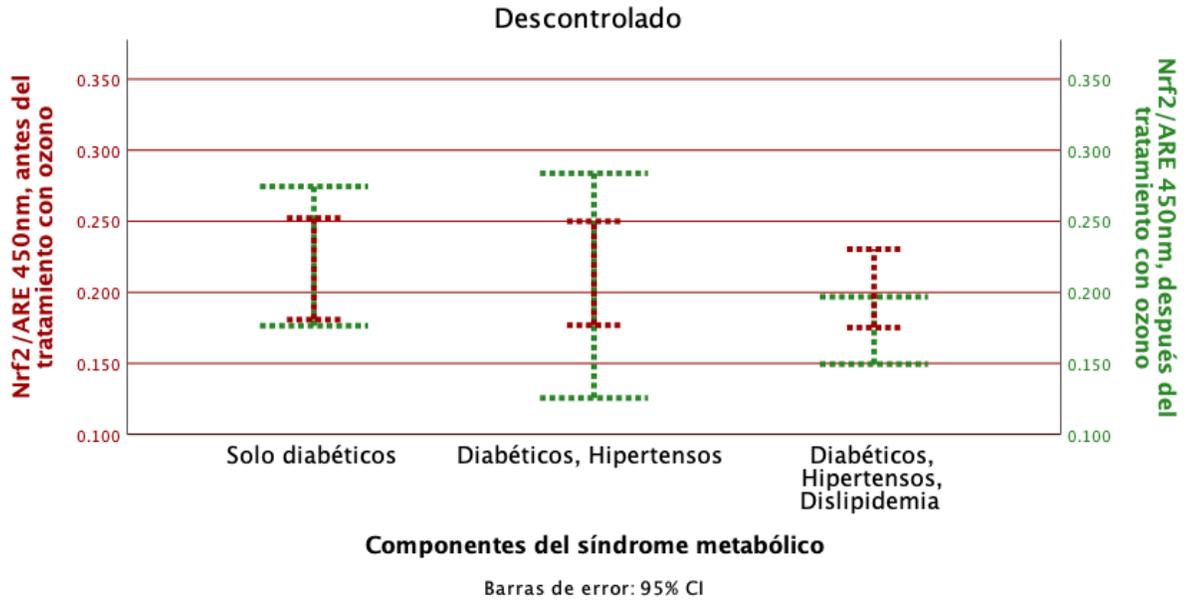


Figura No. 21. Comparación de la tendencia entre las medianas de la actividad de unión Nrf2/ARE, con barras de error, entre los participantes con descontrol glicémico y el número de componentes del síndrome metabólico, antes (rojo) y después (verde) del tratamiento con ozono.

9.7. Correlación de las variables de estudio.

Prueba de Spearman para correlaciones de muestras no paramétricas.

La hemoglobina glucosilada, al inicio del tratamiento posee una correlación negativa, con el daño oxidativo en plasma, antes ($r = -0.339$) y después ($r = -0.350$) del tratamiento ($p = 0.049$, $p = 0.043$, respectivamente) Esto sugiere que, a menor cantidad de hemoglobina glucosilada, menor es el daño oxidativo, tanto antes como después del tratamiento con ozono (Figura No. 22).

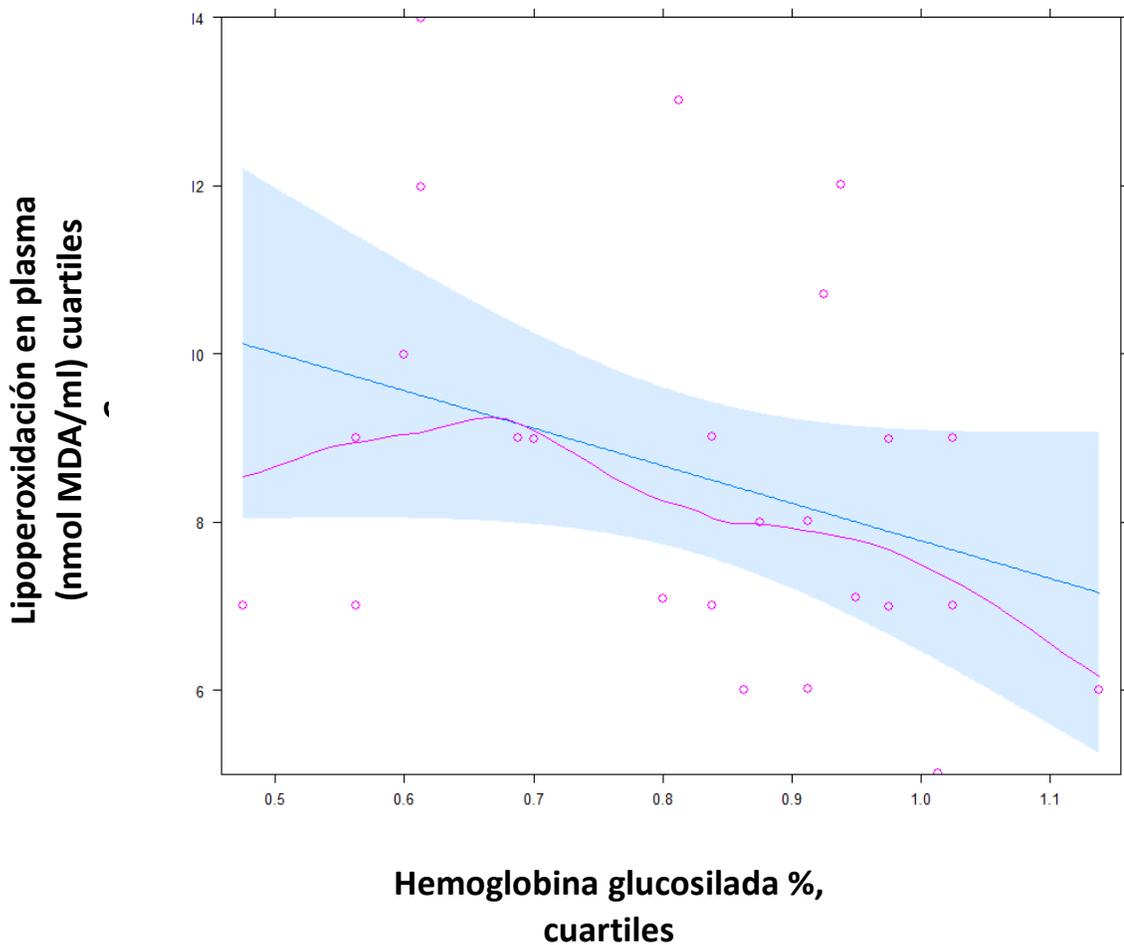


Figura No. 22. Correlación entre la hemoglobina glicosilada % y lipoperoxidación en plasma, nmol MDA/ml.

X. DISCUSIÓN

La diabetes mellitus es una enfermedad crónico degenerativa de carácter metabólico, con afectación en múltiples aparatos y sistemas (4); altera el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas, produciendo un desbalance en el estado redox (33), dando lugar a disfunciones macro y microvasculares (19).

Al aumentar el tiempo de duración, dichas alteraciones metabólicas, dan lugar a la aparición de múltiples complicaciones como son retinopatías, nefropatías y, principalmente neuropatías.

Se han propuesto varios mecanismos para explicar cómo es que la hiperglicemia en general y el estado metabólico propio de la DM en particular pueden generar daño y estrés oxidativo en órganos cuyas células no dependen prioritariamente de la insulina para la entrada de la glucosa, como son las células endoteliales, las neuronas, las células renales, entre otras (19,33,55,56).

La neuropatía periférica es una complicación que tiene un gran impacto en la calidad de vida de los pacientes. De acuerdo a la ENSANUT 2016 el 41.5% de los diabéticos diagnosticados reportaron ardor, dolor o pérdida de la sensibilidad en la planta de los pies (11). Un estudio realizado en las Unidades de Medicina Familiar Nro. 47, 53 y 56 del Instituto Mexicano del Seguro Social de León, Guanajuato reportó que 69% de los pacientes diabéticos, gran parte mujeres, padecían de neuropatía (57).

A pesar de que la diabetes mellitus y sus complicaciones están ampliamente estudiadas, es necesario conocer más acerca de sus factores etiológicos, enfoque molecular, mecanismos de las complicaciones tempranas además del desarrollo de las mismas, con el fin de proponer alternativas terapéuticas que prevengan y/o enlentezcan la historia natural de este conjunto de alteraciones. En este sentido, en el presente trabajo se propuso evaluar el efecto antioxidante de la terapia con ozono en pacientes con neuropatía periférica

diabética. Para ello, se estudiaron individuos con diabetes mellitus y neuropatía diabética periférica diagnosticados en base a los criterios aceptados internacionalmente (14,30).

En la población de estudio, a pesar de la cronicidad de la diabetes mellitus (de más de 15 años de evolución), más de la mitad (68%) se encuentra en descontrol glicémico, aunado a polifarmacia tanto propia de la diabetes: analgésicos utilizados en la neuropatía diabética periférica como analgésicos no esteroides (AINES), neuromoduladores, antidepresivos además del uso de hipoglucemiantes orales como, biguanidas, y sulfonilureas.

Las características paraclínicas de los participantes, antes y después del tratamiento se presentan en la tabla No. 1. Siguiendo los criterios diagnósticos internacionales de Child Pugh, no se reporta evidencia de alteraciones aparentes en el funcionamiento hepático. No se observó ningún tipo de nefropatía y/o insuficiencia renal, crónica y/o aguda, en base a la clasificación de KDOQI en la población estudiada.

El eustrés oxidativo es fundamental para la correcta señalización redox, regulación del genoma, crecimiento y división celular (58).

Al evaluar de forma global, el grado de daño oxidativo (lipoperoxidación) en la población de estudio, se observó un incremento en la valoración con respecto a diversos autores (54,59). En los participantes que finalizaron de forma satisfactoria el tratamiento coadyuvante con ozono; se observó una disminución significativa de la lipoperoxidación.

Carrizales *et al.* 2012 (57) compararon sujetos diabéticos con y sin adecuado control glicémico. Contrastado, con nuestra población de estudio, los participantes con adecuado control glicémico presentaron un mayor daño oxidativo del 41% y del 28% en sujetos con descontrol glicémico.

Una explicación plausible, es que los pacientes con diabetes mellitus de mayor tiempo de evolución, sumando el síndrome metabólico y el descontrol glicémico, favorecen la cronicidad.

Esta disrupción del estado redox podría contribuir a las alteraciones micro y macro vasculares que se producen en etapas avanzadas de la diabetes mellitus.

En consecuencia, a lo anteriormente mencionado, Galván-Meléndez *et al.* 2014. (59), comparó lipoperoxidación y el número de componentes del síndrome metabólico.

Aquellos sujetos con tres, cuatro o cinco componentes, guardaron relación con las determinaciones de daño oxidativo obtenidas en nuestra población de estudio.

Sugiriendo que la suma de diferentes enfermedades crónico degenerativas, favorece la sobreproducción de especies reactivas perpetuando la historia natural de la, hipertensión, dislipidemia, diabetes y sus complicaciones.

Osorio, *et al.* 2014, Ziegler, *et al.* 2013 (54). han descrito una correlación significativa entre lipoperoxidación y cifras de hemoglobina glucosilada, sugiriendo que los sujetos que se encuentren dentro del rango de la meta terapéutica, conforme al ADA, 2018, poseen valores menores de lipoperoxidación. Dicha correlación fue evidenciada en el presente estudio.

La diabetes mellitus puede incrementar el distrés oxidativo o el consumo de sistemas antioxidantes (41,60).

Los sistemas antioxidantes globales se pueden determinar de diferentes formas, una de ellas es la capacidad antioxidante total, misma que se empleó en el presente estudio por medio del sistema ABTS-peroxidasa en plasma. Los resultados fueron expresados en Eq. de Trolox (mM).

La capacidad antioxidante basal, es decir, antes del tratamiento coadyuvante con ozono se encuentra notablemente disminuida en comparación a lo descrito en la literatura (34). Esto sugiere que los pacientes diagnosticados con diabetes mellitus y neuropatía diabética periférica, tanto en control como en descontrol glicémico, presentaron una disminuida eficiencia del sistema amortiguador antioxidante, es decir; la capacidad de reducir los radicales libres es insuficiente en estos pacientes.

Al someter al participante a una agresión oxidativa, como es el ozono, se observó un aumento de la capacidad antioxidante después del tratamiento estadísticamente significativo, ($p=0.037$), (Figura 13). Sin embargo, debido a la débil plausibilidad biológica de las diferencias entre las medias, antes y después de tratamiento, (0.249 ± 0.007 vs 0.253 ± 0.007 respectivamente), se sugiere que la capacidad antioxidante se mantiene.

Evaluando las variables intrínsecas, de la neuropatía diabética, se correlacionó la severidad de la neuropatía periférica diabética, tanto en los pacientes con adecuado control y en descontrol glicémico, con el daño oxidativo y la capacidad antioxidante total antes y después del tratamiento. (Figura 19). En los participantes tanto con descontrol glicémico como con control adecuado, diagnosticados con neuropatía periférica diabética moderada, se observó una disminución significativa del daño oxidativo, mientras que la capacidad antioxidante total se mantiene, después del tratamiento con ozono.

En años recientes la terapia con ozono ha probado ser efectiva en numerosas patologías.(34,54), Sin embargo, actualmente son poco los estudios que han evaluado su mecanismo de acción mediante procesos de adaptabilidad celular (45,47,50,61–63).

El ozono, por medio de concentraciones submicromolares reacciona con los ácidos grasos polinsaturados, los cuales podrían formar, como resultado de la reacción química de oxidación lipídica, especies reactivas del oxígeno como H_2O_2 y moléculas aldehídicas capaces de estimular algunos mecanismos de

adaptabilidad celular confiriendo protección a la misma célula ante futuros eventos de estrés oxidativo (64). Dichos mecanismos adaptativos podrían sugerir la activación del complejo proteínico Keap1/Nrf2, a través de su unión con la secuencia específica del ADN conocida como ARE ("Antioxidant Response Element") (61), contrarrestando de forma importante el impacto del estrés oxidativo en la neuropatía periférica y/o enlenteciendo la historia natural de la enfermedad.

Mediante el uso del kit TransAM Nrf2, se determinó la actividad de unión entre Nrf2 obteniendo valores semejantes a los de Osorio, *et al.* 2014 reportados en población mexicana. Los pacientes diabéticos crónicos, tanto con adecuado control como en descontrol glicémico, reportaron una disminución estadísticamente significativa de la actividad de unión Nrf2/ARE en comparación con aquellos sujetos clínicamente sanos y pacientes diagnosticados con prediabetes. En función a lo anterior, una explicación posible sería la DEPLECIÓN de Nrf2 ante un constante estrés oxidativo.

Kumar *et al.* 2017 (50), observó que los pacientes con diabetes mellitus de larga evolución poseen menos actividad de este complejo proteínico en comparación con aquellos con prediabetes, sugiriendo que la actividad de unión Nrf2/ARE, aumenta en eventos agudos de estrés oxidativo pero disminuye conforme al tiempo de evolución siendo aún menor en aquellos pacientes sin adecuado control glicémico.

Con el fin de esclarecer la relación entre la diabetes mellitus, la severidad de la neuropatía periférica diabética y el estatus antioxidante, después del tratamiento con ozono, se sugiere la siguiente propuesta; (Figura 23).

Los pacientes con diabetes mellitus y neuropatía diabética periférica poseen una agresión oxidativa basal elevada, aunada a la alta severidad de los síntomas propios de esta patología y el manejo terapéutico que implica.

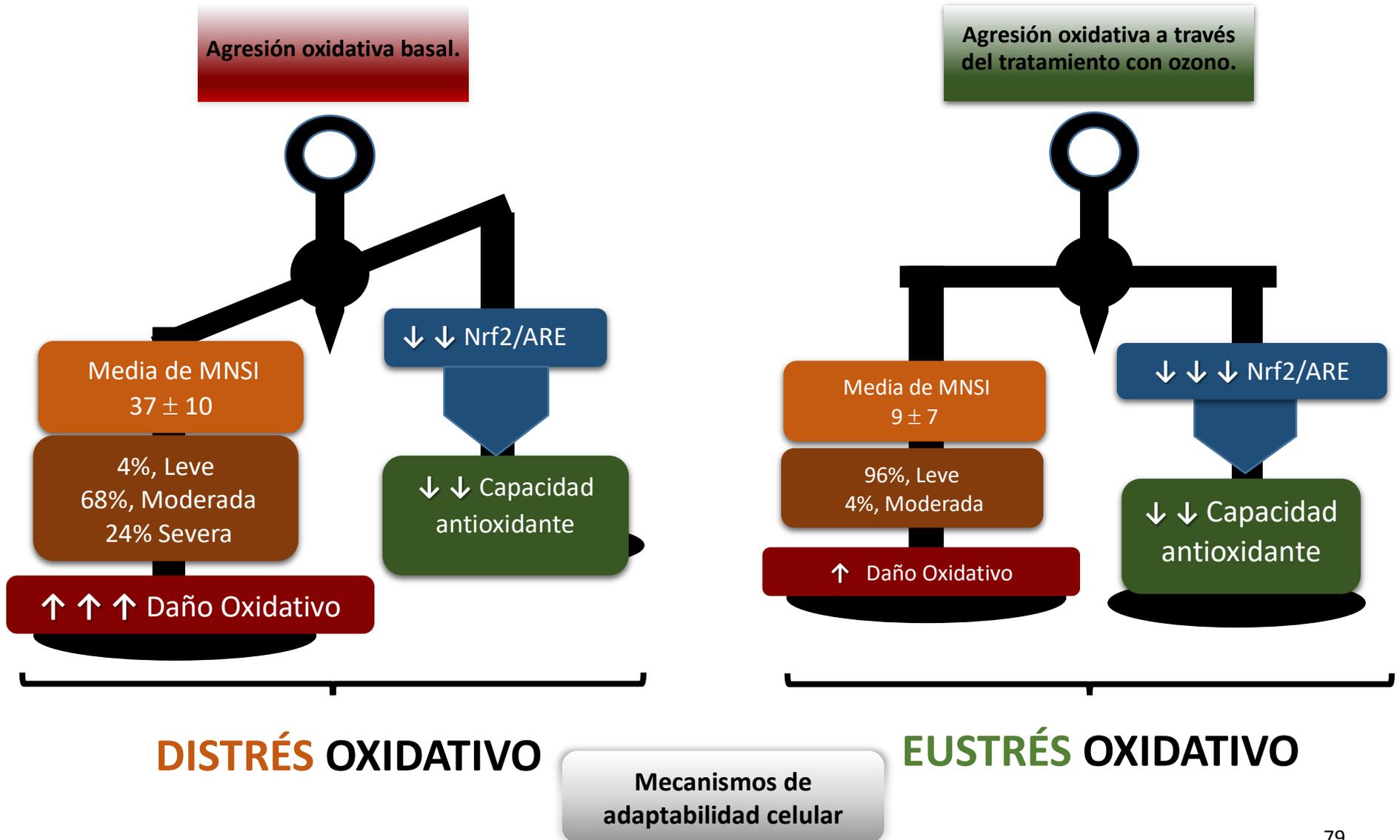
Los sistemas amortiguadores antioxidantes se encuentran disminuidos en forma basal, favoreciendo un estado de estrés oxidativo. Al adicionar una

agresión oxidativa controlada e intermitente como es el ozono se observó una disminución significativa de la actividad de Nrf2/ARE lo que podría sugerir la activación y el uso para generar distintos sistemas amortiguadores antioxidantes, en especial SOD, GPx y catalasa como mecanismo de respuesta, ya que el daño oxidativo disminuyó de forma importante y la capacidad antioxidante total se mantuvo después del tratamiento.

Ante la ausencia de variabilidad significativa, antes y después del tratamiento con ozono de las cifras de hemoglobina glucosilada, la severidad de los síntomas disminuyó de forma significativa, lo que reafirma la importancia del restablecimiento del estado redox en la neuropatía diabética periférica.

Figura No. 23.

Severidad de la neuropatía periférica diabética y el estatus antioxidante ante el ozono



XI CONCLUSIONES

- En los pacientes se observó una disminución significativa de los síntomas principales de la neuropatía periférica diabética después del tratamiento con ozono.
- El daño oxidativo en el plasma de los pacientes con neuropatía periférica diabética, después del tratamiento con ozono, disminuyó de forma significativa de acuerdo al grado de neuropatía, así como, cantidad de componentes del síndrome metabólico.
- La capacidad antioxidante, en el plasma de los pacientes con neuropatía periférica diabética se mantiene antes y después del tratamiento con ozono.
- La actividad de unión Nrf2/ARE, en el plasma de los pacientes con neuropatía periférica diabética disminuyó de forma significativa después del tratamiento con ozono.

XII PERSPECTIVAS

Posibles explicaciones y/o mecanismos alternos deberán de ser explorados, dado que los resultados sugieren, que tanto el diagnóstico y tratamiento con ozono, deben ser individualizados para lograr una mayor eficacia terapéutica, de acuerdo a las características de cada paciente.

Se sugiere determinar la actividad de unión Nrf2/ARE, SOD y catalasa, al inicio y de forma periódica durante y después de la intervención con ozono, con el objeto de esclarecer los mecanismos de respuesta antioxidante implicados en la significativa mejoría clínica de los pacientes.

Además del tratamiento con ozono, se ha sugerido el empleo de una terapia antioxidante personalizada.

En pacientes clínicamente sanos, Dokumacioglu, et al. 2010 (42), observó que, al combinar la terapia coadyuvante, como es la ozonoterapia, además del empleo de antioxidantes como Q10, aumentan considerablemente la expresión de enzimas antioxidantes con gran afinidad para catalizar con altas velocidades la reacción de reducción parcial de una especie reactiva como superóxido dismutasa, catalasa, vitaminas E y C.

Se propone un modelo de regresión logística para definir la sensibilidad y especificidad ante la mejoría del daño oxidativo, en base a las características del individuo.

XIII BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization. Diagnostic Criteria and Classification of Hyperglycaemia First Detected in Pregnancy. *Diabetes Res Clin Pract* [Internet]. 2014;37(1):S14–80. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85975/1/WHO_NMH_MND_13.2_eng.pdf
2. World Health Organization. Informe mundial sobre la diabetes. *World Rep Diabetes*. 2016;1–84.
3. Iglesias González R, Barutell Rubio L, Artola Menéndez S, Serrano Martín R. Resumen de las recomendaciones de la American Diabetes Association (ADA) 2014 para la práctica clínica en el manejo de diabetes mellitus. *Diabetes Práctica* [Internet]. 2014;05(5):1–24. Available from: <http://www.bvs.hn/Honduras/UICFCM/Diabetes/ADA.2014.esp.pdf>
4. Han N, Kirigia J, Claude J, Ogurstova K, Guariguata L, Rathmann W, et al. *Diabetes Atlas de la FID* [Internet]. Vol. 8, Federación Internacional de Diabetes. 2017. 150 p. Available from: www.diabetesatlas.org
5. Lizarzaburu JC. *Anales de la Facultad de Medicina. An la Fac Med* [Internet]. 2013;74(4):315–20. Available from: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832013000400009
6. You W-P, Henneberg M. Type 1 diabetes prevalence increasing globally and regionally: the role of natural selection and life expectancy at birth. *BMJ open diabetes Res care* [Internet]. 2016 Mar 2;4(1):e000161–e000161. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26977306>
7. Al-Rubeaan K, Youssef AM, Ibrahim HM, Al-Sharqawi AH, AlQumaidi H, AlNaqeb D, et al. All-cause mortality and its risk factors among type 1 and type 2 diabetes mellitus in a country facing diabetes epidemic. *Diabetes Res Clin Pract* [Internet]. 2016 Aug 1;118:130–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2016.06.012>
8. Arrieta F, Piñera M, Iglesias P, Nogales P, Salinero-Fort MA, Abanades JC,

- et al. Metabolic control and chronic complications during a 3-year follow-up period in a cohort of type 2 diabetic patients attended in primary care in the Community of Madrid (Spain). *Endocrinol y Nutr.* 2014;61(1):11–7.
9. Anna V, van der Ploeg HP, Cheung NW, Huxley RR, Bauman AE. Sociodemographic correlates of the increasing trend in prevalence of gestational diabetes mellitus in a large population of women between 1995 and 2005. *Diabetes Care* [Internet]. 2008 Dec;31(12):2288–93. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18809630>
 10. Stanaway JD, Afshin A, Gakidou E, Lim SS, Abate D, Abate KH, et al. Global, regional, and national comparative risk assessment of 84 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Stu. *Lancet.* 2018;392(10159):1923–94.
 11. ENSANUT. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016. *Ensanut.* 2016;2016(Ensanut):1–154.
 12. Rojas-Martínez R, Basto-Abreu A, Aguilar-Salinas CA, Zárate-Rojas E, Villalpando S, Barrientos-Gutiérrez T. Prevalencia de diabetes por diagnóstico médico previo en México. *Salud Publica Mex* [Internet]. 2017;60(3). Available from: <http://www.saludpublica.mx/index.php/spm/article/view/8566>
 13. Riddle MC, Bakris G, Blonde L, Boulton AJM, D ’alessio D, De Groot M, et al. Introduction: Standards of Medical Care in Diabetes—2018. *Diabetes Care* [Internet]. 2018;41(Supplement 1):S1–2. Available from: <http://care.diabetesjournals.org/lookup/doi/10.2337/dc18-Sint01>
 14. ADA. Guías ADA 2018 Resumen de Clasificación y Diagnóstico de la Diabetes. *Sinapsis Mx* [Internet]. 2018;1:1–6. Available from: <https://sinapsismex.files.wordpress.com/2018/01/resumen-guc3adas-ada-2018-2-0.pdf>
 15. Carstensen B, Jørgensen ME, Friis S. The Epidemiology of Diabetes and Cancer. *Curr Diab Rep.* 2014;14(10).

16. Jeon CY, Murray MB. Diabetes mellitus increases the risk of active tuberculosis: A systematic review of 13 observational studies. *PLoS Med.* 2008;5(7):1091–101.
17. Vidal-Infer A, Lucas Domínguez R, González De Dios J, Aleixandre-Benavent R. Comunicación científica (XXXI). Cómo elaborar una tesis doctoral. *Acta Pediatr Esp* [Internet]. 2016;74(2):64–7. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0165-0327\(12\)70004-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-0327(12)70004-6)
18. Michigan T, Screening N. Prevalencia de neuropatía periférica en diabéticos tipo 2 en el primer nivel de atención. *Inst Mex Segur Soc.* 2012;1126–31.
19. Martínez-Conde Fernández A, Paredes Fernández CM, Zacarías Castillo Rogelio. Neuropatía Diabética. *Rev Hosp Gral Dr M Gea González* [Internet]. 2002;5(1):7–23. Available from: <http://www.medigraphic.com/pdfs/h-gea/gg-2002/gg021-2b.pdf>
20. Ramírez-López, Giles A. Neuropatía diabética : frecuencia , factores de riesgo y calidad de vida en pacientes de una clínica de primer nivel de atención. *Arch en Med Fam.* 2017;19(4):105–11.
21. Samper Bernal D, Monerris Tabasco MM, Homs Riera M, Soler Pedrola M. Etiología y manejo de la neuropatía diabética dolorosa. *Rev la Soc Esp del Dolor.* 2010;17(6):286–96.
22. Cooper ME. Interaction of metabolic and haemodynamic factors in mediating experimental diabetic nephropathy. *Diabetologia.* 2001;44(11):1957–72.
23. Heidland A, Sebekova K, Schinzel R. Advanced glycation end products and the progressive course of renal disease. *Am J Kidney Dis.* 2001;38(4 SUPPL. 1):100–6.
24. Greene DA, Stevens MJ, Obrosova I, Feldman EL. Glucose-induced oxidative stress and programmed cell death in diabetic neuropathy. *Eur J Pharmacol.* 1999;375(1–3):217–23.
25. Brownlee M. Lilly lecture 1993: Glycation and diabetic complications. *Diabetes.* 1994;43(6):836–41.

26. Cameron NE, Eaton SEM, Cotter MA, Tesfaye S. Vascular factors and metabolic interactions in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Diabetologia*. 2001;44(11):1973–88.
27. Cruz Hernández J, Licea Puig ME. Glucosilación no enzimática y complicaciones crónicas de la diabetes mellitus TT - Non-enzymatic glycosylation and chronic complications of diabetes mellitus. *Rev Cuba Endocrinol* [Internet]. 2010;21(2):223–55. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-29532010000200008&lang=pt%5Cnhttp://scielo.sld.cu/pdf/end/v21n2/end08210.pdf
28. Oates PJ, Mylari BL. Aldose reductase inhibitors: therapeutic implications for diabetic complications. *Expert Opin Investig Drugs* [Internet]. 1999;8(12):2095–119. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/13543784.8.12.2095>
29. Weinmeister A, Dra CF, Alejandra Gertiser, Gim M, Dra MM, Urdaneta R, et al. ACTUALIZACIÓN DE CONSENSO DE NEUROPATÍA DIABÉTICA Bahía Blanca, 29 de mayo de 2009. Com Neuropatía Diabética la Soc Argentina Diabetes Coord del Com Neuropatía. 2009;
30. Moghtaderi A, Bakhshipour A, Rashidi H. Validation of Michigan neuropathy screening instrument for diabetic peripheral neuropathy. *Clin Neurol Neurosurg*. 2006;108(5):477–81.
31. Gutierrez Carlos (Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán); Lopez, Jose Luis; Gulias, Alfonso; Gonzalez; Hector Javier, Agüero L. Guías DX y TX de dolor en Neuropatía diabética. Cenetec. 2009;
32. Go Y-M, Jones DP. Redox theory of aging: implications for health and disease. *Clin Sci* [Internet]. 2017;131(14):1669–88. Available from: <http://clinsci.org/lookup/doi/10.1042/CS20160897>
33. Mu EG, Ang M, Escorza Q. Estrés oxidativo y Diabetes Mellitus. *Rev Educ Bioquim*. 2013;32(2):51–64.
34. Escorza Q, Angélica M, Salinas C, Víctor J. L A C APACIDAD A

NTIOXIDANTE TOTAL . 2009;

35. Fainstein MK. Un factor de transcripción que responde a estrés oxidativo. *REB* 26(1) 18-25, 2007. 2007;26(1):18–25.
36. Jaramillo M, Zhang D. The emerging role of the Nrf2–Keap1 signaling pathway in cancer. *Genes Dev* [Internet]. 2013;27:2179–91. Available from: <http://genesdev.cshlp.org/content/27/20/2179.short>
37. Venugopal R, Jaiswal AK. Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 1996;93(25):14960–5. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.93.25.14960>
38. Zhang DD. Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway. *Drug Metab Rev*. 2006;38(4):769–89.
39. Kansanen E, Kuosmanen SM, Leinonen H, Levonenn AL. The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol* [Internet]. 2013;1(1):45–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2012.10.001>
40. Bomprezzi R. Dimethyl fumarate in the treatment of relapsing–remitting multiple sclerosis: an overview. *Ther Adv Neurol Disord* [Internet]. 2015;8(1):20–30. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1756285614564152>
41. Jiménez-Osorio AS, Picazo A, González-Reyes S, Barrera-Oviedo D, Rodríguez-Arellano ME, Pedraza-Chaverri J. Nrf2 and redox status in prediabetic and diabetic patients. *Int J Mol Sci*. 2014;15(11):20290–305.
42. Kumar A, Mittal R. Nrf2: a potential therapeutic target for diabetic neuropathy. *Inflammopharmacology*. 2017;25(4):393–402.
43. Schwartz A, Martínez-Sánchez G, Scwhartz A. La ozonoterapia y su fundamentación científica. *Rev Española Ozonoterapia* [Internet]. 2012;2(1):163–98. Available from: <http://revistaespaoladeozonoterapia.es/index.php/reo/article/view/23>
44. Sagai M, Bocci V. Mechanisms of Action Involved in Ozone Therapy: Is

- healing induced via a mild oxidative stress? *Med Gas Res* [Internet]. 2011;1(1):29. Available from: <http://medicalgasresearch.biomedcentral.com/articles/10.1186/2045-9912-1-29>
45. ICSCO3. Declaración de Madrid sobre la ozonoterapia 2015. (*International Sci Comm Ozone Ther.* 2010;(2007):1–60.
 46. Bocci VA. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. *Riv Ital di Ossigeno-Ozonoterapia.* 2006;5(2):93–104.
 47. Bocci V, Zanardi I, Travagli V. Ozone: A new therapeutic agent in vascular diseases. *Am J Cardiovasc Drugs* [Internet]. 2011;11(2):73–82. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-79953240995&partnerID=40&md5=7c41594de8f31eeb65fd1ab85caae947>
 48. Bocci V, Zanardi I, Borrelli E, Travagli V. Reliable and effective oxygen-ozone therapy at a crossroads with ozonated saline infusion and ozone rectal insufflation. *J Pharm Pharmacol.* 2012;64(4):482–9.
 49. Bocci V, Zanardi I, Huijberts MS, Travagli V. It is time to integrate conventional therapy by ozone therapy in type-2 diabetes patients. *Ann Transl Med* [Internet]. 2014;2(12):117. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25568870>
 50. Smith N, Wilson A, Gandhi J, Vatsia S, Khan S. Ozone therapy: An overview of pharmacodynamics, current research, and clinical utility. *Med Gas Res* [Internet]. 2017;7(3):212. Available from: <http://www.medgasres.com/text.asp?2017/7/3/212/215752>
 51. Morsy MD, Hassan WN, Zalat SI. Improvement of renal oxidative stress markers after ozone administration in diabetic nephropathy in rats. *Diabetol Metab Syndr.* 2010;2(1):1–7.
 52. Martínez-Sánchez G, Delgado-Roche L, Díaz-Batista A, Pérez-Davison G, Re L. Effects of ozone therapy on haemostatic and oxidative stress index in coronary artery disease. *Eur J Pharmacol.* 2012;691(1–3):156–62.
 53. León Fernández OS, Viebahn-Haensler R, Cabreja GL, Espinosa IS, Matos YH, Roche LD, et al. Medical ozone increases methotrexate clinical

- response and improves cellular redox balance in patients with rheumatoid arthritis. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2016;789:313–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.07.031>
54. Galvan-Melendez MF, Calderon-Salinas J V, Del Pilar Intriago-Ortega M, Torres-Castorena A, Zamarripa-Escobedo R, Melendez-Hurtado CD, et al. Oxidative stress in patients with different clinical expression of metabolic syndrome. [Spanish] *Estres oxidativo en pacientes con diferente expresividad clinica del sindrome metabolico*. *Med Interna Mex* [Internet]. 2014;30(6):651–9. Available from: http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=emed12&AN=2014973404%5Cnhttp://sfx.ucl.ac.uk/sfx_local?sid=OVID:embase&id=pmid:&id=doi:&issn=0186-4866&isbn=&volume=30&issue=6&spage=651&pages=651-659&date=2014&title=Medicina+Interna+de
 55. Alcocer VM, Acar MR. Prevalencia de neuropatía periférica en pacientes tratados con talidomida. *Dermatologia Rev Mex*. 2006;50(2):45–9.
 56. Guillén MD, Goicoechea E, Luevano-Contreras C, Chapman-Novakofski K, Förster A, Kühne Y, et al. Advanced Glycation End Products in Foods and a Practical Guide to Their Reduction in the Diet. *J Am Diet Assoc* [Internet]. 2015;8(2):461–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25644174%5Cnhttp://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002822310002385%5Cnhttp://doi.wiley.com/10.1196/annals.1333.052%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3534663&tool=pmcentrez&rendertype=abs>
 57. Ibarra C, Rocha J, Hernández R, Nieves R, Leyva R. Prevalencia de neuropatía periférica en diabéticos tipo 2 en el primer nivel de atención. *Rev Med Chile*. 2012;140:1126–31.
 58. Sies H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biol* [Internet]. 2017;11(December 2016):613–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.035>

59. González C, Maira S, Rodríguez T. *Salus*. 2012;
60. Bosi E, Bax G, Scionti L, Spallone V, Tesfaye S, Valensi P, et al. Frequency-modulated electromagnetic neural stimulation (FREMS) as a treatment for symptomatic diabetic neuropathy: Results from a double-blind, randomised, multicentre, long-term, placebo-controlled clinical trial. *Diabetologia*. 2013;56(3):467–75.
61. Bocci V, Zanardi I, Huijberts MSP, Travagli V. An integrated medical treatment for type-2 diabetes. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev* [Internet]. 2014;8(1):57–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dsx.2013.10.004>
62. Bocci VA, Zanardi I, Travagli V. Ozone acting on human blood yields a hormetic dose-response relationship. *J Transl Med* [Internet]. 2011;9(1):66. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3125221&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
63. Álvarez Duarte H, Hernández Carretero J, Arpajón Peña Y, Gálvez Valcárcel JR, Reynaldo Concepción D, Jay Carbonell VG. Beneficios de la intervención con ozonoterapia en pacientes con pie diabético neuroinfeccioso. *Rev Cuba Angiol y Cirugía Vasc*. 2014;15(1):12–21.
64. Inal M, Dokumacioglu A, Özcelik E, Ucar O. The effects of ozone therapy and coenzyme Q10 combination on oxidative stress markers in healthy subjects. *Ir J Med Sci*. 2011;180(3):703–7.

Anexo A



HOSPITAL GENERAL 450
DEPARTAMENTO DE
ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN



COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN
Asunto: Dictamen de Protocolo
No. de Folio: 125
Durango, Dgo., a 25 de OCTUBRE del 2018

MARTHA ANGELICA QUINTANAR ESCORZA
INVESTIGADOR PRINCIPAL.
PRESENTE.

Por medio de la presente le informamos que posterior a la revisión de su protocolo de investigación titulado: **"EFECTO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE EL ESTADO OXIDATIVO EN PACIENTES CON NEUROPATÍA PERIFÉRICA DIABÉTICA."** con número de folio 125 obtuvo el siguiente resultado:

APROBADO APROBADO CON MODIFICACIONES NO APROBADO

Este protocolo tiene vigencia de 12 meses a partir de **OCTUBRE de 2018 a OCTUBRE de 2019.**

En caso de requerir una ampliación, le rogamos tenga en cuenta que deberá enviar al Comité un reporte de progreso al menos 30 días antes de la fecha de término de su vigencia. El Comité dispone de un correo electrónico podrá usarse al efecto. Lo anterior forma parte de las obligaciones del Investigador las cuales vienen descritas al reverso de esta hoja.

ATENTAMENTE

DR. CARLOS HERNÁNDEZ PERAZA
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE
ÉTICA EN INVESTIGACIÓN



Clínica de Neuropatía y Hernia de Disco
Historia clínica de pacientes con Neuropatía Periférica

Nombre _____ Fecha _____

Dirección: _____ C.P.: _____

Ciudad: _____ Edo.: _____

Teléfono: _____ e mail: _____

1. ¿Desde cuándo tiene síntomas? _____

2. Molestias en: Pies Piernas Muslos

Nuca Hombros Brazos Antebrazos Manos

3. Síntomas: (Escala de 0-10)

Síntomas	Ninguno	Severos
<input type="checkbox"/> Ardor	0	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
<input type="checkbox"/> Dolor	0	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
<input type="checkbox"/> Punzadas	0	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
<input type="checkbox"/> Adormecimiento	0	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
<input type="checkbox"/> Hormiguelo	0	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
<input type="checkbox"/> Calambres	0	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
<input type="checkbox"/> Arrastra los pies	0	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
<input type="checkbox"/> Mala circulación	0	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
<input type="checkbox"/> Sensación camina S/ piedras	0	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
<input type="checkbox"/> Problemas de equilibrio	0	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

No tolera sábanas

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

4. ¿Estos síntomas interfieren con las siguientes actividades? (Escala de 0 a 10)

Actividad

Sin dificultad

Muy difícil

Caminar

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Subir bajar/ escaleras

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Dormir

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Sentarse/pararse

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Actividades cotidianas

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Vestirse

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Bañarse

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Trabajar

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

5. Necesita usar: Bastón Andadera Muletas Silla de ruedas

6. ¿Desde cuando? _____

7. ¿Padece de diabetes mellitus? Si ___ No ___ Si es así, ¿Por cuánto tiempo? ___ años

8. ¿Padece de hipertensión arterial? Sí ___ No ___ ¿Por cuánto tiempo? ___ años

9. ¿Ha recibido quimioterapia? Si ___ No ___ ¿Por cuánto tiempo? _____

10. ¿Le han diagnosticado Neuropatía? Si ___ No. _____

11. ¿Le han practicado Electromiografía? Sí. ___ No ___

12. ¿Lo han tratado por Neuropatía? Sí. ___ No. _____

13. ¿Qué medicamentos está tomando actualmente? _____

14. Por favor califique su calidad de vida:

Pobre Excelente

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

15. ¿Cómo se enteró de este tratamiento? _____

16. Plan de tratamiento: _____

17. Comentarios:

Esta usted tomando:

Anti inflamatorios no esteroideos:

Ibuprofeno, (Tabalon, Advil).....

Sulindaco, (Clinoril).....

Otros.....

Antidepresivos tricíclicos:

Imipramina, (Tofranil).....

Desipramina, (Norpramina).....

Aminotriptilina, (Anapsique)

Inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina y noradrenalina:

Paroxetina, (Paxil, Aropax).....

Fluoxetina, (Prozac, Neupax)

Duloxetina, Cymbalta,

Escitalopram, (Lexapro)...

Venlafaxina, (Effexor)..

Antiepilépticos:

Carbamazepina, (Tegretol).....

Gabapentina, (Neurotin, Equipax)

Pregabalina, (Lyrica)

Agonistas opioides y derivados de morfina:

Tramadol, (Ultram).....

Oxicodona....

BITACORA DE TRATAMIENTO

Nombre del Paciente: _____

Sitio de aplicación de los electrodos:

Nuca Hombros Brazos Antebrazos Manos

R. Lumbar Muslos Piernas Pies

Fecha:

Nivel de aplicación: Comentarios:

1. _____

1. _____

2. _____

2. _____

3. _____

3. _____

4. _____

4. _____

5. _____

5. _____

6. _____

6. _____

7. _____

7. _____

8. _____

8. _____

9. _____

9. _____

10. _____

5. _____

11. _____

7. _____

12. _____

9. _____

Anexo C

Universidad Juárez del Estado de Durango.
Faculta de Medicina y Nutrición

Laboratorio de Investigación en Bioquímica
Carta de Consentimiento Informado

Investigador: Dra en C. Martha Angélica Quintanar Escorza. Durango,

Durango, Dgo. a _____ de _____ de 201__.

Por medio del presente acepto participar en el proyecto de investigación titulado: Efecto de la ozonoterapia sobre la respuesta antioxidante en pacientes con neuropatía periférica diabética.

Este formulario de consentimiento informado se dirige a hombres y mujeres que son atendidos en la clínica de Neuropatía y Hernia de Disco, ciudad de Victoria de Durango, que se les invita a participar en la presente investigación.

Introducción

Estamos investigando, la Neuropatía Diabética y los efectos de la aplicación del ozono sobre la misma, este padecimiento es común en nuestro país y sigue creciendo de forma importante. Principalmente se busca la disminución del dolor, así como la intervención terapéutica que esta conlleva. A continuación, se le brindara información acerca de los propósitos y objetivos de esta investigación. No tiene que decidir hoy si participar o no en este estudio. Antes de decidirse, puede hablar con alguien que se sienta cómodo sobre la investigación.

La neuropatía diabética es una de las complicaciones más severas de la Diabetes en nuestro medio. En comparación con otras entidades federativas, Durango es una zona de alta prevalencia y representa un costo de manutención terapéutica elevado con gran afectación del estilo de vida. Los medicamentos que se usan actualmente, para el manejo del dolor, poseen un gran número de efectos adversos, y estos aumentan si se usan de forma prolongada. Los radicales libres o también conocidos como especies reactivas, son partículas capaces de modificar la estructura de los vasos sanguíneos de las arterias que alimentan los nervios por la simple exposición prolongada de los mismos en gran cantidad, estos se obtienen a través de una dieta desbalanceada, sobrepeso así como ciertas ocupaciones que impliquen contaminación ambiental. Actualmente los radicales libres son de los principales factores que promueve la historia natural de neuropatía diabética. El ozono, oxígeno eléctricamente cargado, es una partícula, que, administrada en dosis terapéuticas en el torrente sanguíneo, es capaz de restablecer el balance de radicales libres y aminorar la sintomatología de la neuropatía diabética a través de vías metabólicas específicas que conllevan a la formación de enzimas antioxidantes y detoxificantes.

Tipo de Intervención de Investigación

Esta investigación incluirá la realización de una historia clínica, además de una exploración física estandarizada para la clasificación del grado de neuropatía, dos tomas de muestra sanguínea, antes y después de las sesiones de ozonoterapia, la administración de este último consiste en 12 sesiones a través de insuflación rectal, en un periodo aproximado de 35 días.

Su participación en este estudio es completamente voluntaria. Por favor lea la información que le proporcionamos, y haga las preguntas que desee antes de decidir si desea o no participar.

Esta forma de consentimiento pudiera contener palabras que usted no entienda. Por favor pregunte al doctor del estudio o a un miembro del equipo del estudio que le explique cualesquiera palabras o información que no entienda claramente.

Descripción del Proceso

Si usted está de acuerdo en participar, el personal del estudio realizara la siguiente serie de procedimientos:

Durante la investigación se le invita a la clínica de Neuropatía y Hernia de Disco.

En la primera visita, le preguntaremos sobre su salud en general, mediremos su altura y peso, valoraremos el grado de neuropatía diabética clasificándola en leve, moderada o severa, a través de la aplicación de distintas pruebas diagnósticas estandarizadas, es decir, métodos de detección no invasivos usados actualmente en diferentes instituciones de salud, que engloban: aspecto del pie, presencia o ausencia de deformidad, piel seca, infecciones o gritas, ulceraciones, reflejo alquiliano y percepción de vibración en el dedo gordo del pie, además de un cuestionario referente a su percepción del dolor en miembros inferiores. A continuación, se

A Quién Contactar

Si tiene preguntas o quiere hablar con alguien sobre este estudio de investigación puede comunicarse de 9:00 a 16:00 hrs, de lunes a viernes con la Dra. en C. Martha Angélica Quintanar Escorza o el Dr. Reinaldo Milla Villeda, a los teléfonos: (618) 216-75-62 o (618) 811-74-72 en el Departamento de Bioquímica en la Facultad de Medicina y Nutrición de la Universidad Juárez del Estado de Durango.

Declaración de consentimiento informado.

Se me ha explicado con claridad en qué consiste este estudio, además he leído (o alguien me ha leído) el contenido de este formato de consentimiento. Se me han dado la oportunidad de hacer preguntas y todas mis preguntas han sido contestadas a mi satisfacción. Estoy de acuerdo en proporcionar muestra(s) de sangre para la investigación como se describió anteriormente, así como la serie de sesiones de ozonoterapia, y que recibiré una copia firmada de esta forma de consentimiento.

Nombre y firma del Participante

Fecha

Firma del encargado de obtener el consentimiento informado

Le he explicado el estudio de investigación al participante y he contestado todas sus preguntas. Considero que comprendió la información descrita en este documento y libremente da su consentimiento a participar en este estudio de investigación.

Nombre y firma del encargado de obtener el consentimiento informado

Fecha

Firma de los testigos

Mi firma como testigo certifica que el/la participante firmó este formato de consentimiento informado en mi presencia, de manera voluntaria.

Nombre y firma del Testigo 1

Fecha

Nombre y firma del Testigo 2

Fecha



EFECTO DE LA OZONOTERAPIA SOBRE EL ESTADO OXIDATIVO EN PACIENTES CON NEUROPATÍA PERIFÉRICA DIABÉTICA

Autores: Almaguer Blanco Ángel Saul¹, Milla Villeda Reinaldo² Jiménez González Eulalio³, Ríos Rosales Edgar Rafael⁴ Burciaga Nava Jorge Alberto⁵, Barragán Ledesma Laura Ernestina⁶, Quintanar Escorza Martha Angélica⁵, Alicia López Betancourt⁶,

¹Alumno de Maestría en Ciencias de la Salud, CONACyT NPNC FAMEN UJED, ²Director de la Clínica de Hernia de Disco y Neuropatía ³Médico Pasante del Servicio Social FAMEN-UJED ⁴Alumno de Maestría en Ciencias Médicas UJED ⁵Integrante del Cuerpo Académico Bioquímica y Salud FAMEN-UJED. ⁶Profesor de la Facultad de Ciencias Exactas.

Introducción.

La diabetes mellitus tipo 2 es una enfermedad crónico-degenerativa con múltiples complicaciones; implica una intervención terapéutica con una gran cantidad de fármacos. Uno de los diversos desenlaces desfavorables es el desarrollo de la Neuropatía Diabética. Algunos autores han sugerido que en esta patología y sus complicaciones existe un estado de estrés oxidativo crónico, por la disminución de los mecanismos antioxidantes innatos o bien la producción excesiva de especies oxidantes (1). Lo cual contribuiría a una aceleración en el desarrollo de las complicaciones no permitiendo obtener una respuesta favorable con el tratamiento farmacológico prestablecido para la diabetes mellitus tipo 2 (2).

Algunos investigadores han propuesto en modelos animales que los productos de la oxidación lipídica, inducida por concentraciones submicromolares de ozono, inducen una respuesta adaptativa favoreciendo el eustrés oxidativo, protegiendo a las células de próximas agresiones oxidativas (3).

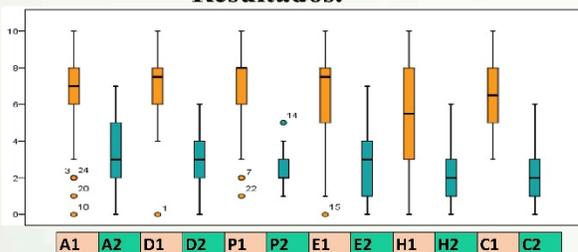
Objetivo General

Evaluación del estado oxidativo en pacientes diabéticos con neuropatía periférica antes y después del tratamiento con ozono.

Materiales y Métodos.

Estudio, cuasi-experimental, longitudinal, prospectivo, comparativo. La neuropatía periférica diabética se clasificó con instrumento modificado "Neuropathy Michigan Score". El estado oxidativo en plasma, se evaluó mediante el daño oxidativo (especies reactivas de ácido tiobarbitúrico, a 532nm), la capacidad antioxidante (sistema ABTS/peroxidasa, 405-450nm). El ozono fue administrado en 12 sesiones a través de insuflación rectal (27ug/ml). En base a lo establecido en la ley general de salud, los participantes firmaron el consentimiento informado correspondiente.

Resultados.



Clasificación Sintomatológica en base a la escala de "Michigan Neuropathy Score Modificada"	Promedio	Valor de p
A1, Ardor Antes del Tratamiento.	6.54	p<0.001
A2, Ardor Después del Tratamiento.	3.27	
D1, Dolor Antes del Tratamiento.	7.00	p<0.001
D2, Dolor Después del Tratamiento.	3.04	
P1, Puntadas Antes del Tratamiento.	6.81	p<0.001
P2, Puntadas Después del Tratamiento.	2.46	
E1, Adormecimiento Antes del Tratamiento.	6.42	p<0.001
E2, Adormecimiento Después del Tratamiento.	2.85	
H1, Hormigueo Antes del Tratamiento.	5.54	p<0.001
H2, Hormigueo Después del Tratamiento.	2.42	
C1, Calambres Antes del Tratamiento.	6.54	p<0.001
C2, Calambres Después del Tratamiento.	2.15	

En los pacientes después de la ozonoterapia se observó una disminución sintomatológica estadísticamente significativa ($p < 0.001$). El daño oxidativo fue menor que el valor inicial (0.79 ± 0.16 vs 0.76 ± 0.11 , $p < 0.001$), mientras que la capacidad antioxidante aumentó respecto a la primera evaluación (0.25 ± 0.007 vs 0.24 ± 0.007 , $p < 0.05$). t de Student para muestra relacionadas.

Discusión

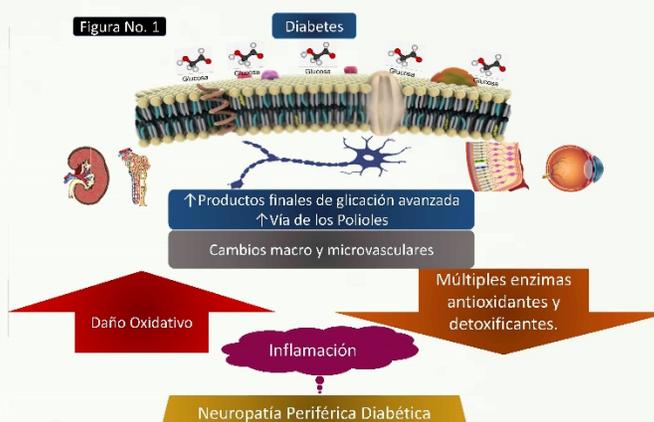


Figura No. 1. Diversos autores sugieren que el estado hiperglucémico del sujeto con diabetes mellitus tipo 2 genera productos finales de glicación avanzada, activación de la vía de los polioles favoreciendo cambios micro microvasculares en órganos importantes como, riñón, retina y tejido nervioso. En el presente trabajo se encontró una disrupción del estado redox, aumento del daño oxidativo (lípidos); disminución de la capacidad antioxidante que probablemente a su vez impactan con una disfunción del estado inflamatorio y por lo tanto de la neuropatía periférica diabética. (4,5,6,7)

Conclusión

El tratamiento con ozono en los pacientes con neuropatía periférica diabética disminuye la gravedad de los síntomas presentes, de forma significativa, sugiere la activación de algunos de los mecanismos de adaptabilidad celular en los que participa directamente el estrés oxidativo.

El aumento, tanto de la capacidad antioxidante, y la disminución del estrés oxidativo, por lo que en el presente proyecto continuaremos estudiando el mecanismo de la activación directa y/o indirecta del complejo proteínico Keap1/Nrf2, el cual regula la expresión inducible de numerosos genes de enzimas detoxificantes y antioxidantes con el fin de conocer en forma específica los mecanismos bioquímicos y moleculares implícitos en los resultados obtenidos.

Agradecimientos

Agradecimiento a CONACyT por la beca para la realización de este proyecto. Numero de Becario: 623135.

Bibliografía

- 1- Diabetes Práctica 2014;05(Supl Extr 2):1-24
- 2- Journal of Diabetes Investigación, 2011.
- 3- A. Kumar, R. Mittal, Inflammopharmacol, 2017.
- 4- Schwartz A, Martínez-Sánchez G. Ozone Therapy and Its Scientific Foundation .Rev Esp Ozonoterapia. 2012.
- 5- C.M. Spickett / Redox Biology, 2013.
- 6- Jacek Kasznicki et. al. Mol Biol Rep, 2014.
- 7- Konigsberg Feinstein M. REB, 2007.
- 8- Anil Kumar, et al. Int. J. Mol. Sci. 2014.



II Jornada Nacional de Investigación en Salud DURANGO 2018 EMPODERAMIENTO A TRAVÉS DE LA CIENCIA

El Gobierno del Estado de Durango a través de
la Secretaría de Salud

Otorga la presente

CONSTANCIA

a: Almaguer Blanco Ángel Saúl, Milla Villeda Reinaldo, Jiménez González Eulalio, Ríos
Rosales Edgar Rafael, Burciaga Nava Jorge Alberto, Barragán Ledesma Laura Ernestina,
Quintanar Escorza Martha Angélica, Alicia López Betancourt

Por su participación como **Ponente** dentro de la
II Jornada Nacional de Investigación en Salud Durango 2018
Con el tema:

**Efecto de la Ozonoterapia Sobre el Estado Oxidativo en Pacientes con
Neuropatía Periférica Diabética**

Habiendo obtenido el **Segundo Lugar** en la Categoría de **Investigación Clínica**

los días 18, 19 y 20 de octubre del 2018, en el
Centro Cultural y de Convenciones Bicentenario, Durango, Dgo.

Victoria de Durango, Dgo. octubre de 2018

Dr. José Rosas Aispuro Torres
GOBERNADOR DEL ESTADO DE DURANGO

Dr. Sergio González Romero
SECRETARIO DE SALUD Y DIR. GRAL. DE
LOS SERVICIOS DE SALUD



PARA TODOS
Dgo CONSEJO DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA



**II Jornada Nacional de
Investigación en Salud**
DURANGO 2018
EMPODERAMIENTO A TRAVÉS DE LA CIENCIA

El Gobierno del Estado de Durango a través de
la Secretaría de Salud

Otorga la presente

CONSTANCIA

a: **ÁNGEL SAUL ALMAGUER BLANCO**

Por su **asistencia** a la
II Jornada Nacional de Investigación en Salud Durango 2018
los días 18, 19 y 20 de octubre del 2018, en el
Centro Cultural y de Convenciones Bicentenario, Durango, Dgo.
Duración 16 horas con valor curricular

Victoria de Durango, Dgo. octubre de 2018

Dr. José Rosas Aispuro Torres
GOBERNADOR DEL ESTADO DE DURANGO

Dr. Sergio González Romero
SECRETARIO DE SALUD Y DIR. GRAL. DE
LOS SERVICIOS DE SALUD

COMISIÓN ESTATAL
INTERINSTITUCIONAL DE
INVESTIGACIÓN EN SALUD

