

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**IMPACTO DE LA TERAPIA DE REEMPLAZO HORMONAL SOBRE EL
PERFIL OXIDATIVO/ANTIOXIDATIVO DE LA MUJER
POSMENOPÁUSICA: UNA POSIBLE OPCIÓN PARA LA PREVENCIÓN
DE ENFERMEDADES**

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa
de Estudios de Posgrado de Ciencias Biomédicas para
optar al grado y título de Maestría Académica
en Ciencias Biomédicas con énfasis en Fisiología

CARLOS ESCALANTE GÓMEZ

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2011

Dedicatoria:

A mi esposa y a mis padres, por el apoyo incondicional durante este proceso.

Agradecimientos:

A Silvia Quesada Mora: Tutora, Profesora y Amiga. En las buenas y en las malas, siempre creyó en el proyecto y en mí. Gracias.

“Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Biomédicas de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica en Ciencias Biomédicas con énfasis en Fisiología de Sistemas.”

Patricia Cuenca Berger Ph.D.

Representante del Decana
Sistema de Estudios de Posgrado

Silvia Quesada Mora Ph.D.

Directora de Tesis

Marco Alvarado Gutierrez Ph. D.

Asesor

Alberto Alape Girón Ph. D.

Asesor

Cecilia Díaz Oreiro Ph. D.

Directora

Programa de Posgrado en Ciencias Biomédicas

Carlos Escalante Gómez

Candidato

Tabla de Contenidos

Tabla de Contenidos	iv
Resumen en español	v
Resumen en inglés	vi
Lista de Tablas	vii
Lista de Gráficas	viii
Lista de Abreviaturas	ix
Introducción	1
Objetivos	10
Hipótesis	10
Marco Teórico	12
Metodología	33
Resultados	48
Discusión	56
Conclusiones	63
Bibliografía	65
Anexo 1 Aprobación del CLOBI	76
Anexo 2 Consentimiento Informado	78

Resumen en Español

En los últimos años se ha comprobado que la mujer postmenopáusica presenta niveles mayores de estrés oxidativo y menor actividad de sus enzimas antioxidativas. Ya es bien conocido que la molécula del estrógeno tiene capacidades antioxidativas tanto *in-vitro* como *in-vivo*. Esta molécula no solo tiene capacidad antioxidativa, sino que también induce la formación de enzimas antioxidativas, como la Superóxido dismutasa. Pocos autores han estudiado el efecto que tiene la terapia de reemplazo hormonal sobre el estatus antioxidativo de la mujer posmenopáusica.

El objetivo de este estudio es evaluar marcadores de oxidación como de antioxidación en la mujer posmenopáusica y determinar el efecto que tiene sobre estos la terapia de reemplazo hormonal. El estudio incluyó 62 mujeres posmenopáusicas, las cuales se dividieron en 3 grupos: 1) 18 sin terapia de reemplazo hormonal, 2) 20 con terapia de reemplazo estrogénico, y 3) 22 con terapia de reemplazo hormonal combinada.

Los resultados mostraron que el 8OH-2dG era significativamente menor en las mujeres que recibían terapia de reemplazo hormonal combinada comparada a las que no recibían terapia de reemplazo hormonal. La oxidación lipídica fue estadísticamente menor en el grupo de mujeres que recibieron terapia de reemplazo estrogénica. La correlación de Pearson mostró una correlación inversa entre los niveles de estradiol y la oxidación lipídica. No hubo diferencias estadísticas en las mediciones de Catalasa ni de Carbonilo Protéico. No hubo diferencias significativas en la reducción de la actividad del DPPH.

En conclusión, se observó que la terapia de reemplazo hormonal disminuye el daño oxidativo en el ADN y en lípidos.

Resumen en Inglés

During the past few years, it has been shown that oxidative stress is increased in postmenopausal women and at the same time their antioxidant status suffers a decrease. It is well known that the estrogen molecule has great antioxidant capacity both, *in-vitro* and *in-vivo*. Not only does estrogen poses antioxidant capacity within itself, it has also been shown to induce certain antioxidant enzymes such as superoxide dismutase. Few authors have actually studied the effect hormone replacement therapy has on the oxidant and antioxidant status of postmenopausal women.

The aim of this study was to evaluate both oxidation and antioxidation markers in the postmenopausal woman and to determine the effects that hormone replacement therapy has over them. 62 postmenopausal women were divided in 3 groups: 1) 18 with no HRT, 2) 20 with ERT, and 3) 22 with HRT.

Results: 8-OH-2dG was significantly lower in women whom received combined HRT compared to women who didn't receive HRT. Lipid oxidation was significantly lower in women on ERT compared to women with no HRT. Pearson correlation showed that lipid oxidation decreased as estradiol concentration increased within the study range. No statistical difference was noted on protein oxidation and catalase activity among groups.

Conclusions: HRT decreases oxidative damage to both DNA and Lipids in postmenopausal women. Total Antioxidant Status may be directly related to estrogen levels in postmenopausal women.

Lista de Cuadros

Tabla 1. Características de la población seleccionada	Página 42
Tabla 2. Análisis de laboratorio complementarios	Página 43
Tabla 3. Actividad Oxidativa según uso de estrógenos	Página 44
Tabla 4. Actividad Oxidativa según uso de estrógenos solos o con progesterona	Página 45
Tabla 5. Consumo promedio diario de vegetales y frutas según el uso de estrógenos solos o con progesterona	Página 48

Lista de Gráficos

Gráfica 1. Análisis de Laboratorio Complementarios según exposición a estrógenos solos o con progesterona	Página 43
Gráfica 2. Perfil lipídico según exposición a estrógenos solos o con progesterona	Página 44
Gráfica 3. Actividad Oxidativa según uso de estrógenos	Página 45
Gráfica 4. Actividad oxidativa según el uso de Estrógenos solos o con Progesterona	Página 46
Gráfica 5. Correlación entre Niveles de Estradiol y Oxidación Lipídica	Página 47
Gráfica 6. Correlación entre niveles de Estradiol y Status Antioxidativo Total	Página 47
Gráfica 7. Correlación entre niveles de Estradiol y Status Antioxidativo Total de pacientes que recibieron TRH	Página 48

Lista de Abreviaturas

ROS : especies reactivas de oxígeno	Página 3
O ₂ ⁻ : superóxido	Página 3
H ₂ O ₂ : peróxido de hidrógeno	Página 3
ADN: ácido desoxiribonucleico	Página 4
ARN: ácido ribonucleico	Página 4
SOD: superóxido dismutasa	Página 4
GPX: glutatión peroxidasa	Página 4
CAT: catalasa	Página 4
GSH: glutatión	Página 4
Cu: cobre	Página 4
Zn: zinc	Página 4
Mn: manganeso	Página 4
EC: extra celular	Página 4
ECV: enfermedad cerebrovascular	Página 7
LDL: lipoproteina de baja densidad	Página 7
CYP: citocromo P	Página 12
SHBG: globulina fijadora de esteroides gonadales	Página 12
Era: receptor de estrógeno alfa	Página 12

Er β : receptor de estrógeno beta	Página 12
PTH: hormona paratiroidea	Página 13
HDL: lipoproteína de alta densidad	Página 13
TRH: terapia de reemplazo hormonal	Página 18
EEC: estrógenos equinos conjugados	Página 18
MDA: malonaldehido	Página 19
4-HNE: 4 hidroxinenal	Página 19
LPO: hidroperóxido lipídico	Página 20
TBARS: sustancia reductora del ácido tiobarbitúrico	Página 20
TAS: estatus antioxidativo total	Página 20
Fe: hierro	Página 20
8OH-2dG: 8hidroxi-2deoxiguanosina	Página 27
IMC: índice de masa corporal	Página 30
DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl	Página 31
ANOVA: análisis de variancia	Página 36

I. INTRODUCCION

I.1 ANTIOXIDANTES

Para hacer frente a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) las células, cuentan con enzimas y moléculas que funcionan como antioxidantes, ya que transforman los radicales libres generando productos no tóxicos. El balance entre la producción de ROS y el nivel de antioxidantes es constantemente regulado por la célula.

Las enzimas antioxidantes son esenciales para las células aeróbicas, puesto que mantienen dentro de niveles aceptables las concentraciones de especies químicas conocidas como radicales libres, que se caracterizan por presentar un electrón desapareado y por ser muy reactivas. El hecho de que la célula disponga en tanta abundancia del dispositivo defensivo constituido por las enzimas antioxidantes, pone en evidencia el importante grado de toxicidad que poseen los radicales libres¹.

Durante el metabolismo aerobio se generan pequeñas cantidades de ROS, aniones superóxido (O_2^-), y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), como respuesta a estímulos externos e internos. Estas mínimas concentraciones de ROS pueden ser indispensables en muchos procesos, como el sistema de señales intracelulares (que está relacionado con otros procesos como la proliferación celular y la apoptosis), la inmunidad, y la defensa contra microorganismos².

Por otro lado, una producción elevada de ROS puede dar lugar a estrés oxidativo, que puede causar graves disfunciones metabólicas y daño a macromoléculas biológicas¹. Existe, además, una relación entre los niveles de los factores antioxidantes y los tres tipos de moléculas

mensajeras (factores de crecimiento, prostaglandinas y óxido nítrico) implicadas en la homeostasis celular, es decir, un equilibrio entre el mantenimiento de las condiciones estáticas o constantes en el medio intracelular y el nivel de ROS³.

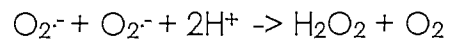
Actualmente, se le está dando gran importancia a la toxicidad que conlleva la producción de radicales libres durante los procesos biológicos donde una de las consecuencias del estrés oxidativo es la peroxidación lipídica, cuya prevención es esencial en todos los organismos aerobios, ya que los productos derivados de este proceso pueden interactuar con el ADN y son potencialmente mutagénicos. Los epóxidos formados pueden reaccionar espontáneamente con centros nucleofílicos en la célula o unirse a los ácidos nucleicos (ADN y ARN). Esta reacción puede dar lugar a citotoxicidad, alergia, mutagénesis o carcinogénesis, dependiendo de las propiedades del epóxido en cuestión^{3,4}.

Entre los sistemas de defensa de los organismos aeróbicos destacan las actividades enzimáticas superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPX), y catalasa (CAT), y entre los no enzimáticos el glutatión (GSH); el ácido ascórbico (vitamina C), alfa-tocoferol (vitamina E), beta-caroteno, vitamina A, flavonoides y ácidos fenólicos¹⁻⁴.

Por otro lado, también existe una relación entre los niveles de ROS celulares y el incremento ó descenso de las actividades de las enzimas antioxidantes. El descontrol de todas estas especies reactivas de oxígeno puede, por lo tanto, afectar a diferentes procesos esenciales del organismo, siendo una de las piedras angulares en la génesis de distintas patologías.

I.1.1 Superóxido Dismutasa (SOD)^{2,3,5}

Descubierta por McCormd y Fridovich en 1969, las SOD constituyen la primera fase de defensa antioxidante, cataliza la reacción de destrucción de los radicales superóxido (O_2^-) mediante su transformación en peróxido de hidrógeno, el cual puede ser destruido a su vez por las actividades de las enzimas catalasa o glutatión peroxidasa.



En humanos existen tres tipos de SOD: la Mn-SOD mitocondrial, la Cu/Zn-SOD citosólica y la SOD extracelular (EC-SOD).

Mn-SOD

Es un homotetrámero de 96 kDa que contiene un átomo de Mn en cada subunidad. El átomo metálico cambia su estado de oxidación desde Mn(III) a Mn(II), volviendo de nuevo a Mn(III), durante los dos pasos que constituyen la reacción de dismutación del O_2^- . La importancia biológica de la Mn-SOD se ha demostrado entre otros hechos por los siguientes:

- La inactivación de los genes de Mn-SOD en *Escherichia coli* aumenta la frecuencia de mutaciones cuando las bacterias crecen bajo condiciones aerobias.
- Ratones knock-out en esta enzima desarrollan miocardiopatías y tienen una elevada mortalidad neonatal.

Aunque el contenido de Mn-SOD en tejidos humanos es aproximadamente la mitad del contenido de Cu/Zn-SOD, la expresión de Mn-SOD es esencial para la supervivencia de la vida aerobia y el desarrollo de resistencia celular a la toxicidad inducida por las sustancias reactivas de oxígeno.

Cu/Zn-SOD

Posee dos subunidades idénticas de unos 32 kDa. Cada subunidad contiene un cluster metálico, el sitio activo, constituido por un átomo de

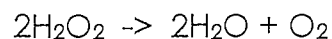
Cu y otro de Zn. La Mn-SOD es esencial para la vida, mientras que la Cu/Zn-SOD no lo es: los ratones knock out que carecen el gen Cu/Zn-SOD aparentan ser normales y sólo muestran anomalías después de un daño traumático, mientras que los que carecen del gen Mn-SOD no sobreviven más de tres semanas.

EC-SOD

Es una glicoproteína tetramérica, que contiene Cu y Zn. Se ha encontrado en los espacios intersticiales de tejidos y también en fluidos extracelulares. La EC-SOD no es inducida por su sustrato u otros oxidantes, y su regulación en tejidos de mamíferos ocurre en primer lugar de un modo coordinado por citocinas, y no como respuesta de las células individuales a los oxidantes.

1.1.2. Catalasa (CAT) ^{2,3,5}

Es una enzima tetramérica, con subunidades idénticas de 60 kDa dispuestas tetraédricamente y contiene cuatro grupos de ferroprotoporfirina por molécula. Cataliza la conversión de H₂O₂ en H₂O y O₂. Es una de las enzimas más eficientes, ya que no puede ser saturada por H₂O₂ a ninguna concentración.



Por lo tanto, el H₂O₂ es catabolizado enzimáticamente en organismos aerobios por la catalasa y otras peroxidasas. En animales, el peróxido de hidrógeno se destoxifica mediante las actividades de la catalasa y la glutatión peroxidasa. Aunque la catalasa no es esencial para algunos tipos de células en condiciones normales, tiene un importante papel en la adquisición de tolerancia al estrés oxidativo en la respuesta adaptativa de las células. La catalasa captura el H₂O₂, el cual es

permeable para la célula, antes de que pueda escapar de la célula y lo convierte en oxígeno molecular.

I.1.3. Glutación peroxidasas (GPX) ^{2,3,5}

Están formadas por cuatro subunidades idénticas, y cada una de ellas contiene un residuo de selenocisteína, que es esencial para su actividad enzimática. La GPX comparte su sustrato con la catalasa, pero además puede reaccionar de manera efectiva con lípidos y otros hidroperóxidos orgánicos, catalizando la reducción de diferentes hidroperóxidos (ROOH y H₂O₂) usando glutación reducido (GSH) que es transformado en glutación oxidado (GSSG) y así contribuye a la protección de las células de mamíferos contra el daño oxidativo.



En células animales, y especialmente en eritrocitos humanos, la principal enzima antioxidante para la detoxificación de H₂O₂ es la GPX, ya que la CAT presenta mucha menos afinidad por el H₂O₂. El ciclo redox del glutación es la mayor fuente de protección contra bajos niveles de estrés oxidativo, pero la catalasa es más importante a la hora de proteger contra el estrés oxidativo severo.

Se han encontrado al menos cinco isoenzimas de GPX en mamíferos. Aunque su expresión es ubicua, el nivel de cada isoforma varía dependiendo del tipo de tejido. La GPX1 reduce los hidroperóxidos de ácidos grasos y el H₂O₂ a expensas del glutación y se encuentra predominantemente en eritrocitos, riñón e hígado. La GPX2 citosólica (o GPX-G1) y la GPX3 extracelular (o GPX-P) se detectan escasamente en la mayoría de los tejidos, excepto en el tracto intestinal y el riñón, respectivamente. La GPX4 se localiza tanto en la fracción citosólica como

en la membrana, y se expresa mayoritariamente en células del epitelio renal y en los testículos.

1.2. ESTRÉS OXIDATIVO Y ENFERMEDADES

En los últimos años se le ha dado gran importancia al papel del estrés oxidativo en la génesis de algunas enfermedades como son la aterosclerosis y la enfermedad cardiovascular⁶⁻⁹, algunos tipos de cánceres⁹⁻¹², la enfermedad de Alzheimer^{13,14}, las cataratas¹⁵ y algunas inmunodeficiencias¹⁶. Sin lugar a duda, la relación entre alteraciones en el equilibrio oxidativo y la patogénesis de las enfermedades cardiovasculares parece ser la más importantes desde el punto de vista epidemiológico. Según las estadísticas del Ministerio de Salud de Costa Rica, las enfermedades cardiovasculares (ECV) han cobrado más vidas en los últimos diez años que todas las enfermedades malignas sumadas¹⁷. El número de defunciones por causa circulatoria en América Latina representa casi el 50% de las muertes por enfermedades no transmisibles¹⁸, y es la principal causa de muerte en los Estados Unidos, en Europa y en Japón⁸. Solamente en Estados Unidos, se estima que en 2006 se han gastado 406 mil millones de dólares para atender las complicaciones de las enfermedades cardiovasculares.

Los mecanismos por los cuales el estrés oxidativo participa en la génesis de la aterosclerosis están bien definidos¹⁹. Las altas concentraciones de LDL (lípidos de baja densidad) plasmático, favorece que estas moléculas penetren los vasos en sitios de previa lesión, de manera que se alojan en la íntima de los vasos. Aquí, estas moléculas de LDL son oxidadas por macrófagos locales y luego son ingeridas por estos

mismos macrófagos para formar células espumosas, la base de las estrías lipídicas de la aterosclerosis. Estas moléculas de LDL oxidadas también cumplen otras funciones patogénicas: 1) aumentan el reclutamiento de monocitos circulantes hacia la íntima de los vasos, aumentando la lesión; 2) inhiben el retorno de macrófagos hacia el lumen vascular; y 3) las moléculas *per se*, de LDL oxidadas pueden causar lesión celular local por medio de radicales libres^{19,20}. Aunque no se ha podido confirmar si estos mecanismos son un factor causal único o mas bien uno de muchos factores que favorece la formación de aterosclerosis, si se ha mostrado que las placas ateromatosas humanas contienen productos de peroxidación lipídica no presente en otros vasos. También se ha comprobado que los niveles de LDL oxidados son mayores en pacientes con enfermedad aterosclerótica, y que estos mismo pacientes presentan anticuerpos contra LDL oxidados²¹.

El estudio WHO/MONICA²², realizado con muestras de 16 países, mostró que los niveles de α -tocoferol en plasma presentaban una correlación inversa con el índice de muertes por enfermedad cardiovascular. El estudio Nurses Health Study²³, que incluyó 87,245 mujeres sanas entre la edad de 34-59, mostró que el grupo con mayor consumo de vitamina E, presentó un 23-50% menos incidencia de enfermedad cardiovascular en un periodo de seguimiento de 8 años. El estudio CHAOS²⁴ midió el efecto de suplementación con vitamina E en un grupo de 2000 pacientes con evidencia de enfermedad aterosclerótica y mostró una disminución en la incidencia de infartos al miocardio no fatales de un 47%. Sin embargo otros estudios como el HOPE²⁵, que incluyó a más de 9000 pacientes en alto riesgo para enfermedad cardiovascular, no logró mostrar beneficio alguno con la administración de vitamina E como antioxidante. En el estudio Women's Health Study²⁶ publicado

recientemente sobre este tema se valoró la utilidad de suplementación de vitamina E en la prevención de eventos cardiovasculares en 40,000 mujeres sanas pero no se encontró beneficio alguno de la vitamina E en la prevención de enfermedad cardiovascular. En una revisión sistemática del tema, se evidenció que en estudios observacionales las personas con un alto consumo dietético de vitaminas antioxidantes presentaban menos incidencia de enfermedad cardiovascular, sin embargo esta misma revisión rescata que en los ensayos clínicos con vitaminas antioxidantes no se observó esta disminución en la incidencia de enfermedades cardiovasculares⁸. Basándose en la fisiopatología de la enfermedad, pareciera que los antioxidantes participarían más en la prevención y no el tratamiento de la enfermedad, sin embargo aún hay mucho que definir.

Recientemente se ha mostrado que los estrógenos modulan los procesos oxidativos y antioxidativos logrando una disminución en la producción de radicales libres²⁷, un aumento en la expresión de enzimas antioxidativas^{27,28} y a la vez participando como antioxidantes directamente²⁹. Es muy llamativo que luego de la menopausia, cuando bajan los niveles de estrógenos en la mujer, la incidencia de muchas enfermedades que se han asociado a posibles causas oxidativas aumenta notablemente^{18,30}. Es de suponer que al disminuir los niveles estrogénicos en la mujer, el equilibrio oxidativo se inclinaría hacia el estrés oxidativo exponiendo a la mujer a mayor número de noxas propiciadoras de enfermedades. Aún no se ha realizado un estudio que abarque simultáneamente mediciones de producción de estrés oxidativo como niveles de enzimas antioxidativas en la mujer posmenopáusica para establecer realmente cual es el estado de esta población. Más importante, se ha sugerido que el reemplazo hormonal con estrógenos en modelos animales posmenopáusicos (monas) podría reestablecer el

equilibrio oxidativo/antioxidativo, y así prevenir o retrasar la aparición de algunas enfermedades como lo son las enfermedades cardiovasculares³¹. El presente trabajo tiene como objetivo estudiar, en la mujer posmenopáusica, indicadores de estrés oxidativo en diferentes sustratos como por ejemplo, lípidos, proteínas e inclusive ADN, y a la vez, estudiar el comportamiento de alguna enzimas antioxidantes endógena de manera que se logre establecer un verdadero perfil oxidativo de la mujer posmenopáusica. Habiendo definido un perfil, nos proponemos también estudiar el impacto que tiene la terapia de reemplazo hormonal sobre éste. Si se encontrara que la terapia de reemplazo hormonal reestablece ese desequilibrio oxidativo, se sustentarían estudios más específicos que se enfoquen en la acción propiamente antioxidante de los estrógenos para la prevención de algunas enfermedades que se presentan principalmente después de la menopausia.

II. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

II.1 OBJETIVO GENERAL

Establecer el perfil del equilibrio oxidativo, tanto de estrés oxidativo como de capacidad antioxidativa, del suero en mujeres costarricenses posmenopáusicas controladas en el Servicio de Ginecología del Hospital San Juan de Dios, y determinar la influencia que tiene sobre este perfil la terapia de reemplazo hormonal.

II.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar y comparar el nivel de oxidación lipídica en suero de:
 - mujeres posmenopáusicas sin reemplazo hormonal,
 - mujeres posmenopáusicas con reemplazo de estrógenos,
 - y en mujeres posmenopáusicas con reemplazo de estrógenos y progestágenos.
- Determinar y comparar el nivel de oxidación proteica en suero de:
 - mujeres posmenopáusicas sin reemplazo hormonal,
 - mujeres posmenopáusicas con reemplazo de estrógenos,
 - y en mujeres posmenopáusicas con reemplazo de estrógenos y progestágenos.
- Determinar y comparar el nivel de oxidación de ADN en suero de:
 - mujeres posmenopáusicas sin reemplazo hormonal,
 - mujeres posmenopáusicas con reemplazo de estrógenos,
 - y en mujeres posmenopáusicas con reemplazo de estrógenos y progestágenos.

- Determinar y comparar el nivel de antioxidantes endógenos en suero en:
 - mujeres posmenopáusicas sin reemplazo hormonal,
 - mujeres posmenopáusicas con reemplazo de estrógenos,
 - y en mujeres posmenopáusicas con reemplazo de estrógenos y progestágenos.

Hipótesis nula (H_0): La terapia de reemplazo hormonal no tiene efecto sobre el perfil oxidativo/antioxidativo de la mujer posmenopáusica

Hipótesis alternativa (H_1): La terapia de reemplazo hormonal modula el perfil oxidativo/ antioxidativo de la mujer posmenopáusica de una manera favorable, disminuyendo indicadores de estrés oxidativo y/o aumentando los niveles de enzimas antioxidantes.

Hipótesis alternativa (H_2): La terapia de reemplazo hormonal modula el perfil oxidativo/ antioxidativo de la mujer posmenopáusica de una manera desfavorable, aumentando indicadores de estrés oxidativo y/o disminuyendo los niveles de enzimas antioxidantes.

III MARCO TEORICO

III.1 FISIOLOGIA DE LAS HORMONAS SEXUALES FEMENINAS

El sistema hormonal se relaciona con las diversas funciones metabólicas del organismo y otros aspectos del mecanismo celular. Algunos efectos hormonales se producen en segundos, mientras que otros requieren varios días para iniciarse y luego persisten durante semanas, meses e incluso años. Hay dos tipos de hormona sexuales femeninas los estrógenos y la progesterona³².

Se han aislado del plasma sanguíneo de la mujer hasta seis estrógenos naturales, pero solo tres en cantidades notables: 17 β -estradiol, estrona y estriol. Son esteroides C18, es decir, no tiene un grupo metilo angular fijo a la posición 10, ni una configuración ceto- Δ^4 -3 en el anillo A. En la mujer normal existe secreción de estrógenos principalmente por la granulosa y células de la teca, los folículos ováricos, cuerpo lúteo y placenta, y cantidades mínimas por las cortezas suprarrenales. La vía biosintética implica su formación a partir de los andrógenos. También se forman por aromatización de la androstenediona en la circulación. La aromatasa (CYP19) es la enzima que cataliza la conversión de la Δ^4 -androstenediona a estrona y también cataliza la conversión de testosterona a estradiol. Tanto el 17 β -estradiol y estrona se hallan en grandes cantidades en la sangre venosa de los ovarios; el estriol es un producto de oxidación proveniente de las dos primeras. La conversión tiene lugar principalmente en el hígado, pero también, en otras partes del cuerpo^{33,34}.

Cuando se liberan hacia la circulación, los esteroides gonadales se fijan a proteínas plasmáticas. El 2% del estradiol circulante es libre. El resto está fijo a proteínas: 60% a albúmina y 38% a la globulina fijadora de esteroides gonadales (SHBG). La SHBG se sintetiza en el hígado. Ya que su síntesis se estimula por estrógenos y se inhibe por andrógenos, los valores son el doble de altos en mujeres que en hombres. Las proporciones de estradiol libre y unido no varían de modo significativo durante el ciclo menstrual; sin embargo, las diferencias en la unión pueden tener importancia clínica después de la menopausia o en mujeres con función ovárica anormal relacionada con exceso de andrógenos³³.

Los estrógenos ejercen sus efectos metabólicos al difundirse de manera pasiva a través de las membranas de las células objetivo y uniéndose a proteínas receptoras del núcleo. Se han clonado dos receptores para estrógenos: el receptor alfa (Er α) y beta (Er β). La expresión de Er α es alta en útero, testículo, hipófisis, riñón, epidídimo y suprarrenales, mientras que el Er β se expresa más en el ovario, próstata, pulmón, vejiga, cerebro y hueso. La mayor parte de las acciones de los estrógenos son a nivel de la expresión génica y están mediadas por los ER α y β . No obstante, algunos efectos son tan rápidos que es difícil creer que están mediados a nivel transcripcional. Estos incluyen efectos en la descarga neuronal en el cerebro y tal vez los efectos de retroalimentación sobre la secreción de gonadotropina. Su existencia dio lugar a la hipótesis de que además de sus acciones a nivel de la expresión génica, los estrógenos tienen otros efectos mediados por receptores de membrana³⁵.

Los estrógenos se requieren para la maduración normal de la mujer. Estimulan la maduración de la vagina, el útero y las trompas uterinas en la pubertad, así como las características sexuales secundarias, inducen el desarrollo estrófico y el crecimiento de los conductos en la mama,

causan la fase de crecimiento acelerado y el cierre de las epífisis de los huesos largos que se presenta en la pubertad, alteran la distribución de la grasa corporal para producir el contorno típico del cuerpo femenino (acumulación de grasa alrededor de las caderas y mamas). Altas cantidades estimulan el desarrollo de pigmentación en piel, principalmente en las regiones de pezones, areolas y genitales. Los estrógenos tienen una función importante en el desarrollo del recubrimiento endometrial. La exposición continua a estrógenos durante periodos prolongados, provoca hiperplasia anormal del endometrio que suele relacionarse con sangrados anormales. Cuando la producción de estrógeno está coordinada con la producción de progesterona durante el ciclo menstrual, se presentan periodos regulares de sangrado y eliminación del recubrimiento endometrial³³⁻³⁵.

Los estrógenos parecen provocar, en parte, el mantenimiento de la estructura normal de la piel y vasos sanguíneos en mujeres, disminuyen el índice de resorción de hueso al antagonizar el efecto de la hormona paratiroidea (PTH); pero no estimulan la formación de dicho hueso³², tienen efectos importantes en la absorción intestinal, ya que reducen la motilidad de este órgano. Además de estimular la síntesis de enzimas que causan crecimiento uterino, alteran la producción y actividad de muchas otras enzimas en el cuerpo, aumentan la síntesis de proteínas de fijación y transporte en el hígado, incluso para el estrógeno, testosterona y tiroxina. Los estrógenos pueden incrementar la coagulabilidad de la sangre. Se ha informado sobre cambios en los factores que influyen en la coagulación, incluso el aumento de los valores circulantes de los factores II, VII, IX y X, y la disminución de los valores de antitrombina III, hay informes sobre aumento de valores de plasminógeno y disminución de adhesividad de las plaquetas^{35,37}.

Los estrógenos disminuyen la oxidación a cetonas de los lípidos del tejido adiposo e incrementan la síntesis de triglicéridos. Las alteraciones en la composición de los lípidos del plasma provocados por estrógenos incluyen: aumento en las lipoproteínas de alta densidad (HDL, del inglés high density lipoprotein), discreta reducción en las lipoproteínas de baja densidad (LDL, del inglés low density lipoprotein) y reducción en los valores de colesterol plasmático. Aumentan los valores de triglicéridos plasmáticos lo mismo que los depósitos de grasas. Influyen en la libido en humanos, facilitan la pérdida del líquido intravascular hacia el espacio extracelular, lo cual produce edema^{32,33}.

Los estrógenos provocan en las mamas depósitos de grasa, desarrollo del estroma y crecimiento de un amplio sistema de conductos. Los lobulillos y los alvéolos de la mama se desarrollan en grado ligero, pero son la progesterona y la prolactina las que estimulan el crecimiento y función de estas estructuras, permitiendo la lactancia³³.

En el hígado, el estradiol circulante se convierte con rapidez en estrona mediante la 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa. Un poco de la estrona reingresa a la circulación; sin embargo, la mayor parte de ella se metaboliza en 16-hidroxiestrone (que entonces se convierte en estriol) o 2 o 4-hidroxiestrone (estrógeno catecol). Los estrógenos catecol con actividad biológica se convierten en los compuestos 2-metoxi y 4-metoxi mediante la catecol-O-metiltransferasa. Mucha de la estrona remanente se conjuga para formar sulfato de estrona. El estriol se convierte principalmente en estriol 3-sulfato-16-glucurónido antes de su excreción por el riñón. El hígado también conjuga los estrógenos para formar glucurónidos y sulfatos; aproximadamente la quinta parte de estos productos conjugados es eliminada con la bilis, y cantidades menores pasan a la orina. El hígado también combina los estrógenos en forma lábil

para formar la denominada estroproteína; es principalmente en esta forma como circulan los estrógenos en los líquidos extracelulares.

Así pues, el hígado desempeña papel clave en el metabolismo de los estrógenos; como es, la transformación de estrógenos como el potente estradiol y estrona en un estrógeno casi totalmente inactivo, el estriol, y en consecuencia secreta cantidades moderadas hacia el intestino, la disminución de las funciones hepáticas en realidad aumentan actividad de los estrógenos en el cuerpo, ocasionando a veces hiperestrogenismo^{34,35}.

La progesterona es un esteroide C21 secretado por el cuerpo lúteo y la placenta. Es un intermediario importante en la biosíntesis de esteroides y pueden entrar pequeñas cantidades producto de las suprarrenales. Cerca del 2% de la progesterona en la circulación es libre, mientras que 80% está fijo a la albúmina y 18% a la SHBG. Esta hormona tiene una vida media corta, y es convertida en el hígado a pregnandiolo^{34,37}.

Los efectos de la progesterona, como los de los esteroides, son producidos por una acción sobre el ADN para iniciar síntesis de nuevo mRNA. El receptor de progesterona se fija a la proteína de choque térmico en ausencia de esteroides, y la fijación de progesterona libera a la proteína de choque calórico, exponiendo el dominio de fijación de ADN del receptor. Existen dos isoformas del receptor para progesterona, producidas por el procesamiento distinto de un mismo gen, pero aun no se conoce el significado fisiológico de estas dos isoformas^{34,35}.

Los principales órganos blancos de la progesterona son útero, mama y cerebro; es la responsable de los cambios progesteronales del endometrio. Tiene efecto antiestrogénico sobre las células del miometrio. Disminuye el número de receptores de estrógenos en el endometrio y aumenta la rapidez de conversión del 17β -estradiol a estrógenos menos

activos. En la mama, la progesterona estimula el desarrollo de alvéolos y lóbulos. Los efectos de retroalimentación de la progesterona son complejos y se ejercen tanto a nivel hipotalámico como hipofisiario. Las dosis grandes de progesterona inhiben la secreción de LH, y potencian los efectos inhibitorios de los estrógenos, previniendo la ovulación. La progesterona tiene propiedades termogénicas y puede estimular la respiración. En dosis altas, la progesterona produce natriuresis, quizá al bloquear la acción de la aldosterona sobre el riñón³³⁻³⁵.

III.2 MENOPAUSIA

La menopausia es el punto en el tiempo de una mujer en el que ocurre el cese permanente de la menstruación después de la pérdida de la actividad ovárica^{16,35}. El término menopausia se deriva del griego "men" (mes) y "pauis" (cese). Los años previos a la menopausia que comprenden el cambio de los ciclos ovulatorios normales al cese de las menstruaciones es conocido como el periodo perimenopáusico, caracterizado por ciclos menstruales irregulares. El término "climaterio" se refiere al periodo de tiempo por el que pasa una mujer desde su estadio reproductivo de la vida hasta la senectud a través de la transición perimenopáusica, la menopausia y los años posmenopáusicos iniciales. El comienzo del climaterio se asocia con el declive de la actividad ovárica acompañada de niveles bajos de estrógenos circulantes³⁸. Las concentraciones reducidas de estradiol en plasma son las responsable de la amenorrea que define la menopausia y contribuyen a que aparezcan síntomas como los característicos bochomos, sequedad vaginal, dispaurenia y disuria que se presentan en las mujeres que atraviesan el climaterio³⁵. En mujeres propensas, los cambios que se relacionan con el

climaterio pueden llevar a la osteoporosis³⁹ y las enfermedades cardiovasculares ^{40,41}.

Hasta donde se sabe, los síntomas que con seguridad dependen de la deficiencia ovárica son los de inestabilidad vasomotora, tales como los bochornos, vértigos pasajeros y tal vez, la cefalea. Otro gran número de síntomas se ha atribuido a la falta de estrógenos, simplemente, porque a veces la mujer menopáusica los refiere.^{35,42}. Existen una serie de cambios corporales que ocurren gradualmente. La piel pierde elasticidad y se arruga, el cabello encanece y se cae, mientras que la cara aumenta en su pilosidad y el tono de la voz se hace más grave con evidentes signos de desfeminización. Los senos pierden firmeza por alteraciones en el tejido conectivo y la grasa en el abdomen se distribuye irregularmente⁴³. En el climaterio se deben distinguir las manifestaciones psicológicas originadas directamente por los cambios fisiológicos y somáticos debido a la insuficiencia hormonal. El más frecuente de los trastornos psicológicos es la labilidad emocional, en la que existe una hipersensibilidad con tendencia a la irritabilidad y al llanto fácil^{34,37}.

El hueso es un tejido de compleja actividad, en el cual se repiten constantemente ciclos de destrucción y reemplazo por elementos nuevos y sanos, de acuerdo a los cambios en el balance de actividad osteoclástica y osteoblástica. La deficiencia de estrógenos incrementa la tasa de remodelación, con un aumento de la resorción que supera la formación de tejido nuevo, llevando a la pérdida de tejido, de mineral y de microarquitectura del hueso trabecular, lo que se conoce como osteopenia – osteoporosis⁴⁴.

La enfermedad cardiovascular (ECV), y en especial, la enfermedad cardíaca coronaria, constituyen la primera causa de morbimortalidad en las mujeres menopáusicas. La deficiencia estrogénica presente durante la

posmenopausia, estimula una serie de cambios metabólicos adversos en los lípidos, lipoproteínas, secreción de insulina y en el flujo sanguíneo arterial. A partir de la menopausia se incrementan los niveles de colesterol y lipoproteínas de baja densidad (LDL)^{30,33,40}. También existe descenso de los niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL). Esto hace al perfil lipídico de la mujer posmenopáusica muy parecido al del hombre, igualándose la frecuencia de ECV entre estos y mujeres posmenopáusicas después de los 65 años. Se han relacionado con alto riesgo de padecer enfermedad coronaria las alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos, la resistencia a la insulina y la baja producción de insulina. Clásicamente se le ha dado gran importancia al perfil lipídico de la persona como uno de los factores de riesgo para las ECV. Actualmente, se ha mostrado que la oxidación de lípidos, específicamente LDL, juegan un papel primordial en la patogénesis de la aterosclerosis^{8,19,20}. Los niveles altos de LDL favorecen que estas moléculas ingresen al espacio subendotelial vascular donde son expuestas a macrófagos y células de músculo liso entre otros. Los LDL oxidados estimulan la quimotaxis de monocitos, previenen la migración de monocitos, y favorecen la formación de células espumosas, las cuales forman parte del proceso inicial ateromatoso. El LDL oxidado también puede causar disfunción y lesión endotelial lo cual contribuye a la lesión vascular. Aunque no se ha logrado establecer al estrés oxidativo como efecto causal único de la aterosclerosis, es bien aceptado que es un factor importante en su desarrollo.

III.3 TERAPIA DE REEMPLAZO HORMONAL

La terapia de reemplazo hormonal (TRH) se basa principalmente en la administración exógena de estrógenos para mitigar los signos y síntomas climatéricos. La prevalencia de TRH en Latinoamérica es muy baja. En 1990 solo 2.8% de las mujeres recibían TRH, en 1998 la recibían un 5,6%. Las mujeres que utilizan TRH en mayor proporción en Latinoamérica pertenecen a las clases económicas más solventes, con un 18% de prevalencia¹⁸.

Existen múltiples esquemas y presentaciones farmacológicas para poder individualizar la terapia a cada persona⁴⁵. En las mujeres que no tiene útero, ya sea por antecedente de histerectomía o por agenesia del mismo, se les da reemplazo hormonal solo con estrógenos, y se le llama terapia de reemplazo estrogénico (TRE). En las mujeres que aún conservan su útero en el momento del climaterio recibirán estrógenos y se les adiciona algún progestágeno, generalmente acetato de medroxiprogesterona, para disminuir el riesgo de hiperplasia endometrial y, por ende, el riesgo de cáncer endometrial. Generalmente al esquema que incluye estrógenos y progestágenos, se le llama TRH, sin embargo aún es común que se utilice este término para referirse a la terapia de reemplazo de manera general. Existen esquemas continuos y secuenciales, los cuales se adaptan a la situación de cada mujer. Las presentaciones más usadas son la oral, le siguen los parches, los inyectables y finalmente la presentación en gel¹⁸.

Los estrógenos disponibles para uso hoy en día incluyen: los estrógenos equinos conjugados (EEC), el sulfato de estrona piperazina, el estradiol microionizado y el valerato de estradiol⁴⁶. En América Latina los EEC son los más utilizados¹⁸. Se ha reportado en la literatura que las preparaciones comerciales de estrógenos equinos contienen 10 sustancias esteroideas estrogénicas de la orina de yeguas preñadas⁴⁶, estos son los

ésteres sulfatados de estrona (50-57%), 17 β -estradiol, 17 α -estradiol, (2-10%), aequilina (21-28%), equilenina, 17 α -dihidroequilina (13-19%), 17 α -dihidroequilenina, 17 β -dihidroequilina (0.5-4%), 17 β -dihidroequilenina y Δ -8-estrona. Solamente el 17 β -estradiol se forma en el organismo humano y por lo tanto es natural para los humanos^{47,48}. La diferencia clínica de las equilinas equino-específicas en contraste con el estradiol consiste en la adición de dobles enlaces en el anillo B, cambiándolo en un esteroide de doble anillo no saturado. En general, los metabolitos estrogénicos equino-específicos se comportan en una forma cualitativamente similar a los metabolitos de estradiol humano. Sin embargo, parece que existen diferencias que hacen que los estrógenos equinos cuenten con mayor potencia estrogénica y sean excretados más rápidamente⁴⁹.

Los estrógenos ejercen sus efectos metabólicos de manera que la mujer va mejorando progresivamente sus síntomas. Los resultados indican que dosis diarias orales son efectivas para reducir el número y la severidad de los bochornos asociados con la menopausia^{34,35,45}. El número de receptores estrogénicos nunca desaparece en su totalidad, por lo que la administración exógena de estrógenos permite recuperar el número y la afinidad de ellos. La sintomatología producida por los cambios atróficos genitales mejoran rápidamente, e incluso, con poca cantidad de estrógenos⁵⁰. Los estrógenos estimulan la secreción pancreática de insulina y la sensibilidad periférica de la misma, disminuyendo las hiperglicemias. Se sabe que los estrógenos mejoran el perfil lipídico, aumentando las HDL y disminuyendo las LDL. Los estrógenos tienen efecto directo sobre la masa ósea a través de los receptores estrogénicos en el hueso, reduciendo la velocidad del remodelado óseo y la pérdida de masa ósea⁴⁴. Se menciona que los estrógenos podrían jugar un papel en la evolución de la

Enfermedad de Alzheimer, pero aún no hay resultados definitivos que apoyen esta afirmación^{18,35}.

III. 4 EFECTO ANTIOXIDANTE DE LOS ESTROGENOS

Durante el climaterio o etapa perimenopáusica el cuerpo y el metabolismo de una mujer cambia de forma importante y, los mecanismos que regulan el estrés oxidativo no son la excepción. En los últimos años se han realizado estudios que ligan esta disminución en los niveles de estrógenos con cambios en el comportamiento oxidativo / antioxidativo de la mujer, sin embargo el panorama aún no está claro.

En estudios realizados con animales de experimentación se han evidenciado estos cambios; Strehlow y cols.²⁸ mostraron una disminución de ecSOD y MnSOD y un aumento de producción de radicales libres en ratas asociado a niveles decrecientes de estrógenos luego de ser ooforectomizadas. Mientras que Wassmann y cols.²⁷ evidenciaron un aumento en la actividad de NADPH oxidasa y en la producción de la superóxido dismutasa en ratas luego de ser ooforectomizadas.

Recientemente, Signorelli y cols.⁵¹ lograron demostrar que el nivel de estrés oxidativo, representado por los niveles plásmaticos de 4-hidroxyenal (4-HNE) y maldonaldehido (MDA) y por la capacidad oxidativa de LDL del plasma, estaba aumentado significativamente en la mujer posmenopáusica comparada con la mujer "fértil". Algo digno de destacar de este estudio, es que se realizó un análisis de características de las poblaciones, y se descartó a la edad como factor causal del incremento de estrés oxidativo. Utilizando los niveles de hidroperóxido lipídico (LPO), como indicador de producción de radicales libres y de

daño oxidativo de los lípidos de la membrana, Bednarek-Tupikowska y cols.⁵² demostraron que había un mayor nivel de lesión o estrés oxidativo en la mujer posmenopáusica comparada con la premenopáusica. Además, en este mismo estudio, evidenciaron una relación inversa estadísticamente significativa entre los niveles de estrógeno y los niveles de estrés oxidativo, mejor dicho, a menor nivel de estrógeno mayor evidencia de lesión oxidativa. Sin embargo en otros estudios^{53,54} no han encontrado diferencia significativa entre los niveles de estrés oxidativo de mujeres pre y post menopáusica utilizando como indicador de estrés los niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en plasma, además tampoco se ha evidenciado una relación inversa entre los niveles estrogénicos y los indicadores de estrés oxidativo.

Los mismos autores también han investigado los cambios en los niveles de antioxidantes asociados a la menopausia. Signorelli⁵¹ evidenció menor actividad del antioxidante glutatión peroxidasa (GSH-PX) en el grupo de mujeres posmenopáusicas comparadas con el grupo de mujeres premenopáusicas. Unfer⁵³, en un estudio más detallado, evidenció que los niveles totales de superóxido dismutasa (SOD) eran significativamente menores en mujeres posmenopáusica que en mujeres premenopáusicas. Sin embargo, no encontró diferencias significativas en los niveles de GSH-PX ni catalasa (CAT) entre los grupos de mujeres pre y posmenopáusicas. Otros autores^{52,55} midieron el status antioxidativo total (TAS) de un grupo de 55 mujeres y evidenciaron que el grupo posmenopáusico tenía niveles de TAS significativamente menores que el grupo premenopáusico, y a la vez lograron mostrar una correlación entre la disminución de estrógenos y la disminución de TAS. Bednarek-Tupikowska⁵² también midió el (TAS) en un grupo de mujeres pre y postmenopáusico y mostró niveles de TAS

significativamente menores en el grupo posmenopáusico y además logró correlacionarlo con niveles decrecientes de estrógenos.

Según los estudios anteriores, pareciera que la menopausia se asocia con niveles aumentados de estrés oxidativo y niveles disminuidos de antioxidantes enzimáticos. Aún no se sabe claramente cuáles son los mecanismos fisiológicos de estos cambios, pero algunos autores lo han asociado con el incremento de enfermedades en el periodo posmenopáusico.

En los últimos diez años, la terapia de reemplazo hormonal (TRH), como tratamiento de los síntomas climatéricos, ha tenido un gran auge. Además de sus efectos sobre los síntomas climatéricos, la terapia de reemplazo con estrógenos exógenos se ha mostrado beneficiosa en algunas patologías como la osteoporosis^{56,57}. Los posibles efectos cardioprotectores de la terapia de reemplazo estrogénica aún no están bien definidos⁴⁰, sin embargo parece que el inicio temprano de esta terapia en el climaterio podría tener efectos beneficiosos para el aparato cardiovascular. Esta controversia de los efectos cardioprotectores de los estrógenos ha impulsado recientemente estudios sobre los efectos antioxidativos de los estrógenos como un posible mecanismo preventivo para enfermedades cardiovasculares.

Los estrógenos per se, son antioxidantes^{29,60-62}, ya que poseen un anillo fenol, el cual puede actuar como un barrador de radicales libres y a la vez le permite donar un átomo H⁺^{54,61}. Esta propiedad le permite al estrógeno intervenir en diferentes etapas de la oxidación lipídica. Estudios *in vitro* han evidenciado la capacidad antioxidativa de los estrógenos al disminuir la oxidación de LDL y el CuSO₄, e inclusive se ha mostrado una disminución de lesiones inducidas por radicales libres en cadenas de ADN⁵⁵. Se ha mostrado que los diferentes estrógenos y sus metabolitos

poseen diferentes capacidades antioxidativas^{63,64}. En un estudio comparativo *in vitro* entre algunos tipos de estrógenos, se logró evidenciar niveles antioxidativos diferentes entre las diferentes moléculas, de manera que la capacidad antioxidativa se clasifica de mayor a menor así: estradiol > estrona > equilin > estriol⁶⁴. Mientras que Subbiah⁶¹, clasifica a los estrógenos equinos como los estrógenos con mayor capacidad antioxidativa, el estradiol y la estrona, junto a sus metabolitos catecol han mostrado capacidad antioxidativa en concentraciones micromolares, mientras que los metabolitos metoxi mostraron la misma capacidad antioxidativa a concentraciones picomolares⁶³. Los metabolitos estrogénicos, catecolestrógenos y metoxiestrógenos, además de funcionar como rastreadores de radicales libres, también lograron reducir y mantener reducidas las moléculas de Fe y Cu, lo cual previene que estas moléculas actúen como oxidantes⁶³. Otro estudio ha evidenciado que el estradiol es igual de efectivo que la vitamina E en prevenir la oxidación de LDL⁶⁵, e igual o más efectivo que la SOD y CAT.

Los estrógenos no solo participan como antioxidantes *per se*, sino que también pueden modificar los niveles y capacidades de los mecanismos oxidativos y antioxidativos del cuerpo. Strehlow²⁸ logró mostrar que el estradiol disminuía la producción de radicales libres inducido por la angiotensina II en cultivos celulares de músculo liso. Wassmann²⁷ mostró que el estradiol aumenta la transcripción, expresión y actividad de MnSOD y de ecSOD sin afectar los niveles o actividad de la Cu-ZnSOD, GSH-PX ni catalasa. Ayres y cols.⁶⁰ mostraron que los estrógenos podían disminuir la producción de superóxido en células endoteliales de corazones bovinos.

Otro factor que se tiene que tomar en cuenta, es que la terapia de reemplazo hormonal (TRH) incluye la administración de progestágenos cuando la mujer aún tiene útero. Esto se presta para más confusión dado

que hay estudios sugiriendo que la progesterona tiene efecto antioxidativo mientras otros afirman que no tiene efecto antioxidativo y otros inclusive le atribuyen efecto prooxidativo. Wassmann y cols.²⁷ estudiaron los efectos de la progesterona en cultivos celulares de músculo liso vascular de rata y mostraron que la progesterona disminuía los niveles, actividad, y transcripción de la ecSOD y MnSOD. También se evidenció que la progesterona revertía los efectos beneficiosos de los estrógenos sobre la ecSOD y MnSOD y aumentaba la producción endógena de especies reactivas de oxígeno en el músculo liso vascular. Arteaga y cols.⁶⁴ mostraron que los diferentes tipos de progestágenos, por sí solos, no modificaban la oxidación de LDL *in vitro*. También estudiaron el efecto antioxidativo de los estrógenos junto a progestágenos, mostrando que el efecto antioxidativo observado por los estrógenos no fue modificado por el norgestrel ni la noretidiona, pero sí por la progesterona y acetato de medroxiprogesterona, los cuales a dosis altas más bien potenciaron la capacidad antioxidativa del estrógeno.

Basándose en el hecho que en la menopausia hay un cambio en el balance oxidativo / antioxidativo, y que se ha mostrado que los estrógenos pueden actuar como antioxidantes *in vitro*, algunos autores se han dado la tarea de estudiar el impacto que la terapia de reemplazo podría tener en el balance oxidativo/antioxidativo de la mujer posmenopáusica.

Ke y Todd⁶⁷ estudiaron el efecto de la TRH (estrógenos + progesterona) sobre la producción de estrés oxidativo en la mujer posmenopáusica. Utilizaron el 8-epi-prostaglandina F_{2α} como indicador de oxidación del ácido araquidónico de los fosfolípidos de membranas, y valoraron sus niveles después de 6 semanas de TRH. Ellos observaron una disminución de los niveles de 8-epi-prostaglandina F_{2α} y concluyeron que la

TRH, inclusive en periodos cortos, disminuye el estrés oxidativo en las mujeres posmenopáusicas.

McManus y cols.⁶⁸ estudiaron el efecto de diferentes tipos de TRH sobre la capacidad oxidativa del plasma de mujeres posmenopáusicas y no encontraron diferencias significativas entre la capacidad de oxidación de LDL del plasma de mujeres que recibían TRH de las que no recibían TRH, llegando a la conclusión que "los estrógenos no proporcionaban un efecto antioxidativo *in vivo*".

Inal y cols.⁶⁹ midieron los niveles de SOD, GSH-PX y MDA en suero en un grupo de mujeres que iniciaba TRH solo con estrógenos y un grupo que iniciaba TRH con estrógenos y progesterona. Luego de seis meses de tratamiento, el estudio no mostró una mejoría significativa en la capacidad antioxidativa de ninguno de los dos grupos.

Özden y cols.⁷⁰ midieron los niveles plasmáticos de TBARS y los niveles eritrocitarios de TBARS, GSH-PX y GSH en mujeres posmenopáusicas con y sin TRH. El estudio mostró que el grupo de mujeres utilizando TRH presentaban niveles de TBARS plasmáticos y eritrocitarios más bajos que el grupo que no recibía TRH. También se mostró que el grupo de mujeres que recibía TRH presentaban niveles de GSH-PX y GSH eritrocitarios más altos que el grupo que no recibía TRH. Özden hizo una comparación de las subpoblaciones de TRH y no logró encontrar diferencias significativas entre los grupos de mujeres que recibían solo estrógenos y las que recibían estrógenos y progesterona.

Unfer y cols.⁵³ compararon un grupo de mujeres posmenopáusicas con y sin TRH, y no encontraron diferencias significativas entre niveles plasmáticos de CAT, GSH-PX ni TBARS; sin embargo sí se evidenció que el grupo que recibía TRH tenía niveles mayores de SOD. Inclusive, Unfer anotó

que había una tendencia a niveles mayores de SOD en las mujeres que recibían TRH con progesterona que las que solo recibían estrógenos.

Bednarek-Tupikowska⁵² evidenciaron niveles menores de LPO y niveles mayores de TAS en un grupo de mujeres posmenopáusicas recibiendo TRH comparadas con un grupo que no recibía TRH. También analizó las sub-poblaciones de TRH, y no encontró diferencias entre las mujeres que recibían solo estrógenos y las que recibían estrógenos y progesterona.

Naziroglu y cols.⁷¹ lograron hacer una comparación más amplia entre mujeres posmenopáusicas " sanas " con y sin TRH (estrógenos + progesterona) y entre mujeres posmenopáusicas diabéticas con y sin TRH (estrógenos + progesterona). En el grupo de mujeres posmenopáusicas " sanas " la utilización de TRH por 6 semanas no causó aumento significativo en los niveles plasmáticos de GSH-PX, GSH ni catalasa, aunque sí causó una disminución significativa de MDA. Sin embargo, en el grupo de mujeres posmenopáusicas diabéticas la utilización de TRH por 6 semanas sí causó un aumento significativo en los niveles plasmáticos de GSH-PX, GSH y catalasa, y también logró una disminución significativa de MDA. Estos mismos autores también estudiaron el efecto antioxidativo a nivel eritrocitario. En el grupo de mujeres posmenopáusicas " sanas " la utilización de TRH por 6 semanas sí causó aumento significativo en los niveles eritrocitarios de GSH-PX, pero no de GSH ni catalasa, y también logró una disminución significativa de MDA. En el grupo de mujeres posmenopáusicas diabéticas, la utilización de TRH por 6 semanas logró un aumento significativo en los niveles eritrocitarios de GSH-PX, GSH y catalasa, y como era de esperar, logró una disminución significativa de MDA.

Wen, y cols.⁷² siguieron a 18 mujeres que iniciaron TRH (estrógenos + progesterona) y les midieron la capacidad oxidativa de LDL del plasma a los 3 y 6 meses de tratamiento; tampoco logró demostrar diferencia en la capacidad oxidativa de las mujeres antes y después de TRH durante 6 meses.

Bureau y col.⁷³ estudiaron el impacto de la TRH (estrógenos + progesterona) sobre la capacidad antioxidativa en la mujer posmenopáusicas. Midieron los niveles de Zn-CuSOD y GSH-PX en eritrocitos de mujeres recibiendo TRH y otras que recibían placebo; no se logró mostrar diferencia en la capacidad antioxidativa entre las mujeres que recibían TRH y las que no.

Bureau y col.⁷⁴ en otro estudio compararon los niveles de TBARS, capacidad de oxidación de LDL y TAS en mujeres posmenopáusicas con o sin TRH (estrógenos + progesterona). Este estudio no mostró diferencia en la capacidad de oxidación de LDL entre los grupos, pero sorprendentemente se encontró que el grupo con TRH mostró niveles de TBARS significativamente mayores y niveles de TAS significativamente menores que el grupo de mujeres sin TRH. En un estudio aparte pero relacionado al tema, Strehlow y cols.²⁸ estudiaron los cambios agudos de algunos antioxidantes en pacientes en tratamiento de infertilidad para analizar el impacto de un aumento súbito en los niveles endógenos de estrógenos. Ellos mostraron que en pacientes en las cuales se inducía la ovulación había aumentos súbitos de los niveles de ecSOD y MnSOD, los cuales se relacionaban con el aumento en el nivel de estrógenos.

Lo difícil de analizar el efecto general de los estrógenos con o sin progestágenos sobre el equilibrio oxidativo/antioxidativo *in vivo*, es que la gran mayoría de los autores estudian solamente uno o dos componentes del sistema antioxidativo. Esto resulta en estudios que a veces se

contradicen y que más bien dejan preguntas sobre los componentes no estudiados. Pareciera que los estrógenos sí modifican el equilibrio oxidativo/antioxidativo *in vivo* al disminuir un poco el estrés oxidativo y a la vez por mejorar los niveles y actividad de algunos antioxidantes como SOD. Igual que en la población menopáusica sin TRH, no existen estudios que analicen indicadores totales e individuales de estrés oxidativo junto a niveles totales e individuales de antioxidantes, logrando establecer si verdaderamente hay cambios asociados a la TRH. También queda por definir si el agregar progestágenos a los estrógenos influye o no sobre el equilibrio oxidativo / antioxidativo final de la mujer.

III.5 ANÁLISIS DE ESTRÉS OXIDATIVO Y CAPACIDAD ANTIOXIDATIVA

Antes de afirmar que el efecto antioxidativo de los estrógenos es el mecanismo de protección de varias enfermedades, es importante definir si el reemplazo estrogénico, con o sin progesterona, realmente cambia el perfil oxidativo/antioxidativo de la mujer menopáusica *in vivo*. Para lograr hacer un análisis completo del perfil oxidativo/ antioxidativo de la mujer posmenopáusica con o sin TRH se medirán tanto indicadores de estrés oxidativo como actividad de enzimas antioxidativas^{75,76}.

En los estudios anteriores se ha mencionado que la menopausia se asocia con niveles aumentados de estrés oxidativo. Actualmente existen indicadores generales y otros más específicos del estrés oxidativo *in vivo*. Dado que el nivel "total" de estrés oxidativo es muy difícil de medir, se estudian básicamente tres compartimentos: oxidación de lípidos, oxidación de proteínas y oxidación de ADN. A continuación mencionaremos los principales.

- Peróxido de hidrógeno: los niveles de peróxido de hidrógeno en orina se han utilizado por diferentes autores como un indicador "general" de la producción endógena de ROS, logrando así una representación general del estrés oxidativo presente^{77,78}.
- 8-Isoprostanoide⁷⁹: La familia de los isoprostanoides es una familia de eicosanoides de origen no enzimático producidos por la oxidación de fosfolípidos de los tejidos. Algunos isoprostanoides, como por ejemplo el 8-isoprostanoide también conocido como 15-isoprostanoide F_{2t}, han mostrado tener actividad biológica vasoconstrictora, y se han relacionado con algunos procesos de aterosclerosis, artritis reumatoide y carcinogénesis.
- TBARS: la medición de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico es un método ampliamente aceptado para la medición de la peroxidación lipídica⁷⁵. A pesar de su aceptación, existe controversia sobre la reactividad de TBARS con sustancias que no sean MDA, por lo que podría limitar o subestimar los niveles de peroxidación lipídica⁸⁰.
- Carbonilo proteico: es por mucho el indicador más utilizado para medir la oxidación de proteínas. Cationes, como por ejemplo el Fe²⁺ y Cu²⁺, pueden unirse a cadenas proteica y con la ayuda de H₂O₂ pueden transformar los grupos amino de las cadenas laterales de proteínas en grupos carbonilos^{81,82}.
- 8-hidroxy-2'-deoxyguanosina (8-OHdG)⁸³: 8-OHdG es una base modificada, la cual es el resultado de lesiones del ADN secundario a radicales hidroxilos. Generalmente es formada en periodos de metabolismo aeróbico intenso o situaciones de estrés oxidativo. Se han asociado niveles altos de 8-OHdG con enfermedades tales como aterosclerosis; enfermedad de Alzheimer y diabetes.

Para medir el estatus antioxidativo de una persona, se pueden medir niveles totales o se pueden medir individualmente algunas de las enzimas antioxidativas:

- Status antioxidativo total (TAS): los sistemas antioxidativos incluyen las enzimas (SOD, CAT, GSH-Px), macromoléculas (albúmina, ceruloplasmina y ferritina), y micromoléculas (ácido ascórbico, α -tocoferol, β -carotenos, ácido úrico y bilirrubinas). El TAS logra medir la suma de todos los sistemas antioxidativos en un momento dado, de manera que representa la capacidad antioxidativa real de un individuo y no solo la de una sustancia. El método se basa en la habilidad de los antioxidantes en la muestra de inhibir la oxidación de ABTS (2,2'-Azino-di[3-ethylbenzthiazoline sulphonate]) a ABTS⁺⁸⁴.
- Superóxido dismutasa (SOD)^{1,3}: las superóxido dismutasas son metaloenzimas que catalizan la dismutación del anión superóxido a oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno. Existen tres tipos diferentes, los cuales se pueden medir individualmente por algunos métodos laboriosos, o se puede medir el nivel total de SOD como representante de la actividad de los tres tipos en una muestra dada.
- Glutatión peroxidasa (GSH-Px)^{1,3}: la GSH-Px cataliza la reducción de hidroperóxidos, incluyendo el peróxido de hidrógeno, y actúa como mecanismo de defensa contra el daño oxidativo.
- Catalasa (CAT)^{1,4}: la CAT cataliza la conversión de dos moléculas de peróxido de hidrógeno a oxígeno molecular más dos moléculas de agua, actuando también como mecanismos de defensa antioxidativo.

IV. METODOLOGIA

IV.1 POBLACION: mujeres costarricenses posmenopáusicas que tiene su control climatérico en el servicio de Ginecología del Hospital San Juan de Dios

IV.2 MUESTRA: se utilizó un muestreo intencional no aleatorizado de 75 mujeres.

A las mujeres menopáusicas que llegaron a la consulta del Hospital San Juan de Dios para su control ginecológico se les entregó una copia del consentimiento informado junto a una copia de la siguiente entrevista para definir su participación o no en el estudio. Estos documentos fueron entregados por la enfermera de la consulta.

Nombre:

Peso:

Edad:

Talla:

1. Fecha aproximada de la última menstruación:

Hace menos de un año

Hace más de un año

2. Su menopausia fue:

Natural

Por razones de cirugía

3. Utiliza usted algún tipo de terapia de reemplazo hormonal?

No

- Sí. Cuál?
- Solamente estrógenos
 - Estrógeno y progesterona
4. Cuánto tiempo tiene de usar la terapia de reemplazo hormonal?
- Menos de 1 año
 - 1-2 años
 - 3-5 años
 - Más de 5 años
5. Fuma usted actualmente?
- No.
 - Sí.
- Hace cuanto es fumadora? _____
6. Marque si padece usted de alguno o algunos de los siguientes tipos de enfermedades:
- Diabetes mellitus
 - Hipertensión arterial no compensada
 - Enfermedad cardíaca no compensada
 - Enfermedad tiroidea no compensada
 - Enfermedades inmunosupresoras (problemas de las defensas) ej. SIDA
 - Enfermedades autoinmunes, ej: Lupus, Artritis reumatoide
 - Anote si padece de alguna otra enfermedad no mencionada antes: _____
7. Utiliza usted algún tipo de suplemento multivitamínico:
- Sí
 - No

8. Utiliza usted algún tipo de suplemento de "estrógenos naturales" u homeopatía para los síntomas menopáusicos?

Sí

No

9. Utiliza algún tipo de medicamento todos los días:

Sí. Cuál (es): _____

No

Numero Teléfono:

Dirección:

IV.3 CRITERIO DE INCLUSION:

- Femenina
- Edad entre 45 – 55 años.
- Mujer posmenopáusica: definida menopausia como un año desde la última menstruación espontánea, o como la extracción quirúrgica de ambos ovarios.
- Mujeres que reciben terapia de reemplazo hormonal a base de estrógenos equinos conjugados 0,625 mg cada día vía oral con o sin el uso de acetato de medroxiprogesterona 2,5 mg cada día vía oral.

IV.4 CRITERIO DE EXCLUSION:

- Mujeres con enfermedades descompensadas, enfermedades tipo metabólicas, diabetes, enfermedades inmunosupresoras, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades autoinmunes, u

otras enfermedades inflamatorias que se pensara que pudiesen alterar en sí, el equilibrio oxidativo.

- Obesidad: definida como un índice de masa corporal (IMC) >30
- Tabaquismo activo
- Uso de terapia de reemplazo hormonal que incluya estrógenos o progestágenos distintos a los mencionados, incluyendo Tibolona.
- Uso diario de medicamentos que puedan alterar el perfil oxidativo, como por ejemplo las estatinas, corticoesteroides y antiinflamatorios no esteroideos.
- Uso irregular de la terapia de reemplazo hormonal.
- Uso de suplementos con potencial "antioxidativo"

IV.5 MATERIALES Y METODOS

Las mujeres que cumplieron los criterios de inclusión se agruparon en tres categorías, apareadas por edad que incluyeron 25 mujeres cada una:

Grupo 1: mujeres posmenopáusicas sin TRH

Grupo 2: mujeres posmenopáusicas con TRH sin progestágenos.

Grupo 3: mujeres posmenopáusicas con TRH con progestágenos.

A cada grupo se le citó para tomar una muestra de orina y una muestra de sangre venosa de aproximadamente 20 ml en tubos heparinizados, los cuales se centrifugaron por 10 minutos a 4000 rpm y luego se separó el plasm,. Estas muestras fueron almacenadas en un congelado a -80°C para su futuro análisis. Se les había indicado a las mujeres que no debían hacer cambios en sus rutinas diarias al menos 1 semana previo a la toma de las muestras. Estas muestras se tomaron una sola vez, en reposo y en ayunas para medir:

Niveles de estrés oxidativo: General: H_2O_2 en orina

Lipídico: TBARS en plasma

Proteico: Carbonilo proteico en plasma

ADN: 8-OhdG en orina

Nivel de antioxidantes: General: TAS por DPPH en plasma

Enzimas: CAT en plasma

Además, en la consulta más cercana a la fecha del estudio, se enviaron los siguientes exámenes que se reportaron por el Laboratorio del Hospital San Juan de Dios:

Nivel estrogénico: estradiol en sangre

Perfil lipídico: Colesterol total, LDL, HDL, y Triglicéridos

El mismo día en que se citaron las pacientes para la toma de las muestras, fueron entrevistadas por estudiantes avanzadas de nutrición para determinar el consumo de antioxidantes en la dieta (vitaminas C y E, y β -carotenos), esto se hizo utilizando el cuestionario de frecuencia de consumo semicuantitativo de alimentos fuente de estas vitaminas, que se presenta a continuación:

Universidad de Costa Rica
Facultad de Medicina
Escuela de Nutrición

N^o

FRECUENCIA DE CONSUMO DE ALIMENTOS

El siguiente cuestionario tiene como fin conocer la frecuencia con que consume algunos alimentos. La información se manejará de manera confidencial y se utilizará con fines didácticos.

Instrucciones: A continuación se presentan una serie de preguntas, las cuales se deben contestar con la mayor sinceridad posible. Si tiene alguna pregunta puede realizarla en cualquier momento.

I. Datos personales

Nombre: _____

Fecha de nacimiento: ____/____/19____
 Día Mes Año

Domicilio: _____

Teléfono: _____

Peso: _____

Talla: _____

% de grasa: _____

II. Información de consumo

A. Por favor marque con una equis (x) si ha consumido alguno de los siguientes alimentos durante la última semana, en caso de que así fuera indicar el número de veces y la cantidad en la columna correspondiente.

Vegetales	¿Lo comió en la última semana? (marcar con una X)		N° de veces en la semana	Cantidad consumida cada vez	Fotos
	Sí	No			
Ensalada de vegetales ¿Cuáles vegetales?					Fotos de repollo picado
Picadillo de vegetales ¿Cuáles vegetales?					Fotos picadillo
Vegetales sudados o en sopa ¿Cuáles vegetales?					Fotos picadillo
Vegetales cocidos en leche (chayote/ayote/zapallo)					Fotos picadillo
De las siguientes vegetales, ¿comió alguno durante la semana pasada y no lo mencionó anteriormente?					
Aguacate					Fotos aguacate
Ayote maduro					Fotos ayote sazón
Ayote tierno, pipián, zapallo o zuchini					Fotos ayote o picadillo
Brócoli					Fotos coliflor
Coliflor					Fotos coliflor
Chayote					Unidad o fotos picadillo
Chile picante					Sin cantidad
Chile relleno					N° unidades
Vainicas					N° o fotos picadillo
Elote de maíz tierno					Fotos elote
Hongos					Cdas
Flores de Itabo					Sin cantidad
Maíz dulce fresco o enlatado					Cdas
Pejibaye					N° unidades
Remolacha					Fotos tomate o pica
Tomate					Fotos tomate
Zanahoria					Fotos zanahoria
Banano o guineo verde					No unidades
Plátano maduro					Fotos mad o verde
Plátano verde					Fotos mad o verde
¿Otro? Especifique					

FRUTAS	¿Lo comió en la última semana? (marcar con una X)		N° de veces en la semana	Cantidad consumida cada vez	Fotos
	SI	NO			
De la siguiente lista de frutas, indique si comió alguna de ellas. (No en fresco o ensalada de frutas)					
Banano maduro					Fotos banano
Coco					Sin cantidad
Fresa					Vasos
Granadilla					No unidades
Guanábana					Fotos guanábana
Limón dulce					No unidades
Mandarina					No unidades
Mango maduro					Fotos mango mad
Mango verde					No unidades
Manzana					No unidades
Melocotón					No unidades
Melón					Fotos melón o unidad
Mora					Vasos
Naranja					No unidades
Papaya					Fotos papaya
Piña					No tajadas
Sandía					Fotos sandía
Otros: detalle.					

CONDIMENTOS	¿Lo comió en la última semana? (marcar con una X)		N° de veces en la semana	Cantidad consumida cada vez	Fotos
	Sí	No			
¿Usó alguna de los siguientes olores naturales?					
Ajo					Sin cantidad
Apio					Sin cantidad
Cebolla					Sin cantidad
Culantro					Sin cantidad
Chile verde o rojo					Sin cantidad
¿En cuales preparaciones?					
Agregó a su comida:					
Salsa de tomate o ketchup					Sin cantidad
Jugo de limón					Sin cantidad

B. ¿Utiliza algún tipo de suplemento multivitamínico?

No

Sí. Cuáles _____

Muchas gracias por su colaboración

A partir de la frecuencia de consumo referida para cada porción de alimentos, los datos fueron convertidos en cantidades consumidas por semana y analizados mediante el programa EPI-INFO, utilizando como referencia la Tabla de Composición de Alimentos para América Latina (INCAP).

IV.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se comparó la información de los parámetros pro y antioxidativos de cada grupo para ver si existían diferencias significativas entre ellos, y determinar si existía correlación con los niveles estrogénicos. Se utilizaron los métodos de análisis de variancia (ANOVA) del programa Statistica 6.0 para realizar las comparaciones. Se aceptó una $p \leq 0.05$ como estadísticamente significativo. Además se realizaron correlaciones de Pearson entre los factores para encontrar posibles influencias entre los grupos.

IV.7 ENSAYOS DE LABORATORIO

IV.7.1 Niveles de Estradiol en plasma

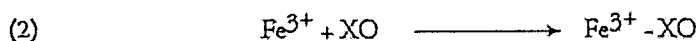
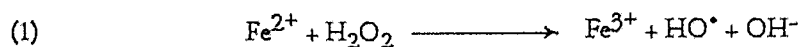
Se realizó utilizando kits comerciales de radioinmunoanálisis para estradiol en suero. Estas se realizaron en el Laboratorio de Inmunología del Hospital San Juan de Dios.

Se dispensó 25 μl de la muestra y de controles en los pozos correspondientes. Cada pozo contiene IgG anti-estradiol de raton. Se agregó 100 μl del reactivo conjugado de Estradiol-acetilcolinesterasa en cada uno de los pozos. Luego se agregaron 50 μl del reactivo del anti-Estradiol de conejo (E2) . Se mezcló por 30 segundos. Se incubó a temperatura ambiente (18-25°C) por 90 minutos y se lavaron los pozos 5

veces con agua destilada o desionizada. Se agregaron 100 µl del reactivo de TMB en cada uno bien, se mezcló por 5 segundos y se incubó a temperatura ambiente (18-25°C) por 20 minutos. Se detuvo la reacción agregando 100µl de la solución de Ellman que le brinda una tinción amarillenta cuya absorbancia a 412 nm fue determinada. La intensidad del color, determinado por espectrofotometría, es proporcional a la cantidad de Estradiol-acetilcolinesterasa en el pozo, el cual es inversamente proporcional a la cantidad de estradiol libre presente en dicho pozo.

IV.7.2 Peróxido de hidrogeno (H₂O₂) en orina

Luego de recogidas las muestras se mantuvieron en hielo y para la determinación se utilizó el kit "Hydrogen Peroxide Assay No.706011" de la casa Cayman Chemicals. El procedimiento se basa en la oxidación de un ion ferroso a un ion férrico utilizando peróxido de hidrógeno bajo condiciones acidas (equacion 1). El ion férrico se une al tinte xylenol anaranjado (3,3'-bis[N,N-di(carboximetyl)amino-metyl]-o-cresolsulfone-phthalein sódico) para formar un complejo estable el cual se puede medir a 595nm (ecuación 2).



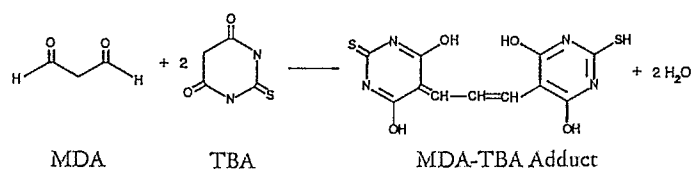
Primero se prepararon 8 pozos de las placas con controles utilizando 20µl de H₂O₂ + 10 µl de agua destilada. Luego se prepararon los pozos de las muestras los cuales contienen 20 µl de la muestra en estudio + 10 µl de catalasa + 200 µl de reactivo de color, se taparon y se incubaron por una hora a temperatura ambiente. Finalmente se midió la absorbancia a 595 nm.

Utilizando la curva obtenida con los datos de la absorbancia de los controles se puede obtener la concentración de H_2O_2 según la absorbancia de nuestras muestras:

$$H_2O_2 (\mu M) = [(Absorbancia\ corregida\ muestra - intersección\ en\ y) / pendiente] * dilución$$

IV.7.3 TBARS en plasma

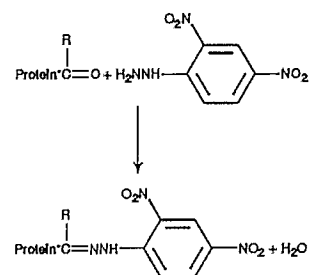
La determinación de malondialdehído (MDA) se realizó por duplicado siguiendo un procedimiento colorimétrico, basado en la determinación del aducto formado en la siguiente reacción:



Se agregó 0,2 ml de plasma a cada tubo y 0,2 ml de agua destilada al tubo control. Luego se agregó a todos los tubos 0,25 ml de ácido tricloroacético al 35% y se mezcló bien antes de agregar 0,2 ml de solución buffer de Tris 50 mM, pH 7,4. Se mezcló, se incubó 10 minutos a temperatura ambiente y luego se agregó 0.5 ml de solución de ácido tiobarbitúrico 0,75%. Se mezcló bien y se calentaron los tubos en baño de agua a ebullición por 45 minutos. Se mezcló bien y se centrifugó a 4000 rpm por 15 minutos. Se colocó el sobrenadante en otro tubo y se midió la absorbancia a 532 nm contra el blanco.

IV.7.4 Carbonilo proteico en plasma

La determinación de carbonilos proteicos en plasma se realizó por duplicado utilizando el kit "Protein Carbonyl



AssayNo.10005020" de la casa Cayman Chemicals. En este ensayo se mide la absorbancia de la base de Schiff que se forma como producto de la reacción entre 2,4-dinitrophenylhidrazina (DNPH) y los carbonilos proteicos.

Se colocaron 200 μ l de la muestra en un tubo plástico. Se agregaron 800 μ l de DNPH a los tubos muestra y 2.5 M HCL a los tubos control y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Se agregó 1 ml 20% TCA y se incubó sobre hielo por 15 minutos. Se centrifugó a 10 000 x g por 10 minutos y se descartó el sobrenadante. Se agregó 1 ml de solución etanol y se volvió a centrifugar. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 500 μ l de cloruro de guanidina, se centrifugó y se tomaron 220 μ l del sobrenadante que se colocaron en los pozos de las placas para medir la absorbancia a 360 nm. Posteriormente, se calculó el promedio de las absorbancias de las muestras y de los controles, se le restó la absorbancia de los controles a las muestras obteniendo la "absorbancia corregida", y con esta última se calculó la concentración de carbonilos proteicos:

$$\text{Carbonilo Protéico (nmol/ml)} = [(Abs\ corregida)/(0.022\mu M^{-1})](500\mu l/200\mu l)$$

IV.7.5 8OH-dG en orina

La determinación de 8OH-dG en orina se realizó por duplicado utilizando el kit "8-hydroxy-2-deoxy Guanosine EIA" AssayNo.589320 de la casa Cayman Chemicals. La determinación se basa en la competencia entre el 8OH-dG y un 8OH-dG acetilcolinesterasa por una cantidad limitada de anticuerpo monoclonal contra el 8OH-dG. Dado que la concentración del 8OH-dG acetilcolinesterasa se mantiene constante, y la concentración de 8OH-dG de la muestra varía, la cantidad de 8OH-dG acetilcolinesterasa que se logra unir al anticuerpo monoclonal 8OH-dG es

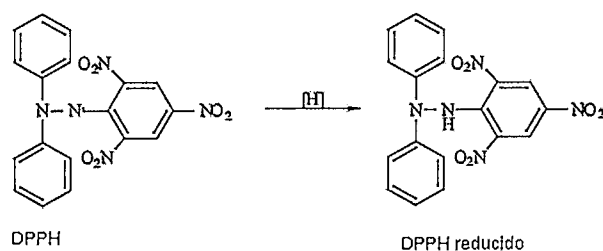
inversamente proporcional a la concentración de 8OH-dG en el pozo. Este anticuerpo se une a un IgG anti-ratón que está adherido al pozo. Luego este pozo es lavado para eliminar excesos y se le agrega solución de Ellman. El producto de esta última reacción da una coloración amarillenta cuya absorbancia se puede medir espectrofotométricamente a 412 nm. La intensidad del color es proporcional a la cantidad de 8OH-dG acetilcolinesterasa en el pozo, el cual es inversamente proporcional a la concentración de 8OH-dG de la muestra:

Primero se prepararon los tubos controles con concentraciones de 8OH-dG desde 10.3 a 3000 pg/ml. Se agregó 50 µl de muestra por pozo y luego se agregaron 50 µl de 8OH-dG-acetilcolinesterasa. Luego se agregó 50 µl de 8OH-dG anticuerpo monoclonal y se incubó durante 18 horas a 4°C. Se vaciaron los pozos y se realizaron 5 lavados utilizando "buffer de lavados". Se agregó 200 µl de solución de Ellman y se incubó por otros 120 minutos antes de medir la absorbancia a 420nm.

Utilizando las absorbancias de los controles se obtuvo una curva que relaciona el porcentaje de adhesión/máxima adhesión ($%B/B_0$) con la concentración de 8OH-dG (pg/ml). Obteniendo esta misma relación de porcentaje de adhesión/máxima adhesión ($%B/B_0$) de las muestras, los resultados de la concentración de 8OH-dG se obtienen interpolando en la curva.

IV.7.6 TAS por DPPH en plasma

La actividad barreadora de radicales libres es determinada utilizando 1,1-difenil-2-picril hidrazil (DPPH), el cual es un radical libre estable con color morado. Cuando algún antioxidante es agregado a DPPH, éste es reducido y su color cambia a amarillo según la capacidad del antioxidante y su absorbancia es medida a 515nm luego de 10 min.



Todas las muestras se analizaron por duplicado. Se agregaron 200 μ l de cada muestra y 1 ml de DPPH (150 mM), luego de una incubación de 30 minutos, en oscuridad y a temperatura ambiente se midió la absorbancia a 517 nm. El cambio en la absorbancia con respecto al control (DPPH + metanol) es calculado como porcentaje de antioxidación.

$$\text{Capacidad o porcentaje de antioxidación} = 100 - \left[\frac{(\text{Abs Muestra} * 100)}{\text{Abs control}} \right]$$

IV.7.7 CAT en plasma

La determinación de CAT en plasma se realizó por duplicado utilizando el kit "Catalase assay No.707002" de la casa Cayman Chemicals. El ensayo se basa en la reacción de la catalasa con metanol en la presencia de H_2O_2 . El formaldehído que se forma se une al 4-amino-5-mercapto-1,2,4-tiazol (Purpald®), el cual produce una tinción morada cuya absorbancia es medida a 540nm.

Como controles se utilizaron soluciones conocidas de formaldehído. Se mezclaron 100 μ l de buffer + 30 μ l metanol + 20 μ l de muestra o control. Se agregaron 20 μ l de peróxido de hidrogeno y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos, mezclando intermitentemente. Luego se agregaron 30 μ l de hidróxido de potasio y 30 μ l de Purpald y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 10 μ l de periodato de potasio y se midió la absorbancia a 540nm.

Se calculó el promedio de las absorbancias de las muestras y controles. Se le resta la absorbancia del primer control a todas las muestras obteniendo las "absorbancias corregidas". Se trazó una curva de absorbancia/concentración de formaldehído utilizando los controles y posteriormente se utilizó para calcular las concentraciones de las muestras:
$$\text{Formaldehído } (\mu\text{M}) = [(Abs \text{ Muestra} - \text{intersección } Y) / \text{pendiente}] * (0.17\text{ml}/0.02\text{ml})$$

Ya con la concentración de formaldehído de la muestra se calculó la actividad de la Catalasa, definiendo como unidad de catalasa, como la cantidad de enzima que catalizará la formación de 1.0 nmol de formaldehído por minuto a 25°C:

$$\text{Actividad CAT} = (\mu\text{M Formaldehído Muestra} / 20 \text{ min}) * \text{Dilución} = \text{nmol}/\text{min}/\text{ml}.$$

V. RESULTADOS

La muestra final del estudio fue compuesta por un total de 62 mujeres menopáusicas: 18 (29 %) de ellas no utilizaban ningún tipo de terapia de reemplazo hormonal (TRH), 20 (32 %) de ellas eran histerectomizadas por lo que utilizaban sólo estrógenos conjugados, y 24 (39 %) de ellas utilizaban estrógenos conjugados con acetato de medroxiprogesterona. Las características biofísicas de las mujeres fueron muy similares entre los grupos. El grupo de mujeres que utilizaban solo estrógenos tenían en promedio 2 años menos que las de los otros dos grupos (ver tabla 1).

Tabla 1. Características de la población seleccionada. Promedio \pm Desviación Estándar

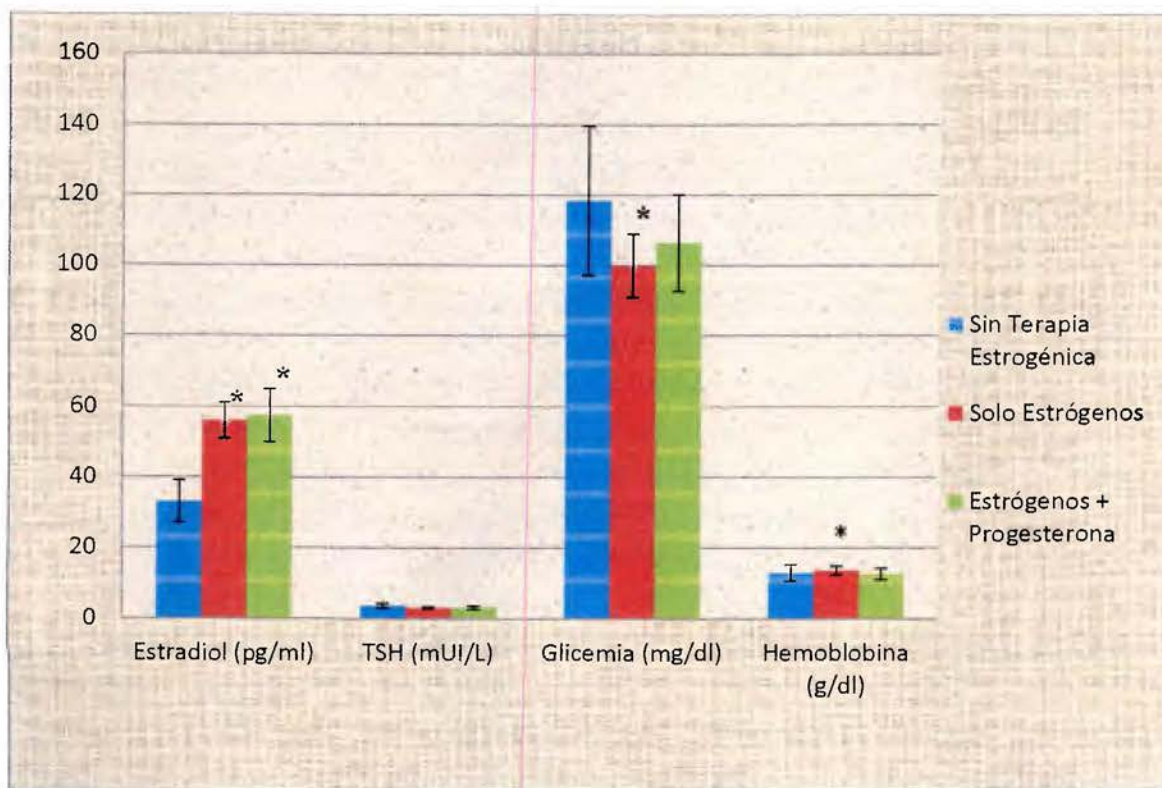
n	Sin TRH 18	Solo Estrógenos 20	Estrógenos + Progesterona 24
Edad (años)	51.9 \pm 2.2	48.3 \pm 1.9*	51.1 \pm 3.0
Peso (kg)	69.7 \pm 12.1	67.4 \pm 6.2	70.8 \pm 7.8
Talla (cm)	157.8 \pm 7.8	156.7 \pm 4.7	156.1 \pm 4.2
IMC (kg/mts ²)	27.8 \pm 3.4	27.4 \pm 2.65	29.1 \pm 2.1

*: p<0.005

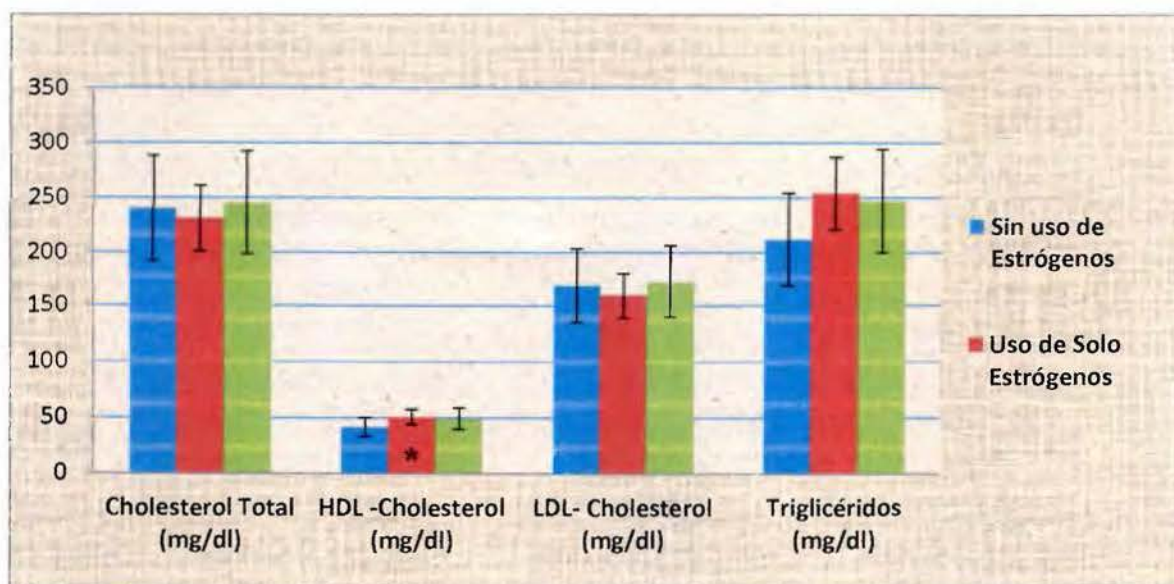
Además de los ensayos específicos de la actividad oxidativa, se realizaron pruebas de laboratorio complementarias propias del control de la mujer climatérica (tabla 2). Los valores de estradiol fueron mayores en las mujeres que recibían algún tipo de reemplazo hormonal con estrógenos (gráfica 1). El grupo de mujeres que recibían solo estrógenos presentaron resultados favorables en cuanto a la glicemia, hemoglobina y colesterol HDL (gráfica 2).

Tabla 2. Análisis de laboratorio complementarios a la población seleccionada.			
Promedio ± Desviación Estándar			
	Sin Terapia Estrogénica	Solo Estrógenos	Estrógenos + Progesterona
N	18	20	24
Estradiol (pg/mL)	33.08 ± 14.12	56.11 ± 24.49*	57.48 ± 29.84*
TSH (mUI/L)	3.65 ± 1.65	3.07 ± 1.46	3.17 ± 1.48
Glicemia (mg/dL)	118.4 ± 22.1	99.9 ± 17.5*	106.4 ± 18.7
Hemoglobina (g/dL)	12.94 ± 1.02	13.63 ± 1.07*	12.57 ± 1.12
Colesterol Total (mg/dL)	240.2 ± 46.2	231.1 ± 42	245.3 ± 42.7
HDL-Colesterol (mg/dL)	41.3 ± 7.6	50.6 ± 9.1*	49.3 ± 9.5
LDL-Colesterol (mg/dL)	169.4 ± 34.3	159.9 ± 31.2	173.3 ± 32.8
Triglicéridos (mg/dL)	211.9 ± 78.1	253.9 ± 89.5	247.1 ± 85.9

*: $p < 0.005$



Gráfica 1. Análisis de Laboratorio Complementarios según exposición a estrógenos solos o con progesterona



Gráfica 2. Perfil lipídico según exposición a estrógenos solos o con progesterona

Los ensayos realizados para valorar el estatus oxidativo fueron: carbonilo proteico, 8 hidroxideoxiguanosina, catalasa, TBARS y DPPH. Cuando se agruparon las pacientes de acuerdo al uso de TRH, se observó una menor oxidación de lípidos, representado por un valor menor de TBARS, en el grupo de usuarias de TRH (tabla 3). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los valores de los otros parámetros oxidativos analizados (gráfica 3).

Tabla 3. Actividad Oxidativa según uso de estrógenos. Promedio \pm Desviación Estándar

	Sin Terapia Estrogénica	Con Terapia Estrogénica
N	18	44
Carbonilo Protéico (nmol/ml)	32.57 \pm 16.33	40.54 \pm 35.97
8-OH dG (ng/ml)	31.07 \pm 4.59	28.93 \pm 4.68
TBARS (μ M)	2.88 \pm 0.88	2.36 \pm 0.74*
Catalasa (nmol/min/ml)	17.19 \pm 10.40	21.88 \pm 16.75
DPPH (% de reducción)	32.98 \pm 8.14	28.70 \pm 8.64

*: $p < 0.005$

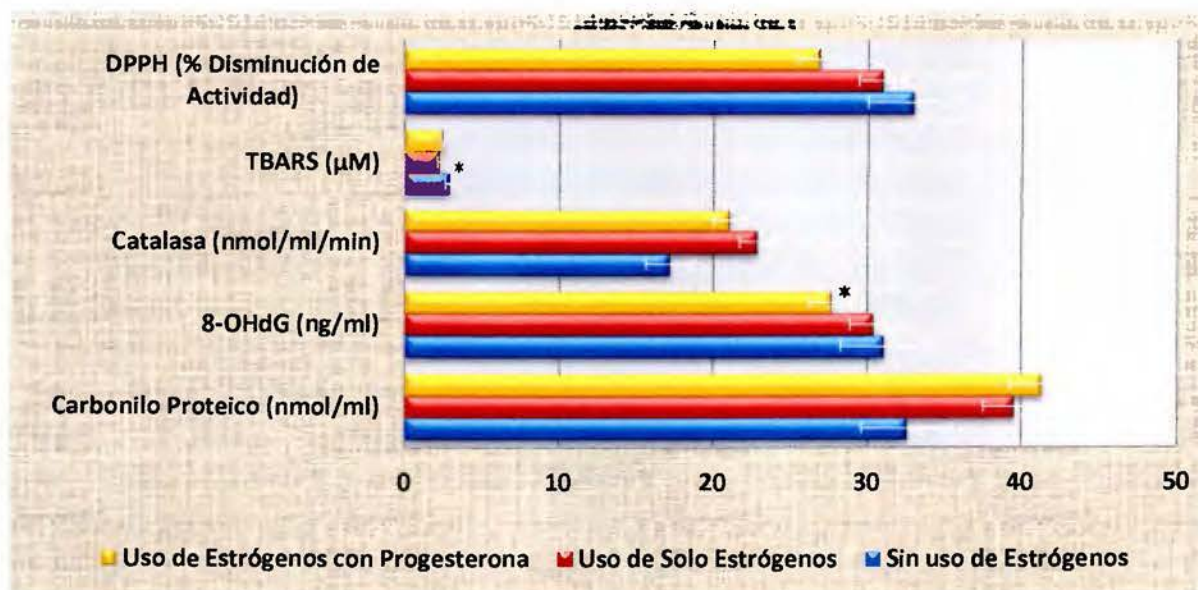


Gráfica 3. Actividad Oxidativa según el uso de estrógenos

La misma disminución en la oxidación de lípidos se observó al subdividir los grupos por el tipo de TRH, encontrándose una disminución significativa en el grupo con TRH de solo estrógenos. Mientras que en el grupo que utilizaba progesterona se observó una disminución significativa en la oxidación del ADN, esto último representado por valores estadísticamente menores de 8-OH dG (tabla y gráfica 4).

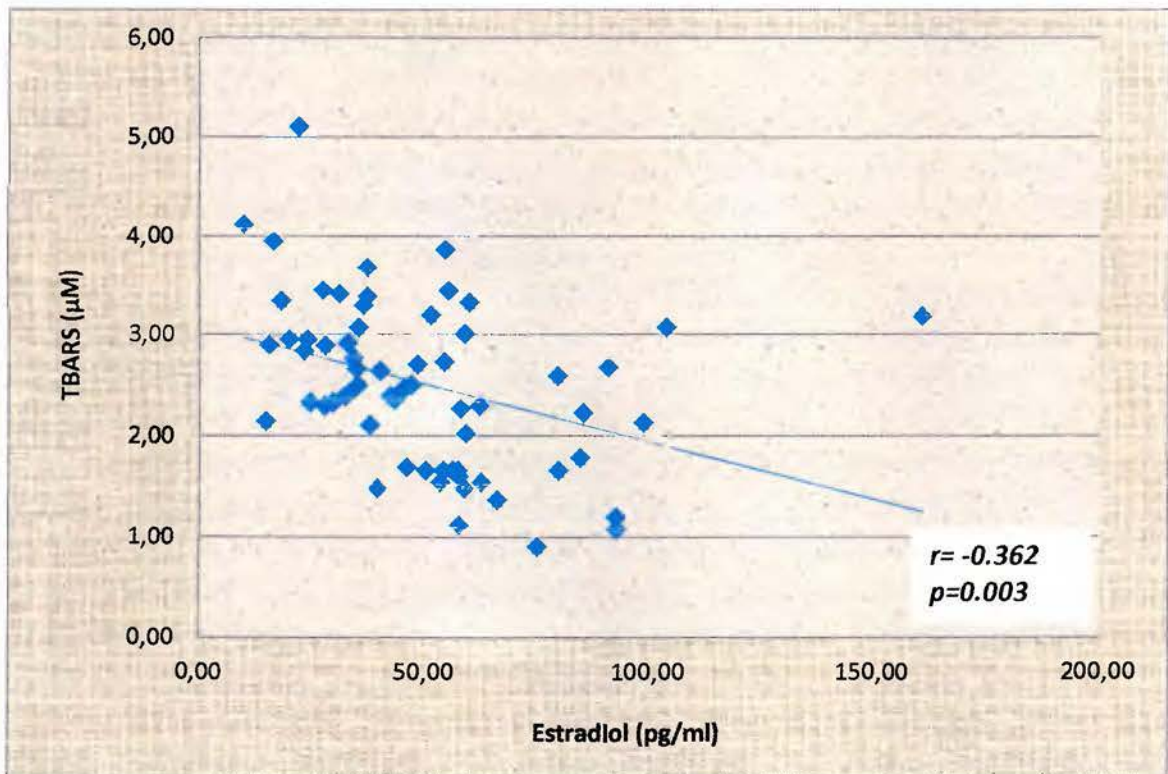
Tabla 4. Actividad Oxidativa según uso de estrógenos solos o con progesterona. Promedio \pm Desviación Estándar

	Sin Terapia Estrogénica	Solo Estrógenos	Estrógenos + Progesterona
N	18	20	24
Carbonilo Protéico (nmol/ml)	32.57 \pm 16.33	39.53 \pm 32.75	41.33 \pm 39.01
8-OH dG (ng/ml)	31.07 \pm 4.59	30.37 \pm 4.38	27.66 \pm 4.65*
TBARS (µM)	2.88 \pm 0.88	2.20 \pm 0.63*	2.48 \pm 0.80
Catalasa (nmol/min/ml)	17.19 \pm 10.40	22.84 \pm 16.34	21.07 \pm 17.41
DPPH (% de reducción)	32.98 \pm 8.14	30.96 \pm 9.59	26.85 \pm 7.51

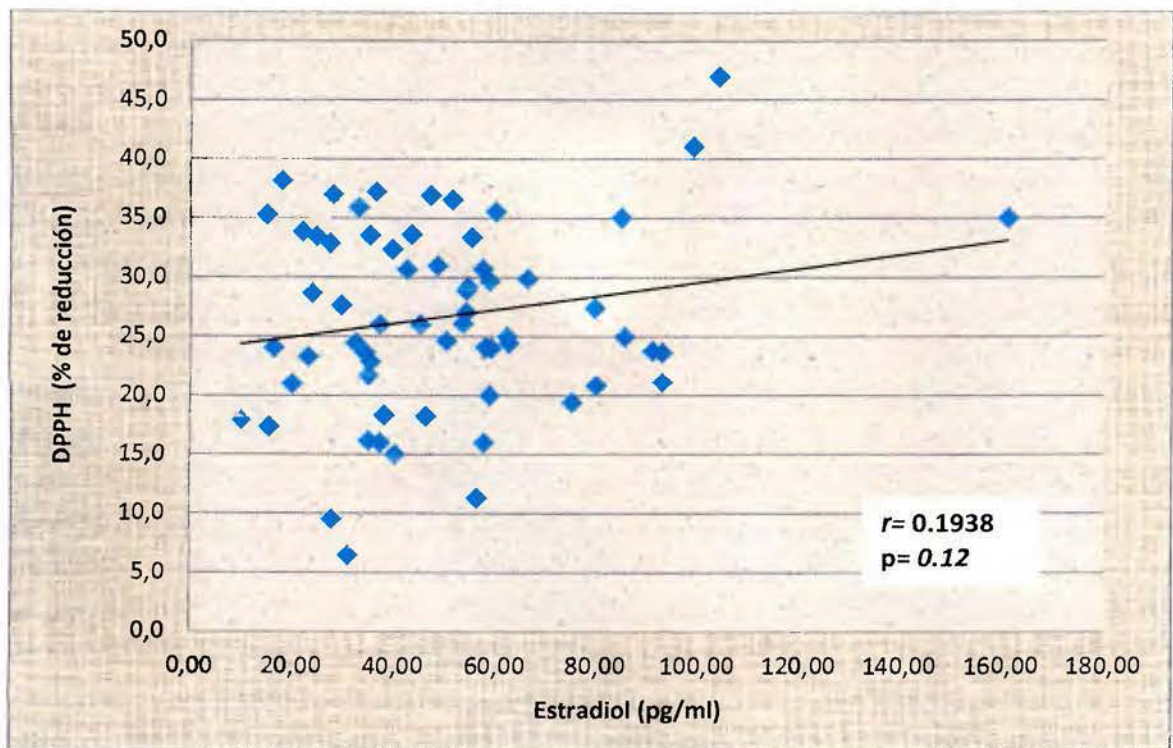


Gráfica 4. Actividad oxidativa según el uso de Estrógenos solos o con Progesterona

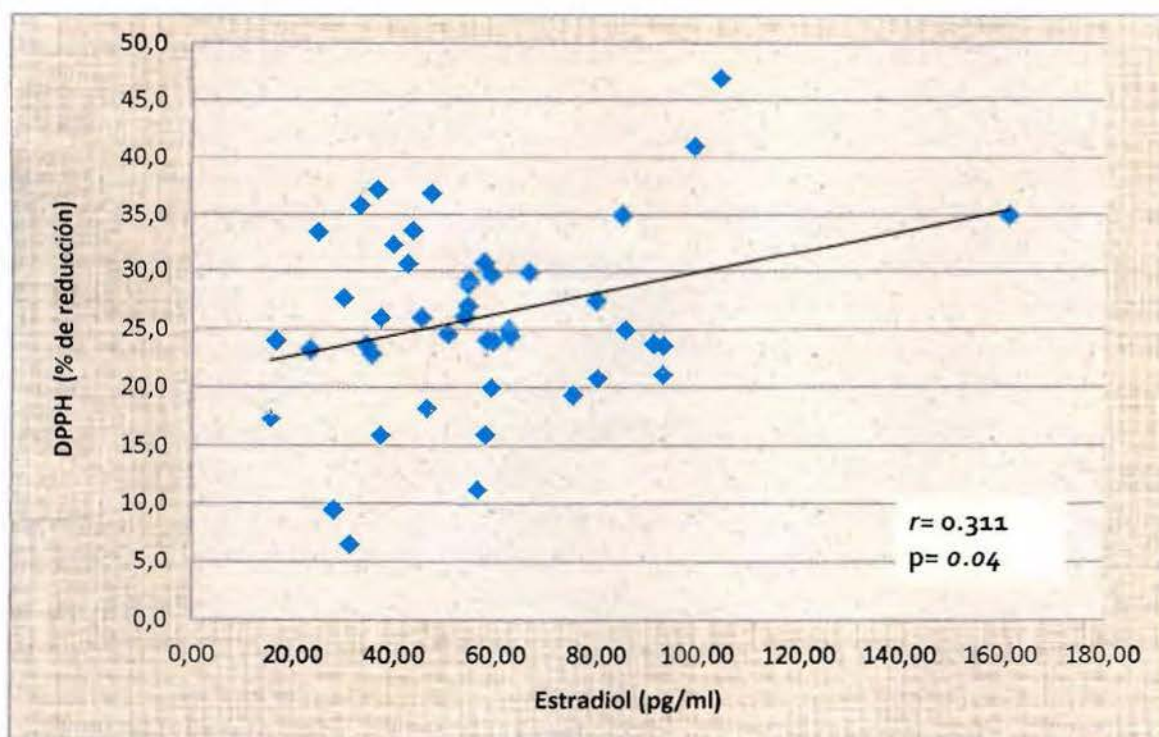
Las correlaciones indican la fuerza y la dirección de una relación lineal entre dos variables aleatorias. La relación, ya mencionada, entre la exposición a estrógenos y los niveles disminuidos de oxidación lipídica, fue manifiesta con un índice de correlación de Pearson de $r = -0.362$ (gráfica 5), lo cual obtuvo significancia estadística con una $p = 0.003$. Otra correlación que se analizó, fue entre los niveles crecientes de estradiol con aumento en el estado antioxidativo total de la persona, lo cual obtuvo un índice de correlación de Pearson de $r = 0.6281$ (gráfica 6), y también fue estadísticamente significativo con una $p = 0.008$.



Gráfica 5. Correlación entre Niveles de Estradiol y Oxidación Lipídica



Gráfica 6. Correlación entre niveles de Estradiol y Status Antioxidativo Total



Gráfica 7. Correlación entre niveles de Estradiol y Status Antioxidativo Total de pacientes que recibieron TRH

La dieta también fue cuantificada con respecto al promedio de vegetales y frutas consumidas por la población seleccionada. Sin embargo no se observaron diferencias significativas entre las cantidades consumidas por cada subgrupo (tabla 5).

Tabla 5. Consumo promedio diario de vegetales y frutas según el uso de estrógenos solos o con progesterona. Promedio \pm Desviación Estándar			
	Sin Terapia Estrogénica	Solo Estrógenos	Estrógenos + Progesterona
N	18	20	24
Consumo promedio de vegetales por día (g)	179.2 \pm 129.2	245.7 \pm 191.7	224.9 \pm 123.3
Consumo promedio de frutas por día (g)	213.4 \pm 144.2	206.8 \pm 149.6	260.4 \pm 162.4

VI. DISCUSIÓN

Durante el climaterio o etapa perimenopáusica el cuerpo y metabolismo de la mujer cambia de forma importante, y los mecanismos que regulan el estrés oxidativo no son la excepción. En los últimos años se han realizado estudios que ligan esta disminución en los niveles de estrógenos con cambios en el comportamiento oxidativo / antioxidativo de la mujer, sin embargo el panorama aún no está claro, dado que son pocos los estudios existentes y a la vez hay algunos de estos estudios que se contradicen entre ellos^{27,28,51-55}. El presente estudio logra analizar diferentes componentes del sistema oxidativo para estudiarlos según el efecto que podría tener sobre ellos la TRH.

Uno de los primeros datos que se debe analizar es la composición de la muestra. El diseño original del estudio mencionaba una muestra de 150 mujeres, dividiéndose ésta equitativamente en 50 mujeres para cada subgrupo según el uso de terapia de reemplazo hormonal. El proceso de reclutamiento se llevó a cabo durante 11 meses, sin embargo no se logró llegar a la muestra meta. Los factores que más determinaron el tamaño de la muestra fueron los criterios de exclusión de las pacientes. Dado que el propósito del reclutamiento era contar con mujeres relativamente sanas para el estudio, esto dificultó la obtención de la muestra. Aunque se puede ver como algo negativo, al disminuir el tamaño real del estudio, la rigurosidad con que se seleccionó la muestra, se convirtió en algo positivo. Al ser un grupo de mujeres con criterios de inclusión estrictos, se logró constituir una muestra de características biofísicas muy similares, lo cual nos otorgó una homogeneidad importante entre los subgrupos. Como se puede analizar en la Tabla 1, vemos que la muestra está distribuida de una manera adecuada lo cual facilitó el análisis estadístico. El hecho de que el

promedio de edad en el grupo de mujeres que solo recibían estrógenos fuese, en promedio, 2 años menor, realmente no debe determinar diferencias entre los grupos, dado que se mantienen en un rango representativo de la mujer menopáusica. El tamaño real de la muestra fue de 62 mujeres; sin embargo, cuando se compara con otros estudios publicados en este campo^{51-55,70-74}, se observa que el tamaño de la muestra es similar, lo cual le brinda al estudio un peso científico importante.

Algunos de los estudios complementarios realizados durante el ensayo fueron la determinación del estradiol, TSH, glicemia y la hemoglobina. Como era de esperar, la concentración sérica del estradiol fue significativamente mayor en los grupos de mujeres que recibían terapia de reemplazo con estrógenos conjugados. También se observó que el grupo de mujeres que recibían sólo estrógenos tenían una hemoglobina significativamente mayor a los otros dos grupos. La diferencia real en la concentración de hemoglobina fue muy poca, pero fue estadísticamente mayor en el grupo de mujeres con TRH. Sin embargo, esto probablemente no refleja un efecto de los estrógenos sobre la hemoglobina de las mujeres analizadas (Gráfica 1). También en el grupo de mujeres que recibieron estrógenos sin oposición se evidenció una disminución significativa de la glicemia. Este efecto sobre la glicemia ya ha sido observado en grandes estudios como son el HERS⁹¹ y el PEPI⁹², en donde se han documentado reducciones de 16% en los niveles de glicemia en los grupos de mujeres tomando estrógenos sin oposición. Ambos estudios además documentaron una disminución en la progresión hacia diabetes en las mujeres que toman estrógenos sin oposición en comparación a las que tomaron placebo.

Otros estudios complementarios realizados fueron los que componen el perfil lipídico. Al igual, como se ha evidenciado en estudios anteriores^{85,86,87}, se observó un aumento significativo en los niveles del HDL-

colesterol en el grupo de mujeres que recibieron terapia de reemplazo hormonal a base de sólo estrógenos (Gráfica 2). Este aumento del "colesterol bueno" ha sido comentado como una de las vías para el efecto cardioprotector de la terapia a base de estrógenos. Aunque algunos autores han observado cambios en otros marcadores, nuestra población no mostró esas tendencias^{88,89}.

Para determinar la oxidación proteica, se utilizó como marcador la determinación del carbonilo proteico. No se observó una diferencia significativa en los niveles de oxidación proteica entre los diferentes grupos. Esto sugiere, que el uso de terapia de reemplazo hormonal a base de estrógenos no modifica de forma importante la oxidación de proteínas en la mujer menopáusica. Al realizar una revisión de la literatura, no se encontraron estudios sobre la oxidación proteica en el grupo de mujeres menopáusicas. Esto indica que la presente investigación es uno de los primeros ensayos que analiza el balance oxidativo de las proteínas en el climaterio.

El siguiente proceso que se estudió, fue el de la oxidación del ADN. La cuantificación del 8 OH-dG ha sido reconocida como un marcador fiel y reproducible para estimar el daño oxidativo del ADN^{75,77,90}. Al igual que el carbonilo proteico, no existen estudios previos publicados que hayan analizado el estado oxidativo del ADN en la mujer menopáusica, y el impacto que tendría sobre esto la utilización de la terapia de reemplazo hormonal. El primer análisis que se realizó fue entre la población que utilizaba y la que no utilizaba estrógenos; no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos (Tabla 3). En la tabla y gráfica 4, se observa que los niveles de 8-OhdG fueron significativamente menores en el grupo de mujeres que utilizaron estrógenos con progesterona. Esto es un hallazgo importante dado que podría indicar que

el acetato de medroxiprogesterona tiene algún efecto potenciador sobre el efecto antioxidativo del estradiol sobre el ADN. Anteriormente, se ha publicado que los diferentes progestágenos tienen diferentes capacidades oxidativas, y que uno de los que podría potenciar el efecto antioxidativo de los estrógenos es el acetato de medroxiprogesterona ⁶⁴. Sería importante pensar que esto puede ser uno de los mecanismos a través de los cuales la terapia de reemplazo hormonal ayuda a disminuir el daño tisular de algunos órganos.

Otro marcador bioquímico de daño oxidativo que se estudió fue la determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). Probablemente el método más utilizado para la cuantificación de lesión oxidativa de los lípidos, el TBARS ha tenido valores contradictorios en la literatura cuando se analiza con respecto a la utilización de terapia hormonal ^{53,54,68,70-72}. Özden y cols.⁷⁰ midieron los niveles plasmáticos de TBARS y los niveles eritrocitarios de TBARS, en mujeres posmenopáusicas con y sin TRH; este estudio mostró que el grupo de mujeres con TRH presentaban niveles de TBARS plasmáticos y eritrocitarios más bajos que el grupo que no usaba TRH. En el presente estudio, se evidenció una disminución estadísticamente significativa en los niveles de TBARS en las mujeres que utilizaban TRH a base de estrógenos (Tabla 3 y 4). Esta disminución fue evidente en el análisis cuando se contemplaba el uso o no de estrógenos ($p=0.0253$), pero también fue evidente cuando se subdividieron los grupos según el uso de progesterona o no ($p=0.0446$). Al realizar un análisis de correlación se observó una correlación negativa estadísticamente significativa con un índice de Pearson de -0.362 , lo cual nos indica una menor oxidación de lípidos a mayores niveles de estradiol, esto sugiere que los estrógenos protegen a los lípidos del estrés oxidativo. Este último dato podría ser el más importante del estudio. La causa de

muerte más importante en la mujer menopáusica es la enfermedad cardiovascular^{8,17,18}, y ésta última depende del proceso arteriosclerótico. En los inicios del proceso arteriosclerótico, la formación de la célula espumosa depende de la previa oxidación de los LDL¹⁹. Tal parece que los estrógenos disminuyen la oxidación de los lípidos; sin la oxidación del LDL, la célula espumosa no se forma, y por ende no se forma la placa arteriosclerótica. ¿Será éste el mecanismo por el cual los estrógenos brindan un efecto cardioprotector si se inicia la terapia tempranamente en el climaterio? Haría falta un estudio diseñando específicamente para poder responder la pregunta, pero es muy alentador obtener datos que nos orientan al posible mecanismo a través el cual los estrógenos están protegiendo a las mujeres de la enfermedad cardiovascular.

Un marcador general del nivel oxidativo del cuerpo es la determinación de la concentración peróxido de hidrógeno en la orina^{77,78}. Este marcador se basa en el concepto de que se excreta más peróxido de hidrógeno entre más estrés oxidativo se produzca, aunque no es reflejo de un proceso oxidativo específico. En el presente estudio se intentó medir los niveles urinarios de peróxido de hidrógeno, sin embargo todos los resultados obtenidos fueron menores a 11 μM de H_2O_2 , rango en el cual el kit utilizado no definía adecuadamente los niveles. En la literatura consultada, no se encontraron estudios que analizaran los niveles de H_2O_2 en las mujeres menopáusicas.

Además del estudio del daño oxidativo, se analizaron los niveles de una enzima antioxidativa para determinar la influencia que tenía sobre ésta la terapia de reemplazo hormonal. La enzima estudiada fue la catalasa, la cual cataliza la conversión de H_2O_2 en H_2O y O_2 . Los datos obtenidos muestran una ligera tendencia a elevar los niveles de catalasa en el grupo que utilizaba TRH (Tabla 3), sin embargo ésta tendencia no fue

estadísticamente significativa ($p=0.275$). El uso o no de progesterona, no influyó en los resultados finales (Tabla 4). Estos datos coinciden con los obtenidos por Wassmann²⁷ y Naziroglu y cols.⁷¹ los cuales mencionan que los estrógenos no modifican los niveles de catalasa.

El otro marcador general, esta vez de actividad antioxidativa total, fue la medición de la actividad barredora de radicales libres al plasma utilizando al DPPH como fuente de radicales libres. La actividad barredora de radicales libres es determinada utilizando 1,1-difenil-2-picril hidrazil (DPPH), el cual es un radical libre estable con color morado. Cuando algún antioxidante es agregado al DPPH, éste es reducido y su color cambia a amarillo según la capacidad del antioxidante. El cambio en la absorbancia con respecto al control es calculado como porcentaje de antioxidación. Al analizar los porcentajes de disminución en la reducción del DPPH, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (Tabla 3 y 4), indicando que el balance global de capacidad antioxidativa era similar entre los grupos. Sin embargo, cuando se realizó una correlación entre los niveles de estradiol y el porcentaje de actividad del DPPH (actividad antioxidativa), se observó una correlación estadísticamente no significativa, pero con un índice de Pearson de 0.194, indicando una tendencia que a mayor nivel de estradiol mayor reducción de la actividad del DPPH, o sea, que a mayor niveles de estradiol parece haber mayor capacidad antioxidativa. Sin embargo, cuando se excluyeron a las pacientes que no tomaban TRH y se analiza el grupo que sí tomó TRH por aparte, se observa que esta correlación sí cobra significancia estadística (Tabla 7). Esta tendencia está acorde con los resultados obtenidos por otros autores aunque utilizando otros métodos de laboratorio. Bednarek-Tupikowska y cols.⁵² y Demirbag R.⁵⁵ midieron el status antioxidativo total (TAS) y lograron mostrar una correlación entre la

disminución de estrógenos y la disminución del TAS. El TAS logra medir la suma de todos los sistemas antioxidativos en un momento dado, de manera que representa la capacidad antioxidativa real de un individuo y no solo la de una sustancia. El método se basa en la habilidad de antioxidantes en la muestra de inhibir la oxidación de ABTS (2,2'-Azino-di[3-ethylbenzthizaoline sulphonate]) a $ABTS^+$ ⁸⁴.

Otro factor muy importante que se tomó en cuenta fue determinar qué tanto de estos cambios en los niveles oxidativos y antioxidativos se podrían atribuir a los hábitos alimentarios de las personas. Se puede observar en la tabla 5, que los hábitos alimentarios de los grupos fueron muy similares entre sí. Este último detalle es muy importante dado que la alimentación puede aportar grandes cantidades de antioxidantes según los hábitos de cada persona. En vista de la homogeneidad del grupo, en donde, los promedios de consumo de frutas y vegetales entre los grupos no tuvieron diferencias significativas. Se puede considerar que los resultados o diferencias observadas en los diferentes ensayos oxidativos no son atribuidos a las diferencias en la dieta de cada una de las mujeres.

VII. CONCLUSIONES

El climaterio es una etapa en donde la mujer pasa por múltiples cambios, y su estado oxidativo no es la excepción. El presente estudio nos evidencia que la terapia de reemplazo hormonal tiene efectos en algunos puntos específicos de este proceso. Cabe mencionar, que no hubo evidencia que la TRH empeorara ninguno de los procesos oxidativos estudiados, de manera que se concluye que tuvo un efecto positivo o neutro sobre los apartados estudiados; con esto se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna 1. Basado en este estudio, se puede concluir lo siguiente:

- Las mujeres que utilizaban estrógenos, con o sin progesterona, presentaron niveles de oxidación lipídica menores a las que no utilizaban estrógenos.
- Existe una correlación negativa entre los niveles de estradiol y la oxidación lipídica, lo cual se interpreta que a mayor nivel de estradiol menor oxidación de lípidos.
- No hubo diferencias significativas en los niveles de carbonilo proteico según el uso de terapia de reemplazo hormonal
- El grupo de mujeres que utilizaban estrógenos con progesterona, presentaron niveles menores de oxidación del ADN.
- No hubo diferencias significativas en la actividad de Catalasa según el uso de terapia de reemplazo hormonal
- No hubo diferencias significativas en la actividad barredora de radicales libres del plasma según los niveles de reducción de DPPH según el uso de terapia de reemplazo hormonal.
- Existe una correlación positiva entre los niveles de estradiol y la reducción de la actividad barredora de radicales libres del plasma

según los niveles de reducción de DPPH, lo cual se hace pensar que a mayor nivel de estradiol mayor capacidad antioxidativa

- La utilización de estrógenos eleva los niveles plasmáticos de estradiol
- El grupo de mujeres que usan estrógenos sin progesterona presentaron niveles de glicemia menores y niveles de hemoglobina y HDL mayores que el grupo que no utilizaba estrógenos o las que los utilizaban concomitantemente con progesterona.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Blokhina, O., Virolainen E., Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot (Lond)*. 2003. 91: 179-194.
2. Angstadt, C. Devlin T. *Bioquímica: libro de texto con aplicaciones 65ipídico*. 4ª ed. España: Reverté: 2004
3. Murray, R. *Bioquímica de Harper*. 15ª ed. Mexico: El Manual Moderno: 2001
4. Young, IS., Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol*. 2001. 54: 176-186.
5. Scandalios J.G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defensas. *Braz J Med Res*. 2005; 38: 995-1014.
6. Kyaw, M., Yoshizumi M., Tsuchiya K., Izawa Y., Kanematsu Y., Tamaki T. Atheroprotective effects of antioxidants through inhibition of mitogen-activated protein kinases. *Acta Pharmacol Sin*. 2004. 25: 977-985.
7. Paolisso G., Esposito R., D'Alessio MA., Barbieri M. Primary and secondary prevention of atherosclerosis: is there a role for antioxidants? *Diabetes Metab*. 1999. 25: 298-306.
8. Willcox, J., Ash S., Catignani G. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2004. 44: 275-295.
9. Tribble DL., Frank E. Dietary antioxidants, cancer and atherosclerotic heart disease. *West J Med*. 1994. 161:605-612.
10. Ebell MH. Efficacy of antioxidants in GI cancer prevention. *Am Fam Physician*. 2005. 71: 465-466.

11. Salaganik RL. The benefits and hazards of antioxidants: controlling apoptosis and other protective mechanisms in cancer patients and the human population. *J Am Coll Nutr.* 2001. 20(5 Suppl): 464S-475S.
12. Lamson, DW., Brignall MS. Antioxidants and cancer, part 3: quercetin. *Altern Med Rev.* 2000. 5:304-329.
13. Christen, Y. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Am J Clin Nutr.* 2000. 71:621-629 S.
14. Smith, MA., Perry G., Richery PL. Oxidative damage in Alzheimer's disease. *Nature.* 1996. 382: 120-121.
15. Age-Related Eye Disease Study Research Group. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E and beta carotene for age related cataract and vision loss: AREDS report no.9. *Arch Ophthalmol.* 2001. 119:1439-1452.
16. Ehret A., Westendorp MO., Herr., Debatin KM., Heeney JL., Frank R., et al. Resistance of chimpanzee T cells to human 66ipídico666666iency virus type 1 Tat-enhanced oxidative stress and apoptosis. *J Virol.* 1996. 70: 6502-6507.
17. Ortiz, A., Vargas R., Muñoz G. Incidencia y mortalidad del cáncer en Costa Rica. Costa Rica: Kamelot Comunicación y Arte: 2005.
18. Siseles N. Información y formación para el manejo actual de la mujer en su climaterio. Buenos Aires: Ascune Hnos: 2005.
19. Stocker R., Keaney J. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Phsiol Rev.* 2004; 84: 1381-1478.
20. Heinecke J. Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidized low density lipoprotein hypothesis. *Atherosclerosis.* 1998; 141: 1-15.

21. Salonen T., Yla-Herttuala S., Yamamoto R. Autoantibodies against oxidized LDL and progression of carotid atherosclerosis. *Lancet*. 1992. 339:883-887.
22. Gey, KF., Puska P., Jordan P., Moser UK. Inverse correlation between plasma vitamin E and mortality from ischemic heart disease in cross-cultural epidemiology. *ACJN*. 1991. 53: 326-334 S.
23. Stampfer, MJ., Hennekens CH., Manson J., Colditz G., Rosner B., Willett W. Vitamin E consumption and risk of coronary disease in women. *New Engl J Med*. 1993. 328: 1444-1449.
24. Stephens, NG., Parsons A., Schofield PM., Kelly F., Cheeseman K., Mitchinson MJ, et al. Randomized controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet*. 1996. 347: 781-786.
25. Yusuf, S. Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high risk patients. *New Engl J Med*. 2000. 354: 1917-1918.
26. Lee IM., Cook NR., Gaziano J., Gordon D., Ridker P., Manson J., et al. Vitamin E in the primary prevention of cardiovascular disease and cancer: the Women's Health Study: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2005. 294: 56-65.
27. Wassmann K., Wassmann S., Nickenig G. Progesterone antagonizes the vasoprotective effect of estrogen on antioxidant enzyme expression and function. *Circ Res*. 2005; 97: 1046-1054.
28. Strehlow K., Rotter S., Wassmann S., Adam O., Grohe C., Laufs K. Et al. Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen. *Circ Res*. 2003; 93: 170-177.
29. Thibodeau P., Kachadourain R., Lemay R., Bission M., Day B., Paquette B. In vitro pro- and antioxidant properties of estrogen. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2002; 81: 227-236.

30. Gorodeski G., Update on cardiovascular disease in post-menopausal women. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2002; 16: 329-355.
31. Clarkson TB., The new conundrum: do estrogens have any cardiovascular benefits? *Int J Fertil Womens Med.* 2002; 47: 61-68.
32. Boron, W., Boulpaep E., *Medical Physiology.* 1 ed. USA: Elsevier Science: 2003.
33. Ganong, W. *Review of Medical Physiology.* 22nd ed. USA: McGraw-Hill Medical. 2005
34. DeCherney A., Nathan L. *Diagnóstico y tratamiento ginecoobstétricos.* 8^{va} ed. Mexico: El Manual Moderno: 2003.
35. Speroff, L., Fritz M. *Clinical gynecologic endocrinology and infertility.* 7th ed. USA: Lippincott Williams & Wilkins: 2005
36. Riggs, BL. The mechanisms of estrogen regulation of bone resorption. *J Clin Invest.* 2000. 106: 1203-1204.
37. Berek JS., Adachi EY., Hillard PA. *Novak's Gynecology.* 12th ed. USA: Lippincott Williams & Wilkins: 1996.
38. Burger, HG., Dudley EC., Robertson DM. Hormonal changes in the menopause transition. *Recent Prog Horm Res.* 2002. 57: 257-275.
39. Seeman E., Pathogenesis of osteoporosis. *J Appl Physiol.* 2003. 95: 2142-2151.
40. Carr MC. The emergence of the metabolic syndrome with menopause. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003. 88: 2404-2411.
41. Fioretti F. Tavani A., Gallus S., Franceschi S., La Vecchia C. Menopause and risk of non-fatal acute myocardial infarction: an Italian case-control study and a review of the literature. *Hum Reprod.* 2000. 15: 599-603.
42. Santoro N., The menopause transition: an update. *Hum Reprod Update.* 2002. 8(2): 155-60

43. Tcheronof A., Poehlman ET., Despres JP. Body fat distribution, the menopause transition and hormone replacement therapy. *Diabetes Metab.* 2000. 26: 12-20.
44. Doren M., Schneider HPG. Estrogen-progesterone replacement therapy in postmenopausal women – is 1 mg estradiol valerate sufficient to maintain axial trabecular bone density? *Int J Clin Pharmacol Ther.* 1994. 32: 254-258.
45. Cutson TM., Meuleman E. Managing menopause. *Am Fam Physician.* 2000. 61: 1391-1400.
46. Place VA., Powers M., Darley PE., Schenkel L., Good WE. A double blind comparative study of Estraderm and Premarin in the amelioration of postmenopausal symptoms. *Am J Obstet Gynecol.* 1985; 152: 1092-1099.
47. Lippert, TH. Seeger H., Mueck. Clinical and pharmacological characteristics of the conjugated equine estrogens. Is their use in postmenopausal hormone replacement therapy still up to date? *Arzneimitteltherapie.* 1999. 17 362-364.
48. O'Connell, MB., Pharmacokinetic and pharmacologic variation between different estrogen products. *J Clin Pharmacol.* 1995. 35: 18-24 S.
49. Bhavanani, BR. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of conjugated equine estrogens: chemistry and metabolism. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1998. 217:6-16.
50. Lippert, TH., Seeger H., Mueck A. Pharmacodynamics and toxicology of different estrogens. Hormone replacement in postmenopausal women: are all estrogens equal? *Gynecol Endocrinol* 2001. 15:26-33

51. Signorelli S., Neri S., Sciacchitano S., DiPino L., Costa M., Marchese G. Behaviour of some indicators of oxidative stress in postmenopausal and fertile women. *Maturitas*. 2006; 53: 77-82.
52. Bednarek-Tupikowska G., Tupikowski K., Bidzinska B., Bohdanowicz-Pawlak A., Antonowicz-Juchniewicz J., Kosouska B., et al. Serum lipid peroxides and total antioxidant status in postmenopausal women on hormone replacement therapy. *Gynecol Endocrinol*. 2004; 19: 57-63.
53. Unfer T., Conterato M., da Silva J., Duarte M., Emanuelli T. Influence of hormonal replacement therapy on blood antioxidant enzymes in menopausal women. *Clin Chem Acta*. 2006; 369: 73-77.
54. Wen Y., Doyle M., Cooke T., Feely J. Effect of menopause on low-density lipoprotein oxidation: is oestrogen an important determinant? *Maturitas*. 2000; 34: 233-238.
55. Demirbag R., Yilmaz R., Erel O. The association of total antioxidant capacity with sex hormones. *Scan Cardiovasc J*. 2005; 36: 172-176.
56. Wells, G., Tugwell P., Shea B., Guyatt G., Peterson J., Zytaruk N. et al. Meta-analyses of therapies for postmenopausal osteoporosis. V. Meta-analysis of the efficacy of hormone replacement therapy in treating and preventing osteoporosis in postmenopausal women. *Endocr Rev*. 2002. 23:529-539.
57. Dick, SE., DeWitt DE., Anawalt B. Postmenopausal hormone replacement therapy and mayor clinical outcomes: a focus on cardiovascular disease, osteoporosis, dementia and breast and endometrial neoplasia. *Am J Manag Care*. 2002. 8: 95- 104.
58. Manson, JE., Hsia J., Johnson KC., Rossouw JE., Assaf AR., Lasser N., et al. Estrogen plus progestin and the risk of coronary heart disease. *New Engl J Med*. 2003. 349: 523.

59. Sugioka K., Shimosegawa Y., Nakano M. Estrogens as natural antioxidants of membrane phospholipid peroxidation. *FEBS Lett.* 1987; 210: 37-39.
60. Ayres S., Abplanalp W., Liu J., Ravi T. Mechanisms involved in the protective effect of estradiol-17 β on lipid peroxidation and DNA damage. *Am J Physiol.* 1998 274 (Endocrinol. Metab. 37): E1002-E1008.
61. Subbiah MT., Kessel B., Agrawal M., Rajan R., Abplanalp W., Rymaszewski Z. Antioxidant potential of specific estrogens on lipid peroxidation. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993; 77: 1095-1097.
62. Taniguchi S., Yanase T., Kobayashi K., Takayanagi R., Haji M., Umeda F., et al. Catechol estrogens are more potent antioxidants than estrogens for the Cu(2+) catalyzed oxidation of low or high density lipoprotein: antioxidative effects of steroids on lipoproteins. *Endocr J.* 1994. 41:605-611.
63. Markides C., Roy D., Liehr G., Concentration dependence of prooxidant and antioxidant properties of catecholestrogens. *Arch Biochem Biophys.* 1998; 360: 105-112.
64. McManus J., McEneny J., Young I.S., Thompson W. The effect of various oestrogens and progestogens on the susceptibility of low density lipoproteins to oxidation in vitro. *Maturitas.* 1996; 25: 125-131.
65. Ayres, SA., Tang M., Subbiah MT. Estradiol 17 β as an antioxidant: some distinct features when compared with common fat-soluble antioxidants. *J Lab Clin Med.* 1996. 128: 367-375.
66. Arteaga E., Rojas A., Villaseca P., Bianchi M., Arteaga A., Duran D. In vitro effect of estradiol, progesterone, testosterone and of combined estradiol/progestins on low density lipoprotein oxidation in postmenopausal women. *Menopause.* 1998; 5: 16-23.

67. Ke R., Todd D., Ahokas R. Effect of short-term hormone therapy on oxidative stress and endothelial function in African American and Caucasian postmenopausal women. *Fertil Steril.* 2003; 79: 1118-1122.
68. McManus J., McEneny., Thompson W., Young I.S. The effect of hormone replacement therapy on the oxidation of low density lipoprotein in postmenopausal women. *Atherosclerosis.* 1997; 135: 73-81.
69. Inal M., Sundal E., Kanvak G., Zeytinoglu S. Effects of postmenopausal hormone replacement and alpha-tocopherol on the lipid profiles and antioxidant status. *Clin Chem Acta.* 1998; 268: 21-29.
70. Ozden S., Dildar K., Hakan Y., Guilzar K. The effects of hormone replacement therapy on lipid peroxidation and antioxidant status. *Maturitas.* 2001; 38: 165-170.
71. Naziroglu M., Simsek M., Simsek H., Aydilek N., Ozcan Z., Artilgan R. The effects of hormone replacement therapy combined with vitamins C and E on antioxidant levels and lipid profiles in postmenopausal women with Type 2 diabetes. *Clin Chim Acta.* 2004; 344: 63-71.
72. Wen Y., Doyle M., Norris L., Sinnott M., Cooke T., Harrison R., et al. Combined oestrogen-progesterone replacement therapy does not inhibit low-density lipoprotein oxidation in postmenopausal women. *Br J Clin Pharmacol.* 1999; 47: 315-321
73. Bureau I., Anderson R., Arnaud J., Raysifuier Y., Favier A., Roussel A. Trace mineral status in post menopausal women: impact of hormonal replacement therapy. *J Trace Elem Med Biol.* 2002; 16: 9-13.
74. Bureau I., Laporte F., Favier M., Faure H., Fields M., Favier A. et al. No antioxidant effect of combined HRT on LDL Oxidability and Oxidative stress biomarkers in treated post menopausal women. *J Am Coll Nutr.* 2002; 21: 333-338.

75. Halliwell B. Grootveld M., The measurement of free radical reactions in humans. *FEBS* 73ip. 1987; 213 9-14.
76. Kaur I., Geetha T. Screening methods for antioxidants- a review. *Mini Rev Med Chem*. 2006; 6: 305-312.
77. Halliwell, B. Clement MV., Long LH. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett*. 2000. 486: 10-13
78. Long, LH. Evans PJ., Halliwell B. Hydrogen peroxide in human urine: implications for antioxidant defense and redox regulation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999. 262: 605-609.
79. Morrow, JD. Hill KE., Burk RE. A series of prostaglandin F₂-like 73ipídico73 are produced in vivo in humans by non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999. 87: 9383-9387.
80. Yagi, K. Simple assay for the level of total lipid peroxides in serum or plasma. *Methods in Molecular Biology*. 1998. 108: 101-106.
81. Armstrong, D., Browne R. The analysis of free radicals, lipid peroxides, antioxidant enzymes and compounds to oxidative stress as applied to the clinical chemistry laboratory. *Adv Exp Med Biol*. 1994. 366: 43-58.
82. Stadtman, ER., Oliver CN. Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *J Biol Chem*. 1991. 266: 2005-2008.
83. Beckman, KB., Arnes B. Oxidative decay of DNA. *J Biol Chem*. 1997. 272: 19633-19636.
84. Kampa, M. Nistikaki, A. Tsaousis V. A new automated method for the determination of the total antioxidant capacity (TAC) of human plasma, based on the crocin bleaching assay. *BMC Clinical Pathology*. 2002. 2: 3-18.

85. Lamon-Fava S, Herrington DM, Horvath KV, Schaefer EJ, Asztalos BF. Effect of hormone replacement therapy on plasma lipoprotein levels and coronary atherosclerosis progression in postmenopausal women according to type 2 diabetes mellitus status. Metabolism. 2010 Jun 24
86. Lamon-Fava S, Herrington DM, Reboussin DM, Sherman M, Horvath K, Schaefer EJ, Asztalos BF. Changes in remnant and high-density lipoproteins associated with hormone therapy and progression of coronary artery disease in postmenopausal women. Atherosclerosis. 2009 Jul;205(1):325-30
87. Lamon-Fava S, Posfai B, Asztalos BF, Horvath KV, Dallal GE, Schaefer E. Effects of estrogen and medroxyprogesterone acetate on subpopulations of triglyceride-rich lipoproteins and high-density lipoproteins. Metabolism. 2003 Oct;52(10):1330
88. Evola G, Novo G, Amoroso G, Guttilla D, Lo Coco L, Guagliardo M, Lupo A, Averna MR, Giambanco V, Miller V, Novo S. Modification of the lipidic and coagulative pattern in postmenopause women: effect of hormone replacement therapy. Int Angiol. 2010 Aug;29(4):355-61
89. Delibasi T, Kockar C, Celik A, Kockar O. Antioxidant effects of hormone replacement therapy in postmenopausal women. Swiss Med Wkly. 2006 Aug 5;136(31-32):510-4.
90. Leinonen J., Lehtimaki T., Toyokuni, S., et al. New biomarker evidence of oxidative DNA damage in patients with non insulin dependent diabetes mellitus. FEBS Lett. 1997. 417, 150-152.
91. Kanaya A., Herrington D., Vittinghoff E., et al. Glycemic effects of postmenopausal hormone therapy: The Heart and Estrogen/progestin Replacement Study. Ann Intern Med. 2003; 138: 1-9.

92. Espeland M., Hogan P., Fineberg S., et al. Effects of postmenopausal therapy on glucose and insuline concenetrations. *Diabetes Care* 21; 189-1595, 1998.

ANEXO 1

APROBACION CLOBI - HOPITAL SAN JUAN DE DIOS



CAJA COSTARRICENSE DE SEGURO SOCIAL
HOSPITAL SAN JUAN DE DIOS
"Institución Benéfica"
DIRECCIÓN GENERAL
COMITÉ LOCAL DE BIOÉTICA EN INVESTIGACIÓN



06 de Agosto del 2008
HSJD-4208-DG-2008

Doctor
Carlos Escalante Gómez
Servicio de Gineco-Obstetricia
Hospital México

Estimado doctor:

ASUNTO: Aprobación del Protocolo de Investigación "Impacto de la Terapia de Reemplazo Hormonal sobre el perfil oxidativo/antioxidativo de la mujer posmenopáusica"

De conformidad con lo establecido por el "Reglamento para la Investigación Biomédica en los Servicios Asistenciales de la Caja Costarricense de Seguro Social" y considerando que existe una recomendación previa del Comité Local de Bioética en Investigación del Hospital México (Oficio: DOHM-1962-2007 de fecha 10 de junio 2007), así como autorización de ese Centro Asistencial, esta Dirección General procede a **Aprobar** el desarrollo de su investigación.

INFORMACIÓN DEL PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN	
Nombre del Investigadores Principales:	Dr. Carlos Escalante Gómez
Nombre del Tutor (a) (si aplica):	Dr. Oscar Cerdas Salas
Nombre del (os) Centro (os) y el (los) Servicio (s) donde se desarrollará la investigación:	Hospitales: México y San Juan de Dios
Nombre de los miembros del CLOBI-HSJD que participaron en el análisis de este estudio:	CLOBI-HOSPITAL MÉXICO

Sin otro particular, se suscriben,

Dra. Ilegna Balmaceda Arce
Directora General a.i.



Dr. Carlos Miguel Cerdas M...
Coordinador CLOBI-HSJD



IBA/CACM/In

- Dr. Daniel Bustos, Sub-Área de Investigación y Bioética CENDEISS.
- Dr. Herman Montvelski Karolicki, Jefe, Sección de Ginecología, HSJD
- Dr. Oscar Cerdas Salas, Tutor Protocolo de Investigación.
- Archivo Clínico HSJD.
- Archivo (2)

COPIA

APROBACION CLOBI - UNIVERSIDAD DE COSTA RICA



Universidad de Costa Rica
Vicerrectoría de Investigación

Comité Ético Científico



27 de mayo de 2008
VI-3619-2008

Dra. Silvia Quesada
Departamento Bioquímica
Escuela de Medicina

Estimada señora:

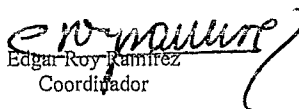
El Comité Ético Científico en su sesión No. 148, celebrada el 21 de mayo del presente año, sometió a consideración las modificaciones realizadas al Proyecto de Tesis de Maestría "Impacto de la terapia de reemplazo hormonal sobre el perfil oxidativo/antioxidativo de la mujer posmenopáusica: una posible opción para la prevención de enfermedades" del estudiante Carlos Escalante Gómez.

Después del análisis respectivo, los miembros del Comité acogen la aclaración realizada, por lo tanto acuerdan:

Acuerdo 7: Se ratifica la aprobación y por tanto la ejecución del Proyecto de Tesis de Maestría "Impacto de la terapia de reemplazo hormonal sobre el perfil oxidativo/antioxidativo de la mujer posmenopáusica: una posible opción para la prevención de enfermedades" del estudiante Carlos Escalante Gómez.

Se le recuerda que cualquier cambio realizado durante la ejecución del proyecto, debe ser comunicado a este Comité, asimismo quedamos en la entera disposición de colaborar con ustedes en todo lo que esté a nuestro alcance.

Sin más por el momento, se despide cordialmente,


Edgar Roy Ramírez
Coordinador



ERRB/ceim

C.e: Comisión de Posgrado, Ciencias Biomédicas.
Estudiante Carlos Escalante Gómez, Depto. Bioquímica
Archivo/consecutivo

ANEXO 2.

CONSENTIMIENTO INFORMADO



UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN

Escuela de Medicina

COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO

Teléfonos:(506) 2511-4201 Telefax: (506) 2224-9367

FÓRMULA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

(Para ser sujeto de investigación)

Impacto de la Terapia de Reemplazo Hormonal sobre el perfil oxidativo/antioxidativo de la mujer posmenopáusica: una posible opción para la prevención de enfermedad cardiovascular.

Código (o número) de proyecto: 422-A9-318

Nombre del Investigador Principal: Dr. Carlos Escalante Gómez

Nombre del participante: _____

PROPÓSITO DEL PROYECTO:

Durante algunos años atrás se han venido estudiando los posibles efectos protectores que pueden tener los antioxidantes en el cuerpo humano. Aparentemente estas sustancias antioxidantes al evitar que se oxiden ciertas sustancias en el cuerpo pueden, en algunos casos, retrasar o hasta prevenir la aparición de algunas enfermedades. Este proyecto de investigación se hace con el objetivo de medir en la sangre de mujeres que dejaron de tener la regla, sustancias que indiquen la actividad oxidativa y antioxidativa de las mujeres y poder encontrar el efecto que el tratamiento con hormonas (estrógenos) pueda tener sobre esta actividad. De esta manera, se trata de mostrar si el tratamiento con estrógenos puede tener un efecto beneficioso sobre la salud de la mujer al actuar como un antioxidante, y tal vez protegerla de algunas enfermedades.

¿QUÉ SE HARÁ?:

Si usted acepta participar en este estudio se le hará una entrevista acerca de su estado actual de salud y acerca de sus hábitos alimentarios para definir si puede participar en este proyecto de investigación. Si califica para el estudio, se le tomará una muestra de sangre de la vena del brazo con una jeringa nueva, que luego se descarta en el basurero. La muestra es de aproximadamente 10 mililitros (un tubo). Esta muestra será únicamente para los propósitos del estudio. Esta extracción podría tener que repetirse si la muestra se malograra o para confirmar cualquier resultado dudoso. También se recogerá una muestra de orina respetando las condiciones de privacidad de la persona. A estas muestras recogidas se les harán una variedad de pruebas de laboratorio cuyo fin es estudiar las propiedades antioxidativas de los estrógenos presentes en el tratamiento.

RIESGOS:

Básicamente no existen riesgos al participar en este estudio. Solamente se tomará una muestra de sangre y el malestar que esto puede causar será el efecto indeseable que notará. Todas las agujas son nuevas y estériles.

BENEFICIOS:

Como resultado de su participación en este estudio, usted logrará conocer su estado oxidativo y antioxidativo en sangre, de manera que se podrán tomar medidas correctoras para modificar su estado, si es necesario y posiblemente reducir la incidencia de algunas enfermedades. También es importante porque los investigadores aprenderán más del tema de antioxidantes y este conocimiento beneficie a otras personas en el futuro.

Antes de dar su autorización para este estudio usted debe haber hablado con el Dr. Escalante Gómez o con la Dra. Silvia Quesada sobre este estudio y ellos deben haber contestado satisfactoriamente todas sus preguntas. Si quisiera más información más adelante, puede obtenerla llamando al Dr. Escalante al teléfono número 88 31 92 77 de 8 am a 12 md de Lunes a Viernes ó a la Dra. Silvia Quesada al teléfono 88 23 44 55 de 8 am a 4 p.m. de Lunes a Viernes.

Además, puede consultar sobre los derechos de los Sujetos Participantes en Proyectos de Investigación al CONIS – Consejo Nacional de Salud del Ministerio de Salud, teléfonos 22 33 35 94, 22 23 03 33 extensión 292, de lunes a viernes de 8 a.m. a 4 p.m. Cualquier consulta adicional puede comunicarse a la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica a los teléfonos 2511-4201 ó 2511-5839, de lunes a viernes de 8 a.m. a 5 p.m.

Recibirá una copia de esta fórmula firmada para su uso personal.

Su participación en este estudio es voluntaria. Tiene el derecho de negarse a participar o a no continuar su participación en cualquier momento, sin que esta decisión afecte la calidad de la atención médica (o de otra índole) que requiere.

Su participación en este estudio es confidencial, los resultados podrían aparecer en una publicación científica o ser divulgados en una reunión científica pero de una manera anónima.

No perderá ningún derecho legal por firmar este documento.

CONSENTIMIENTO

He leído o se me ha leído, toda la información descrita en esta fórmula, antes de firmarla. Se me ha brindado la oportunidad de hacer preguntas y éstas han sido contestadas en forma adecuada. Por lo tanto, accedo a participar como sujeto de investigación en este estudio.

Nombre, cédula y firma del sujeto

fecha:

Nombre, cédula y firma del testigo

fecha:

Nombre, cédula y firma del Investigador que solicita el consentimiento

fecha: