

IPK
Instituto "Pedro Kourí"

Laboratorio de Farmacología Clínica

**Estrés oxidativo en pacientes VIH/SIDA
cubanos: intervención dietética y
suplementación antioxidante**

Tesis presentada en Opción al Grado de
Doctor en Ciencias Farmacéuticas

Autora: Lizette Gil del Valle

Tutores: Dra. Olga Sonia León Fernández, Ph.D.
Dr. Gregorio Martínez Sánchez, Ph.D.

Asesor: Dr. Jorge Pérez Avila, M.D.

Ciudad de La Habana / 2003

ABREVIATURAS

% F ADN: Porcentaje de Fragmentación del Ácido Desoxiribonucleico

Alb: Albúmina

ALT: Alanina amino transferasa

AZT:Zidovudine[®]

AU:Ácido Úrico

BD: Becton Dickinson

BHT: Hidroxitolueno butilado

CDC: Centro para el Control de Enfermedades de Atlanta

CQF: Centro de Química Farmacéutica

Creat: Creatinina

DE: Desviación estándar

EO: **Estrés Oxidativo**

ER: Especies Reactivas

ERN: Especies Reactivas de Nitrógeno

ERO: **Especies Reactivas de Oxígeno**

GPx: Glutación peroxidasa

GSH: Glutación reducido

GR:Glutación reductasa

GPxSe:Glutación peroxidasa dependiente de selenio

Hb: Hemoglobina

HPO: Hidroperóxidos

Hto: Hematocrito

IPK: Instituto Pedro Kourí

MDA: Malonildialdehído

NF-kB: Factor de Transcripción Nuclear -κB

OT: Organoperóxidos Totales

O₂⁻: Anión radical superóxido

¹O₂: Oxígeno singlete

[·]OH: Radical hidroxilo

Plq: Plaquetas

PP: Potencial de Peroxidación

PT: Proteínas Totales

PVVIH: Personas Viviendo con VIH

RL:Radical libre

SIDA: **Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida**

SOD: Superóxido dismutasa

SSV Sanatorio Santiago de las Vegas

TAS: Estado Antioxidante Total

Trx: Tiorredoxina

TrxR: Tiorredoxina reductasa

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana

SINTESIS

El presente estudio comprendió la caracterización del estado redox, nutricional e inmunológica de 82 individuos seropositivos al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) del sistema sanatorial de Cuba (Sanatorio Santiago de Las Vegas- La Habana). Como resultado se evidenció que existen diferencias significativas en todos los marcadores analizados con respecto a 40 individuos supuestamente sanos tomados como referencia, mientras que no existieron diferencias entre los grupos de clasificación (A2B2, A3B3). Al evaluar la influencia del incremento de la ingesta de micronutrientes dietarios en 40 individuos VIH⁺ sobre estos marcadores, durante un período de 3 meses, se apreciaron diferencias ($p < 0,05$) en el incremento de la capacidad antioxidante evaluada como TAS, GSH, GPx y SOD, sin efectos sobre el daño oxidativo evaluado como MDA, OT y % F ADN y sin modificaciones en los indicadores inmunológicos de progresión de la infección y el mantenimiento en un 56 % de adecuación de la ingesta diaria recomendada en cuanto a micronutrientes. Este resultado sugirió la necesidad del incremento de micronutrientes de tipo antioxidante en estos individuos. Al evaluar la influencia de la suplementación con Vimang[®] durante 6 meses sobre estos marcadores en 82 individuos VIH⁺, siguiendo un protocolo de ensayo clínico a doble ciego, monocéntrico y contra grupo placebo, se pudieron apreciar diferencias significativas ($p < 0,05$) hacia una evolución positiva en todos los marcadores de EO, comparando el grupo suplementado con el placebo, unido a una tendencia significativa de la disminución de CD95 en el grupo Vimang[®]. La evaluación global de la respuesta en este experimento evidenció una eficacia del producto Vimang[®] del 81,8% en el incremento de la capacidad antioxidante evaluado como TAS y PP y una eficacia de 43,9% en el incremento de la capacidad antioxidante con una disminución simultánea del daño oxidativo evaluado como MDA, OT y % F ADN frente a un 2% en el grupo placebo. En ambos estudios de intervención se evaluaron además índices bioquímicos de función renal, hepática y hematológica sin evidencias de toxicidad durante los períodos de experimentación. De igual manera no se apreciaron signos tóxicos o reacciones colaterales asociadas a la suplementación con Vimang[®].

INDICE

INTRODUCCIÓN

HIPOTESIS

OBJETIVOS

CAPÍTULO I REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

I.1 DESEQUILIBRIO REDOX

I.1.1 Mecanismos antioxidantes de defensa

I.1.2 Toxicidad celular de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno

I.1.3 Desbalance redox en la infección por VIH

I.2 MARCADORES BIOLÓGICOS DE PROGRESIÓN A SIDA

I.3 ESTUDIOS CONTROLADOS DE INTERVENCIÓN NUTRICIONAL Y SUPLEMENTACIÓN ANTIOXIDANTE EN PACIENTES VIH-SIDA

I.4 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL VIMANG®. ANTECEDENTES ETNOMÉDICOS Y PRECLÍNICOS

CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1 MATERIALES Y PARAMETROS A EVALUAR

II.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO

II.3 DISEÑOS EXPERIMENTALES

II.3.1 Consideraciones éticas generales en relación con los ensayos

II.3.2 Caracterización de la población VIH en relación con una población aparentemente sana

II.3.3 Estudio de la influencia del incremento en la oferta de micronutrientes dietarios

II.3.4 Estudio de la influencia de la suplementación con **Vimang®**

II.3.4.1 *Selección de sujetos*

II.3.4.2 *Vías de administración, dosis, frecuencia y duración del tratamiento*

II.3.4.3 *Evaluación de la eficacia*

II.4 DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS

II.4.1 Determinación del Estado Antioxidante Total

II.4.2 Determinación de Malonildialdehído

II.4.3 Determinación del Potencial de Peroxidación

II.4.4 Determinación de Organoperóxidos Totales

II.4.5 Determinación del Porcentaje de Fragmentación del ADN

II.4.6 Determinación del Glutatión reducido o grupos sulfidrilos no proteicos

II.4.7 Actividad de Superóxido dismutasa

II.4.8 Actividad de Glutatión peroxidasa

II.4.9 Determinación de función hematológica

II.4.10 Determinación de funciones hepática y renal

II.5 EVALUACIÓN DE INDICES NUTRICIONALES

II.6 CONTEO DE SUBPOBLACIONES LINFOIDES

II.7 ESTADÍSTICA

CAPÍTULO III. RESULTADOS

III.1 CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN VIH+

III.1.1 Características generales e inmunológicas.

III.1.2 Características del balance redox

III.1.3 Caracterización nutricional

III.2 ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL INCREMENTO EN LA OFERTA DE MICRONUTRIENTES DIETARIOS.

III.2.1 Características inmunológicas y clínicas

III.2.2 Características del balance redox

III.2.3 Características nutricionales

III.3 ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA SUPLEMENTACIÓN CON VIMANG®

III.3.1 Características generales

III.3.2 Características inmunológicas y clínicas

III.3.3 Características del balance redox

III.3.4 Características nutricionales

CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN

CAPITULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

BIBLIOGRAFIA

AUTOBIBLIOGRAFIA

ANEXOS

INTRODUCCIÓN

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), retrovirus linfotrópico de células T de la familia de los Lentivirus, fue descubierto en 1983 por Luc Montagnier y colaboradores (Barreras-Sinoussi *et al.*, 1983). Desde entonces la infección por el VIH se ha convertido en pandemia con cerca de 40 millones de personas infectadas a escala mundial y 3 millones de muertes por año, relacionadas con este virus. Los estudios con el fin de elucidar la patogénesis de la enfermedad persisten, lográndose avances en el conocimiento y el tratamiento de la enfermedad.

La progresión de la infección por el VIH produce el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), estado que definitivamente contribuye a un desgaste físico general del individuo y que conduce a la muerte (Alan *et al.*, 1998).

Actualmente se reconocen numerosos factores que contribuyen a la progresión de la infección al estado SIDA, aunque los mecanismos por los cuales esto ocurre no están totalmente esclarecidos. Entre los múltiples factores se incluyen los del hospedero: genéticos, inmunológicos, metabólicos y nutricionales, y los virales: las características de la cepa infectante (Mellors *et al.*, 1997; Alan *et al.*, 1998). Dentro de los factores metabólicos se ha reconocido el proceso asociado a la pérdida del estado redox celular que conduce a un estrés oxidativo (EO) (Schreck *et al.*, 1991).

En 1988, en la literatura relacionada con la infección por VIH, comenzaron a referirse investigaciones que mostraban una alteración de la concentración de algunos metabolitos de importancia en diferentes funciones fisiopatológicas, como el malonildialdehído (MDA) con un incremento con respecto a individuos sanos (Sonnerborg *et al.*, 1988). Las

implicaciones funcionales de este resultado eran que esta sustancia constituía un producto final de la peroxidación lipídica con efectos citotóxicos.

Otro de los metabolitos reportados en 1989 como alterados en estos individuos fue el glutatión reducido (GSH), que además de repercutir en el metabolismo oxidativo, su disminución con respecto a lo reportado para individuos sanos implicaba alteraciones en la regulación y estabilidad de células del sistema inmune, alteraciones en la regulación y expresión de genes y alteraciones en la detoxificación de sustancias (Buhl *et al.*, 1989).

Desde 1988 hasta la fecha numerosas investigaciones caracterizan el proceso de EO en estos individuos como una disminución de la capacidad antioxidante, que se manifiesta desde las etapas iniciales de la infección, aparejado a un incremento del daño oxidativo a las diferentes biomoléculas. Estas investigaciones refieren la evaluación de uno o dos de los biomarcadores reconocidos para la caracterización del balance redox. A medida que las investigaciones en esta rama se han incrementado, las técnicas han ido perfeccionándose y relacionándose con otros marcadores importantes en el curso de la infección (Sonnerborg *et al.*, 1988; Buhl *et al.*, 1989; Favier *et al.*, 1994; Repetto *et al.*, 1996; Walmsley *et al.*, 1997; Rabaud *et al.*, 1997; Herzenberg *et al.*, 1997; Look *et al.*, 1997; Israel y Gougerot-Pocidaló, 1997; McLemore *et al.*, 1998; Romero-Avila y Roche, 1998; Allard *et al.*, 1998a).

El EO que se produce en los individuos VIH+ posee un carácter multifactorial, en correspondencia con las propias características del proceso infeccioso y como consecuencia de la interrelación de varios eventos: la generación de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) inducidas por el virus *per se* y como resultado de la activación de linfocitos y polimorfonucleares (Foga *et al.*, 1997; Tzavara *et al.*, 1997), la generación de citoquinas pro-inflamatorias que se producen por estímulos oxidantes (Baeir-Bitterlich *et al.*, 1997) y

el agotamiento de sustancias antioxidantes endógenas (Nakamura *et al.*, 1996; Allard *et al.*, 1998a).

También como consecuencia de la generación crónica de ERO (Romero-Avila y Roche, 1998), altos requerimientos de antioxidantes dietarios debido al carácter crónico de la infección (Baum *et al.*, 1992), infecciones recurrentes por enfermedades oportunistas (Blanchard y Montagnier, 1994; Semba *et al.*, 1999), síndrome de desgaste (Macallan, 1998), síndrome de malabsorción (Greenon *et al.*, 1991; Suttman *et al.*, 1995; Keating *et al.*, 1995) y reacciones colaterales de la terapia específica antiviral y concomitante (Prakash *et al.*, 1997; Sepkowitz, 1998).

Investigaciones recientes en sistemas *in vitro* reconocen el papel de las ERO en la replicación de ciertos virus como el VIH y su influencia en la activación de vías de apoptosis como la mediada por el receptor CD95 y su ligando CD95L, ambos mecanismos relacionados con el Factor de Transcripción Nuclear NF- κ B (Okamoto *et al.*, 1997; Radrizzani *et al.*, 1997; Premanathan *et al.*, 1997; Ishikawa *et al.*, 1997; Seve *et al.*, 1999). Diversas teorías señalan al EO como un mediador importante de la muerte por apoptosis de células gliales, los linfocitos T CD4+ y los enterocitos, de las cuales el VIH es huésped. Este proceso influiría en el desarrollo de la demencia y los síndromes de inmunodeficiencia y malabsorción, todos asociados a la infección por VIH (Laurent-Crawford *et al.*, 1991; Greenspan *et al.*, 1994; Westendorp *et al.*, 1995; Strack *et al.*, 1996; Dobmeyer *et al.*, 1997; Shi *et al.*, 1998; Kruman *et al.*, 1998; Jaworowski y Crowe, 1999).

A pesar de la evolución de la terapia antirretroviral, su alta especificidad y efectividad, la misma no resuelve completamente las alteraciones inmunológicas y metabólicas características de la infección (Teixeira *et al.*, 1997; Sepkowitz, 1998). El tratamiento prolongado con las combinaciones antirretrovirales conlleva a eventos adversos y

colaterales que influyen en la calidad de vida del paciente y en la adherencia al tratamiento (Vittecoq *et al.*, 1998; Carr *et al.*, 1998; Masutani, 2000).

Investigaciones recientes vinculan estos eventos tóxicos con la generación de ERO producto de la biotransformación y eliminación de los fármacos mencionados que repercuten en el daño oxidativo a tipos celulares en órganos específicos relacionados con diversas funciones (Prakash *et al.*, 1997).

Diferentes grupos en el ámbito internacional han realizado ensayos clínicos con vitaminas antioxidantes y precursores, así como con extractos herbarios con evidentes resultados positivos para este tipo de pacientes. Incluso se han administrado estos antioxidantes de forma concomitante con antirretrovirales, aunque los resultados aún son controvertidos debido a la diversidad de diagnosticadores empleados (Delmas-Beauvieux *et al.*, 1996; Burack *et al.*, 1996; Akerlund *et al.*, 1996; Cho *et al.*, 1997; Allard *et al.*, 1998b; Look *et al.*, 1998; De Rosa *et al.*, 2000; Muller *et al.*, 2000).

Los estudios sobre la influencia de la nutrición en el curso de la infección han contribuido notablemente al reconocimiento del factor nutricional en la evolución del proceso infeccioso, aunque los efectos de la manipulación dietética sobre los biomarcadores indicativos de daño oxidativo no han sido reportados según la literatura consultada. Las intervenciones de tipo de suplementación vitamínica referidas, consideran a veces la evaluación de uno o dos biomarcadores de daño oxidativo, lo que a nuestro juicio resulta insuficiente para poder atribuir al estado nutricional, de forma concreta, un significado sobre el estado redox celular de estos pacientes, con independencia de la valoración de los marcadores de progresión de la infección que resultan de carácter obligado cuando de VIH/SIDA se trata.

En Cuba, hasta la fecha, existen alrededor de 4000 Personas Viviendo con VIH (PVVIH), distribuidos para su seguimiento clínico y tratamiento en dos sistemas, ambulatorio y sanatorial. Como consecuencia de la actualización constante en el conocimiento sobre la infección y la instauración de medidas gubernamentales para el apoyo nutricional y la prevención de la transmisión; la morbimortalidad y el contagio son bajos en nuestro país con respecto al área geográfica y a lo que acontece a escala mundial.

Actualmente se pretende, a través de las disciplinas involucradas en la atención al paciente, mejorar la calidad de vida de los mismos contribuyendo a una atención integral, para lo cual se implementa la evaluación de la eficacia de los regímenes terapéuticos empleados, además de introducir conceptos nuevos en la atención y el tratamiento. La terapia antioxidante promete ser una opción beneficiosa basada en el estado de EO crónico en estos pacientes, tanto a través de la intervención dietética, incrementando el consumo de alimentos ricos en micronutrientes antioxidantes y oligoelementos así como introduciendo la suplementación antioxidante natural. En este caso a través de la utilización de un producto cubano de potente actividad antioxidante de carácter multifuncional, que aporta sustancias con estas propiedades y también oligoelementos de función biológica reconocida y que son deficitarios en estos pacientes.

Teniendo en cuenta los antecedentes referidos planteamos la siguiente

HIPOTESIS

El desbalance redox, presente en los individuos seropositivos al VIH, es atenuado mediante el incremento del consumo de antioxidantes provenientes de la dieta o la suplementación.

OBJETIVOS

General

Caracterizar el comportamiento de biomarcadores del balance redox en PVVIH, establecer su relación con marcadores inmunológicos de progresión de la infección y modificar el desequilibrio redox tras la intervención con antioxidantes provenientes de la dieta o suplementos.

Específicos

- Caracterizar el estado redox, los marcadores de progresión de la infección por VIH y la adecuación de la dieta en PVVIH residentes del Sanatorio Santiago de Las Vegas.
- Establecer los efectos de un incremento en el suministro de micronutrientes dietarios en el estado redox, los marcadores de progresión de la infección por VIH y la adecuación de la dieta en PVVIH residentes del Sanatorio Santiago de Las Vegas.
- Evaluar los efectos de la suplementación con **VimangÒ** en PVVIH residentes del Sanatorio Santiago de Las Vegas, analizando sus efectos sobre los biomarcadores del balance redox, los marcadores de progresión de la enfermedad así como sus probables efectos tóxicos y reacciones colaterales.

La evaluación del EO asociado a diferentes patologías en humanos, en la biología y en los alimentos resulta cada vez más interesante para el conocimiento de los fenómenos moleculares involucrados y un mejor tratamiento de estos problemas de salud. La **novedad científica** de este trabajo consiste en que por primera vez se caracteriza el proceso de EO en PVVIH cubanos del sistema sanatorial mediante el empleo de 10 marcadores bioquímicos capaces de evidenciar daño o protección sobre el ADN, los lípidos y las proteínas así como otros indicadores relacionados con la valoración integrada del balance antioxidante –

prooxidante indicativo del estado redox celular. Se establece de esta forma un diagnóstico que contribuye a la atención integral de estos pacientes, el que se aplica por primera vez en la evaluación de la eficacia de una terapia alternativa. Además se conduce una intervención dietética y un ensayo clínico con un producto natural cubano con vistas a mejorar el estado redox de estos pacientes, sin antecedentes en la literatura especializada.

Adicionalmente se realiza un estudio controlado del posible efecto tóxico del producto **Vimang[®]** en humanos.

El **aporte teórico** del presente estudio se fundamenta en que el mismo permite establecer la caracterización sistémica del estado redox celular en PVVIH cubanos mediante 10 marcadores bioquímicos y su relación con marcadores inmunológicos de progresión de la enfermedad. A pesar de la complejidad del proceso de EO y su participación en eventos fisiológicos, numerosas evidencias reconocen el proceso como un posible blanco terapéutico que pudiera contribuir a la prolongación de la vida o al incremento de la calidad de esta, en ausencia de una vacuna terapéutica que tantos esfuerzos internacionales conlleva y la que aún no se dispone. Igualmente permite identificar la estrategia más efectiva para la atenuación del EO en estos individuos.

El **aporte práctico y social** de esta investigación viene dada porque permitió la formación de grupos multidisciplinarios, la incorporación de investigadores del Laboratorio de Farmacología Clínica del Instituto “Pedro Kourí” a los esfuerzos de evaluación y seguimiento del proceso de EO en diversas patologías llevadas a cabo por el Centro de Estudios para las Evaluaciones e Investigaciones Biológicas del Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de La Habana y permitió el entrenamiento y capacitación de dos profesionales del IPK en el diagnóstico del EO. La preparación teórica/práctica se

materializó a través del Diplomado “Balance oxidante-antioxidante: salud y enfermedad” desarrollado en dicha institución, así como con la participación de uno de los profesionales en dos cursos/entrenamientos internacionales auspiciados por la Sociedad Internacional de Investigación sobre Radicales Libres (FRRS) “Plant polyphenols antioxidants in the biology and pathology of free radicals” y “Free radicals, nitric oxide and inflammation: molecular, biochemical and clinical aspects”.

La presentación de trabajos en ambos eventos permitió a la autora obtener la membresía de la Sociedad por un año.

La introducción y el empleo de los marcadores de EO permitirán el monitoreo de este proceso y la evaluación integral de los pacientes en Cuba, así como evaluar la influencia de las terapias alternativas o específicas sobre el mismo. La evaluación nutricional realizada a los PVVIH en el sistema sanatorial se revirtió en un aporte al conocimiento del estado nutricional de los mismos y permitió tomar las medidas para su adecuación. El **rigor científico** con que se condujeron los estudios clínicos permitirán la utilización de estos resultados para la comercialización y extensión del suplemento nutricional **Vimang®**.

El presente trabajo fue realizado básicamente en las instalaciones del Laboratorio de Farmacología Clínica del IPK, con la colaboración del Centro de Química Farmacéutica, el Instituto de Farmacia y Alimentos (UH) y el Sanatorio Santiago de Las Vegas. La tesis cuenta con 85 páginas, distribuidas en 5 capítulos.

CAPÍTULO I REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

I.1 DESEQUILIBRIO REDOX

El equilibrio que se establece entre los sistemas oxidantes y antioxidantes, es esencial en el desarrollo de los organismos vivos. Este balance redox se establece a nivel fisiológico, siendo esencial para la regulación metabólica, en la activación e inactivación de biomoléculas, la transducción de señales, la obtención de energía metabólica, el recambio y la activación celular. El desequilibrio, a favor de los procesos de oxidación, por un exceso en la producción de ERO, el debilitamiento de los sistemas antioxidantes, o por ambas causas, es lo que se conoce como EO (Grisham y McCord, 1986; García *et al.* 1994; Sahnoun *et al.* 1997; Delatrade y Bonnefont-Rousselot, 1998).

El término ERO engloba a los radicales libres (átomos, iones o moléculas con uno o más electrones no apareados en el orbital más externo) y a las moléculas derivadas del oxígeno que tengan alta capacidad reactiva, que en conjunto constituyen un elemento básico en la defensa antimicrobiana y antitumoral (Southorn y Powis, 1988). La generación excesiva de ERO puede dañar al ADN, lípidos, proteínas y carbohidratos; conociéndose numerosas condiciones clínicas en las que están involucradas (Weiss, 1989; Frenk, 1995; Singh, 1997; Peterhans, 1997a).

Debido a su efecto destructivo, las ERO se producen en los leucocitos contra agentes externos nocivos. La mayoría de los organismos utilizan mecanismos para evitar la acumulación de las mismas, ya que pueden reaccionar con otras biomoléculas cercanas, produciendo reacciones de oxidación que deterioran a las diferentes biomoléculas estructurales, resultando en alteraciones funcionales a escala celular. Los mecanismos

antioxidantes de defensa endógenos normalmente protegen contra este daño (Sahnoun *et al.*, 1997).

I.1.1 Mecanismos antioxidantes de defensa

Se define como antioxidante a toda sustancia que hallándose presente a bajas concentraciones respecto a las de un sustrato oxidable (biomoléculas), retarda o previene la oxidación de dicho sustrato. El primer componente de los mecanismos de defensa antioxidante es la barrera fisiológica que limita el paso del oxígeno desde el aire inspirado hasta las células (Singh, 1997).

Los llamados antioxidantes primarios son los que convierten las ERO en moléculas menos perjudiciales antes de que reaccionen con estructuras vitales, o evitan su producción (Halliwell, 1990; Sahnoun *et al.*, 1997). En este grupo se destacan: las superóxido dismutasas (SOD, SOD Mn, SOD CuZn), glutatión peroxidasa dependiente de selenio (GPx Se), glutatión reductasa (GR), peroxidasas, catalasa, glutaredoxina, tiorredoxina (Trx) y proteínas que fijan metales como la ferritina y la ceruloplasmina (Diplock, 1998; Jin *et al.* 1997).

Los antioxidantes secundarios, al reaccionar con un radical libre (RL) le ceden un electrón oxidándose a su vez y transformándose en un RL débil no tóxico y que, en algunos casos, como el de la vitamina E, puede regenerarse a su forma reducida por la acción de otros antioxidantes y de esta manera evitan las reacciones en cadena. Ejemplos de ellos tenemos: las vitaminas C y E, β -carotenos, ácido úrico (AU), bilirrubina, albúmina (Alb) y ubiquinona entre otros (Nishikimi, 1975; Cabelli y Bielski, 1983; Diplock, 1998; Olson, 1993; Seddon, 1994; Krinsky, 1994; Chen y Tappel, 1995; Olson, 1996, Asensi *et al.* 1999).

Hay un sistema antioxidante terciario constituido fundamentalmente por macroxiproteinasas, fosfolipasas A₂ y C, endo y exonucleasas, ADN glicosilasa, peroxidasas y metionina sulfóxido reductasa (Diplock, 1994; Reid y Loeb, 1993; Sahnoun *et al.*, 1997) cuyas funciones son:

- Reparación directa del daño a proteínas, ADN, ARN, lípidos y carbohidratos.
- Degradación de las moléculas oxidadas conservando estructuras básicas no dañadas (aminoácidos, nucleótidos y ácidos grasos).
- Eliminación de los productos dañados irreversiblemente.

Otra clasificación es la que divide a los antioxidantes en **exógenos** o que ingresan a través de la dieta, requiriendo continua reposición y los **endógenos** que son sintetizados por la célula.

Entre los **endógenos** tenemos:

- Enzimas antioxidantes (MnSOD, CuZnSOD, ECSOD, catalasa, GPxSe/GR, Trx/Tioredoxina reductasa (TrxR))
- Antioxidantes preventivos que son secuestradores de metales de transición (transferrina, lactoferrina, ferritina, ceruloplasmina, Alb, haptoglobina y hemopexina, metalotioneínas)
- Sustancias endógenas con capacidad antioxidante (GSH, urato, bilirrubina, ubiquinonas)

Entre los **exógenos** están:

Naturales: se encuentran en los alimentos y se incorporan a través de la dieta (Vit. E, Vit. C, β -carotenos, Ácido lipoico, Selenio, Flavonoides)

Sintéticos (Diplock, 1994; Singh, 1997; Delatrade y Bonnefont-Rousselot, 1998):

- Preventivos secuestradores de metales de transición (deferroxamina, α -ceto-hidroxipiridinas)
- Capturadores de ERO (21-amino-esteroides, 2-metil-aminocromanos, pirrolopirimidinas, con esqueleto del BHT, fenil-tert-butil-nitrona, n-acetil-cisteína, Antinflamatorios no esteroideos, probucol, β -bloqueadores, bloqueadores de los canales de calcio, inhibidores de enzima convertidora de angiotensina)
- Inhibidores de xantina oxidasa (alopurinol)
- Enzimas antioxidantes de uso terapéutico (PEG-SOD o Pyran-SOD, desferral/MnIII, Fe-TPEN, Fe-TPAA, EUK-8, M40403, Ebselen)
- Inhibidores de la NADPH oxidasa (oxatomida)
- Oligoelementos (Zinc, Hierro, Cobre, Selenio, Magnesio)

I.1.2 Toxicidad celular de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno

La toxicidad de ERO y Especies Reactivas del Nitrógeno (ERN) median el daño celular, afectando primeramente diferentes blancos biológicos como son: proteínas, ADN, ARN, lípidos y carbohidratos, en este orden de reactividad. La citotoxicidad de las biomoléculas oxidadas produce disturbios metabólicos de diferentes órganos y sistemas.

El EO está involucrado en la patogenia de enfermedades infecciosas y no infecciosas (Southorn y Powis, 1988; Brent y Rumack, 1993; Cheeseman, 1993; Dianzani, 1993; Peterhans, 1997; Delatrade y Bonnefont-Rousselot, 1998).

PROTEINAS: Las ER son capaces de oxidar los grupos -SH de las proteínas. Los aminoácidos más sensibles son el triptófano, tirosina, fenilalanina, metionina y cisteína. En

especial, el $\cdot\text{OH}$ interactúa con aminoácidos y, en ocasiones, genera daños puntuales a proteínas que están unidas a metales de transición. Las proteínas dañadas en el residuo metionina pueden ser reparadas por la enzima metionina sulfóxido reductasa, el reconocimiento de daños en otros sitios conduce a la hidrólisis por acción de proteasas (Grisham y McCord, 1986; Singh, 1997).

La autoxidación de los grupos $-\text{SH}$ de la enzima ATPasa dependiente de calcio del retículo sarcoplásmico conduce a su inhibición (Scherer y Deamer, 1986) y al consecuente daño celular originado por la pérdida de la homeostasia del calcio (Kaneko *et al.*, 1994). El influjo de este catión al interior celular activa proteasas, endonucleasas y fosfolipasas que contribuyen a la disrupción de la bicapa lipídica (Orrenius *et al.* 1992). El ataque de los radicales a las proteínas constitutivas produce un aumento en los grupos carbonilos conjuntamente con un incremento en la degradación de proteínas (Piedimonte *et al.*, 1997).

ADN: Los daños fundamentales son la hidroxilación de las bases de ADN, entrecruzamientos, escisión de hebras e inhibición de la síntesis de proteínas, nucleótidos y ácidos grasos (Southorn y Powis, 1988), y son causados por $\cdot\text{OH}$ y $^1\text{O}_2$, este último ataca fundamentalmente a la guanina. El H_2O_2 y el $\text{O}_2^{\cdot-}$ no atacan al ADN (Nagano y Fridovich, 1985; Marnett y Burcham, 1993).

Las alteraciones estructurales del ADN son directas o causadas por la inactivación de las enzimas encargadas del reconocimiento de anomalías en el ADN (Reid y Loeb, 1993).

Algunos productos de la reacción de las ERO atacan al grupo 3-OH en el esqueleto del azúcar fosfato, necesario para el funcionamiento de la enzima reparadora ADN ligasa. En estas condiciones el proceso de reparación, da lugar a la “reparación suicida” (Borg y Schaich, 1988; Kinloch *et al.*, 1999). La movilización de Ca^{2+} inducida por ERO puede

activar una endonucleasa dependiente de Ca^{2+} y provocar la fragmentación del ADN (Orrenius *et al.* 1989; Fernández *et al.*, 1995). Las histonas son un blanco primario de las ERO (Greenspan y Aruoma, 1994).

LIPIDOS: Las ER provocan la oxidación de los ácidos grasos polinsaturados y de los fosfolípidos de membrana. La peroxidación lipídica conduce a un aumento considerable de la permeabilidad de las membranas celulares, originando alteraciones irreversibles de las propiedades funcionales de la célula que pueden conducir a su lisis total. Los procesos de peroxidación conducen a la formación de numerosos derivados tóxicos, los hidroperóxidos, el MDA, el hidroxinonal (HNE) entre otros (Grisham y McCord, 1986; Siems *et al.*, 1998; Zwart *et al.*, 1999).

I.1.3 Desbalance redox en la infección por VIH

El EO se reconoce asociado a la fisiopatología de varias enfermedades (Frenk, 1995; Peterhans, 1997a). Numerosas evidencias experimentales vinculan este proceso al desarrollo de enfermedades virales como es el caso de la infección por VIH (Rabaud *et al.*, 1997; Peterhans, 1997b; Allard *et al.*, 1998)a.

Las primeras evidencias de la presencia de EO en estos pacientes aparecen en 1988 con reportes del incremento de MDA, como índice de daño oxidativo a los lípidos, en individuos VIH+ con respecto a un grupo de individuos sanos (Sonnerborg *et al.*, 1998) y en 1989 se reporta en un grupo de individuos VIH+ asintomáticos, deficiencia de GSH sistémico (Buhl *et al.*, 1989).

En 1991 un grupo de investigadores en Munich observaron, en una prueba de laboratorio, que el H_2O_2 , molécula de reconocido carácter oxidante, añadido a células infectadas con VIH, estimulaba la replicación viral con incremento en la expresión del

factor de transcripción nuclear conocido como NF- κ B (Schreck *et al.*, 1991). Lo que llevó a la comunidad científica a diseñar investigaciones experimentando la posible relación de la instauración de este proceso con la evolución de la enfermedad, así como la relación entre el EO y otros eventos metabólicos en la infección por VIH. Actualmente se reconoce que la infección viral produce una activación del sistema inmune comprometida con un proceso de inflamación crónica, donde se alteran las funciones celulares que conducen a una disminución de la proliferación celular y a una disminución del proceso de fagocitosis. Como resultado del metabolismo activado de estos subtipos celulares se producen las ERO (Tzavara *et al.*, 1997).

Como se aprecia en la Tabla I.1 numerosas evidencias *in vivo* sugieren que durante la infección por VIH, tanto en adultos como en niños, la generación sostenida de ERO va acompañada de una disminución progresiva de la capacidad antioxidante, con daño a diferentes biomoléculas importantes en el funcionamiento celular y tisular (Favier *et al.*, 1994; Repetto *et al.*, 1996; Marmor *et al.*, 1997; Walmsley *et al.*, 1997; Israel y Gougerot-Pocidaló, 1997; Look *et al.*, 1997; Herzenberg *et al.*, 1997; Allard *et al.*, 1998a; McLemore *et al.*, 1998; Opalenik *et al.*, 1998). No debemos dejar de señalar que estos estudios, a pesar de evidenciar la asociación entre el EO y el VIH/SIDA, carecen de un enfoque sistémico que refleje el verdadero balance entre las influencias prooxidantes y las antioxidantes; pues no se trata de evaluar parámetros individuales sino que se requiere conocer el estado redox celular del paciente. A nuestro juicio esta puede ser una de las razones que contribuye al carácter controvertido de la farmacoterapia antioxidante en pacientes VIH/SIDA.

De los reportes de estas investigaciones podemos concluir que la concentración de GSH y otros compuestos de carácter antioxidante, así como la actividad de la GPx y la capacidad antioxidante total del suero, todos de vital importancia en la defensa del organismo y en

otras funciones fisiológicas, se encuentran dramáticamente disminuidas desde el estado asintomático de la infección. Conjuntamente con estos reportes, marcadores indicativos de daño a lípidos (hidroperóxidos (HPO) y MDA) y a proteínas (cisteína) se reportan aumentados.

Investigaciones en sistemas *in vitro*, en relación con la infección por VIH, reproducen la generación de sustancias de carácter oxidante en presencia o no de otras sustancias de reconocido carácter antioxidante, evidenciando el posible daño de las ERO a las diferentes biomoléculas, así como el papel protector de las sustancias antioxidantes al disminuir este daño (Piedimonte *et al.*, 1997; Foga *et al.*, 1997).

El daño oxidativo a las proteínas de linfocitos infectados por VIH, se caracteriza por el incremento de grupos carbonilos, lo que repercute en la activación de sistemas proteolíticos que degradan incluso proteínas recién sintetizadas. Esta anomalía puede llevar a los linfocitos a una reducción del tamaño que los conduciría a una mitosis letal (Piedimonte *et al.*, 1997).

Otros metabolitos y oligoelementos de importancia para el balance redox celular han sido estudiados en individuos VIH+. Entre ellos ha resultado muy interesante la variación en la concentración de óxido nítrico (NO) y de hierro (Fe) (Boelaert *et al.*, 1996; Peterhans, 1997). Debido al comportamiento bimodal (antioxidante y prooxidante) del NO y la participación del mismo en eventos fisiológicos y patológicos resulta complejo el análisis de su variación (Beckman *et al.*, 1990; Radi *et al.*, 1990; Moncada *et al.*, 1991; Stamler *et al.*, 1992; Huie y Padmaja, 1993). Con respecto al Fe, su reconocido papel en el daño a las biomoléculas, (Haber y Weiss, 1934; Halliwell y Gutteridge, 1988) permite inferir su marcada influencia en la evolución de la infección en pacientes VIH + hemofílicos y con otras enfermedades hematológicas.

Implicaciones fisiopatológicas del EO en la infección por VIH

Tat, proteína viral reguladora de la transcripción contribuye al incremento del EO a través de la represión de la expresión de la SOD Mn, conjuntamente con la disminución de la concentración de GSH, lo que influye en la proliferación celular y en la inducción del proceso de apoptosis (Premanathan *et al.*, 1997; Kruman *et al.*, 1998).

Células HeLa productoras de la proteína Tat han sido empleadas como modelo para evaluar la influencia de sustancias en el mecanismo molecular de apoptosis, así el Paraquat de carácter oxidante resulta en un incremento de la apoptosis y sustancias miméticas a la SOD, como la mercaptopropionilglicina y otros antioxidantes producen una disminución del índice de proliferación celular con inhibición del proceso de apoptosis (Seve *et al.*, 1999).

Otra línea de investigación ha demostrado que el EO es un paso fundamental en la activación del factor NF- κ B y que la acción de los antioxidantes no solo inhiben la degradación de la subunidad κ B asociada al factor (Lee *et al.*, 1997), sino también la expresión de la proteína Tat como una manifestación de la supresión de la expresión de genes virales, en células Jurkat (Radrizzani *et al.*, 1997; Shatrov *et al.*, 1997).

El empleo de antioxidantes ha sido efectivo también en la protección contra el daño oxidativo por ERO generadas por proteínas virales como gp-120 a biomoléculas, como lípidos, sugiriendo que la toxicidad viral puede ser inhibida por el empleo de los mismos (Foga *et al.*, 1997).

En la infección por VIH se producen también trastornos gastrointestinales por afectación de la membrana e inflamación crónica de la lámina propia, producto de la localización intestinal del virus y de los efectos de la infección. Debido al consumo

energético específico de los individuos que padecen la infección por VIH (asintomáticos y sintomáticos) y de la activación sostenida del sistema inmune, los requerimientos nutricionales de estos individuos se encuentran alterados, generalmente incrementados (Baum *et al.*, 1992; Macallan, 1999). Estos sucesos inciden en la incorporación de sustancias esenciales para el funcionamiento de los mecanismos antioxidantes de defensa, lo que conlleva a deficiencia de micronutrientes. Estas deficiencias potencian el EO ya presente en los pacientes, ya que muchos de los micronutrientes son cofactores de sistemas antioxidantes que contribuyen a la capacidad antioxidante total del organismo.

Como se observa en la Tabla I.2, la determinación de diferentes micronutrientes en muestras de plasma y suero de pacientes, han evidenciado concentraciones bajas de vitaminas A y E así como concentraciones bajas de oligoelementos como el Zinc y el Selenio que son componentes importantes de enzimas con propiedades antioxidantes como la SOD y la GPx (Beach *et al.*, 1992; Semba *et al.*, 1993).

El EO ha sido considerado como un cofactor en la progresión de la infección por VIH hacia el estado SIDA, asociado al aumento de la carga viral (Schreck *et al.*, 1991; Cullen, 1991; Premanathan *et al.*, 1997; Walmsley *et al.*, 1997), y la disminución de los linfocitos T CD4+ (apoptosis) (Terai *et al.*, 1991; Greenspan y Aruoma, 1994; Romero-Avila y Roche, 1998; Jaworowski y Crowe, 1999), que ocasiona una depresión en la respuesta del sistema inmune.

El EO está relacionado con el cuadro de demencia asociado al SIDA (Epstein y Gelbard, 1999), así como con la neuropatía y los procesos degenerativos involucrados en el síndrome de malabsorción y el de desgaste físico (Suttman *et al.*, 1995; Macallan, 1998; 1999).

Otras investigaciones aportan elementos en cuanto a la posible relación del EO en la toxicidad celular inducida por antirretrovirales como el AZT (Zidovudine®), lo que pudiera aportar al esclarecimiento de la significación de las alteraciones metabólicas observadas en los pacientes que llevan tratamiento con este tipo de medicamento (Prakash *et al.*, 1997).

El conocimiento de los procesos oxidativos y sus implicaciones fisiopatológicas pueden contribuir a la búsqueda de estrategias terapéuticas (farmacológicas y nutricionales) efectivas dirigidas a los pacientes con VIH/SIDA (Maxwell, 1997). Resulta lógico entonces, la alternativa del empleo de la manipulación antioxidante que permita proteger o atenuar el daño celular mediado por ERO, lo que pudiera, a su vez, repercutir en un enlentecimiento de la progresión de la infección retroviral (Wang y Watson, 1993; Castetbon *et al.*, 1997; Semba y Tang, 1999).

Diferentes grupos de investigadores trabajan en estas líneas en el mundo, aunque existen resultados controvertidos acerca del uso de la terapia antioxidante en el curso de la infección, a consecuencia de las funciones fisiológicas normales en las que participa la oxidación y además por ser evidente que los estados patológicos son el resultado de una compleja interacción entre los procesos del hospedero y del virus. El estudio de los mecanismos moleculares de acción de las diferentes sustancias reconocidas como antioxidantes, podrían aportar al establecimiento de las bases científicas para la terapia con antioxidantes en la infección por VIH .

Las evidencias expuestas anteriormente y otros resultados han llevado a suponer el posible beneficio del empleo de los antioxidantes en el manejo de la infección por VIH, referente a su posible acción antiviral, aunque prevalecen algunos aspectos contradictorios como pudiera ser la dosis a emplear y el estado latente del virus en células reservorios.

Algunos grupos de investigación sugieren altas dosis de antioxidantes en correspondencia con la dosis ensayada *in vitro*, pero aún así con la limitada absorción *in vivo*, no se alcanzaría la concentración deseada para lograr los efectos esperados y estas altas dosis pudieran conducir a efectos no deseables en células del sistema inmune con la consiguiente activación de mecanismos moleculares de síntesis proteica y proliferación celular (Greenspan y Aruoma, 1994).

Otros grupos proponen el empleo de bajas dosis de antioxidantes lo que pudiera producir efectos opuestos, con la consiguiente activación del NF- κ B y de la replicación viral (Lee *et al.*, 1997). Luego, el empleo de los antioxidantes pudiera resultar en un efecto bimodal de acuerdo a la dosis empleada, lo que nos señala prudencia en el diseño de terapias anti-VIH basadas en antioxidantes y también a la necesidad de desarrollar ensayos clínicos donde se controlen estos aspectos y se demuestre la eficacia en correspondencia con la ética de la infección. Por otra parte una caracterización del estado redox celular general de estos individuos pudiera ser esencial en las dosificaciones más adecuadas a emplear en cada caso.

I.2 MARCADORES BIOLÓGICOS DE PROGRESIÓN A SIDA

El diagnóstico de laboratorio de la infección por VIH y los marcadores de progresión constituyen un tema de gran importancia dado que permiten predecir el desarrollo de la infección independientemente de la aparición de los síntomas clínicos, siendo útiles al ser empleados para instaurar precozmente medidas profilácticas y terapéuticas, así como la evaluación de la eficacia y monitorización de tratamientos en la infección (Cullen, 1991; CDC, 1993; Mahalingam *et al.*, 1995).

Para que un marcador biológico satisfaga plenamente la definición de marcador sustitutivo en la infección por VIH, debe cumplir dos requisitos: a) las variaciones de los valores del marcador a lo largo del tiempo deben tener correlación con el riesgo de progresión clínica de la infección; y b) cualquier efecto de un tratamiento sobre el riesgo de progresión clínica debiera ser explicable y predecible por su acción sobre el marcador sustitutivo (Colburn, 1997).

Hasta el momento actual, no ha sido identificado en la infección por VIH ningún marcador sustitutivo completo predictivo de progresión clínica debido posiblemente a la diversidad de los factores que influyen en el desarrollo de la enfermedad (Alan *et al.*, 1998). Estudios recientes han demostrado que la utilización, de formas combinadas, de diversos marcadores inmunológicos y serológicos, que individualmente tienen un valor predictivo parcial, incrementan el poder predictivo de cada uno de ellos (Colburn, 1997). Debido a la alta incidencia de enfermedades oportunistas durante la infección y la alteración inmunológica y metabólica que la caracteriza, la evaluación de la función de diversos sistemas como el renal y hepático es de vital importancia incluso para valorar la incidencia de los diferentes regímenes terapéuticos.

Hasta el momento actual la combinación más potente que existe de marcadores lo constituyen el conteo absoluto de linfocitos T CD4+ y la carga viral, pero tiene el inconveniente que este último es muy costoso, aunque constituye el único indicador directo de la actividad del virus en el organismo (Mellors *et al.*, 1997).

CD4: El descenso del número de linfocitos T CD4+ está considerado como uno de los más potentes marcadores predictivos de evolución a SIDA en la historia natural de la infección por VIH (Alan *et al.*, 1998). Se ha demostrado una fuerte asociación entre el

número de células T CD4 + y el riesgo de progresión (Groux *et al.*, 1991; Terai *et al.*, 1991). El EO es uno de los factores involucrados en la inducción de la apoptosis de esta subpoblación de linfocitos, ya que ERO como el H₂O₂, está involucrada en la activación de genes c-Jun/ AP-1 sin mediación de citoquinas (Gougeon *et al.*, 1991; Shatrov *et al.*, 1997; Schoonbroodt *et al.*, 1997; Dobbmeyer *et al.*, 1997).

CD95: El gen *tat* está involucrado en la expresión de CD95L, ligando asociado al CD95 (Fas/APO-1). De la interacción de ambos se produce la activación de la apoptosis (Aries *et al.*, 1995; McCloskey *et al.*, 1995; Gehri *et al.*, 1996; Sloand *et al.*, 1997; Bohler *et al.*, 1997). Las ER están involucradas tanto en la expresión de CD95L como en su interacción con CD95. Esto se concluye de investigaciones realizadas con compuestos antioxidantes que inhibiendo ambos pasos, bloquean la apoptosis (Greenspan y Aruoma, 1994; Jaworowski y Crowe, 1999).

CD8⁺/CD38⁺: En el curso de la infección por VIH se generan marcadores de activación celular, indicativos de la progresión de la enfermedad (Jackson y Bellesia, 1990; Mahalingam *et al.*, 1995). Se ha demostrado que la elevada proporción de linfocitos T CD8⁺/CD38⁺, tiene valor predictivo de progresión a SIDA y que esta subpoblación disminuye durante el tratamiento con AZT (Froebel *et al.*, 2000), a su vez se ha comprobado que el aumento de la Trx plasmática correlacionado con una disminución del GSH intracelular y con cambios en la expresión de antígenos de superficie como el CD38, es característico de estadios tardíos de la infección (Alessio *et al.*, 1998).

I.3 ESTUDIOS CONTROLADOS DE INTERVENCION NUTRICIONAL Y SUPLEMENTACION ANTIOXIDANTE EN PACIENTES VIH-SIDA

La infección por VIH, el estado nutricional y la función del sistema inmune están íntimamente relacionados, cada factor tiene su efecto sobre los otros. La influencia de la infección sobre el estado nutricional es muy importante, hecho este que se manifestó inicialmente como el síndrome de desgaste físico (Suttman *et al.*, 1995; Castetbon *et al.*, 1997; Macallan, 1998; 1999) y que en el momento actual de la terapia antirretroviral se manifiesta en otras anormalidades metabólicas como son: la lipodistrofia, la hipercolesterolemia y la hiperlipidemia (Pujol *et al.*, 2000).

El uso de los antioxidantes en PVVIH, ha evolucionado, contando actualmente con reportes de ensayos en humanos que evidencian el efecto de micronutrientes dietarios y sintéticos de carácter antioxidante en diferentes aspectos de la enfermedad (Mocchegiani *et al.*, 1995; Burack *et al.*, 1996; Akerlund *et al.*, 1996; Coodley *et al.*, 1996; Hussey *et al.*, 1996; Delmas-Beauvieux *et al.*, 1996; Cho *et al.*, 1997; Allard *et al.*, 1998b; Look *et al.*, 1998; Fawzi *et al.*, 1998; De Rosa *et al.*, 2000).

Como se aprecia en la Tabla I.3, los estudios controlados de intervención nutricional en pacientes VIH/SIDA han estado dirigidos a los diferentes grupos epidemiológicos (adultos heterosexuales, mujeres embarazadas, niños y hombres homosexuales). Estos ensayos se han desarrollado fundamentalmente con el incremento del consumo de un micronutriente individual o combinaciones de ellos a través de la suplementación, luego de que numerosas investigaciones han esclarecido que los requerimientos nutricionales de estos individuos no pueden ser satisfechos a través de una dieta balanceada (Castetbon *et al.*, 1997).

Los resultados de estos estudios de suplementación no pueden ser extrapolados a otros grupos de riesgo, pero contribuyen a reconocer la influencia de la nutrición y de las sustancias de carácter antioxidante como las vitaminas A, E y C en el sistema inmune y como consecuencia en el progreso de la infección (Muller *et al.*, 2000).

Otros antioxidantes como la N-acetilcisteína (Aruoma, 1989; Akerlund *et al.*, 1996; Herzenberg *et al.*, 1997; Look *et al.*, 1998; De Rosa *et al.*, 2000) y oligoelementos como el selenio (Delmas-Beauvieux *et al.*, 1996) y el zinc (Mocchegiani *et al.*, 1995), han sido suministrados en estudios controlados, reportándose beneficios en su empleo.

De igual forma, ha sido satisfactorio el empleo de extractos de hierbas de probado efecto medicinal y que, a través de la experimentación *in vitro*, se ha reconocido su carácter antioxidante (Burack *et al.*, 1996; Aruoma *et al.*, 1996a; Aruoma *et al.*, 1996b; Cho *et al.*, 1997). Los resultados de estos estudios nos llevan a concluir que ningún micronutriente o sustancia antioxidante es probablemente efectivo solo y que la acción sinérgica entre varios de ellos es necesaria.

El seguimiento clínico y la evaluación de indicadores de toxicidad en los pacientes involucrados no ha aportado evidencias de efectos tóxicos durante el consumo de estas sustancias. Por otra parte, se debe señalar la importancia y utilidad del diagnóstico de los índices bioquímicos de daño oxidativo, diagnóstico que puede contribuir, conjuntamente con la determinación de los marcadores de progresión de la enfermedad, a evaluar la eficacia de los tratamientos antioxidantes. Es importante distinguir entre la administración de vitaminas y micronutrientes como soporte nutricional de la respuesta inmune, lo que parece probable a partir de los resultados obtenidos de los estudios realizados y el uso farmacológico de altas dosis de antioxidantes, como terapia preventiva antiviral en la infección por VIH, ya que su utilidad en la supresión de los efectos citopáticos de la

infección permanece como un aspecto controversial que necesita de diseños de ensayos clínicos controlados con el debido rigor científico.

I.4 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL Vimang[®]. ANTECEDENTES ETNOMÉDICOS Y PRECLÍNICOS

Estudios etnofarmacológicos realizados por el Centro de Química Farmacéutica (CQF, La Habana, Cuba) permitieron corroborar que un extracto de la corteza de la planta *Mangifera indica L.* (Anacardiaceae) era utilizado con éxito en el tratamiento de desórdenes inflamatorios, neoplásicos y otros (Guevara *et al.*, 1998). La caracterización química del extracto permitió conocer la presencia de compuestos del tipo flavonoides, terpenos, taninos, metales como Se, Cu entre otros. El CQF cuenta en estos momentos con la tecnología para la extracción y producción de un extracto, químicamente caracterizado y comercializado bajo el nombre de **Vimang[®]** en diferentes formulaciones (crema, tabletas y suspensión) (CQF, 1998). Las tabletas **Vimang[®]** se encuentran registradas bajo la categoría de suplemento nutricional por el Instituto Nacional de Higiene de los Alimentos (Anexo 1).

Los estudios farmacológicos preliminares permitieron conocer que posee propiedades antiinflamatorias. La caracterización antioxidante en diferentes modelos experimentales *in vitro e in vivo* demostró que el **Vimang[®]** poseía potentes acciones antioxidantes capturando ERO y protegiendo las principales biomoléculas del daño oxidativo a muy bajas concentraciones. En la fase preclínica, los ensayos con **Vimang[®]** demostraron que el mismo era más potente como antioxidante que dosis similares de β -carotenos, Vit.C, Vit. E o combinaciones de Vit. C y Vit. E (Sánchez *et al.*, 2000a; Sánchez *et al.*, 2000b; Sánchez *et al.*, 2001a; Sánchez *et al.*, 2001b). Los estudios toxicológicos demostraron su inocuidad

y durante su aplicación en la medicina tradicional no se observaron efectos adversos (Guevara *et al.*, 1998).

CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

La estrategia experimental desarrollada en el presente estudio respondió a la necesidad de caracterizar, en primer lugar, el estado redox celular de un grupo de PVVIH residentes del Sanatorio Santiago de Las Vegas (SSV) a través de la determinación, y la realización de un análisis integrador, de marcadores bioquímicos de daño oxidativo celular e indicadores de protección antioxidante (enzimáticos y no enzimáticos). Este estudio se realizó también en una población de individuos aparentemente sanos, a fin de establecer las comparaciones correspondientes. Simultáneamente se evaluaron marcadores de progresión de la infección y otros, para ambas poblaciones, incluyendo índices nutricionales en la población VIH+. Los resultados en esta primera fase condicionaron el desarrollo y diseño de un ensayo de intervención nutricional como segundo momento de la investigación, dirigido a estudiar como la dieta rica en antioxidante en estos individuos modificaba el daño oxidativo. Los resultados de esta segunda fase permitieron la realización de la tercera etapa de este estudio que consistió en el diseño y desarrollo de un ensayo clínico de suplementación con Vimang[®] con el fin de evaluar el efecto antioxidante de este suplemento y la respuesta de la población VIH+. La evaluación de los efectos de la intervención nutricional y la suplementación con Vimang[®] se realizó a través de la determinación en general de los mismos indicadores.

II.1 MATERIALES Y PARAMETROS A EVALUAR

Los reactivos empleados fueron obtenidos de los laboratorios SIGMA (St Louis MO, USA) y ROCHE (Ontario, Canada). Las tabletas de placebo y **Vimang**[®] fueron producidas por la Empresa Laboratorio Farmacéutico “Reinaldo Gutiérrez” (Anexo 2).

Para el diagnóstico se empleó sangre total, suero y orina según el análisis a realizar. Se realizó una toma de muestra de sangre y una de orina (500 mL), en ayuno, y se obtuvo suero (9 mL) al inicio y al final del estudio. En la muestra de sangre total se determinaron las subpoblaciones linfoides CD3, CD8⁺/CD38⁺, CD4, CD95/Fas y Hemoglobina (Hb), leucograma con diferencial y conteo de plaquetas (Plq). En el suero se determinó MDA, estado antioxidante total (TAS), potencial de peroxidación (PP), GSH, organoperóxidos totales (OT), alanina amino transferasa (ALT), creatinina (Creat.), Alb y AU, además se determinó en eritrocitos la actividad SOD y GPx y en linfocitos la Fragmentación del ADN (% F ADN). Las determinaciones en sangre y orina se realizaron una hora después de obtenidas las muestras. El suero fue congelado a -70° C hasta recopilar las muestras de una semana y luego fueron procesadas en conjunto.

II.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se estudiaron 85 PVVIH residentes del SSV en un intervalo de 20 a 47 años de edad de los cuales 49 (58%) eran hombres y 36 (42%) mujeres. Estos individuos fueron diagnosticados como seropositivos a través de un ELISA (UNI FORM VIH I/II plus O, Organon Technica), el cual fue confirmado por Western Blot (DAVIH BLOT VIH-I,

DAVIH Lab). Los mismos fueron clasificados según el sistema del Centro para Control de Enfermedades (Anexo 3, CDC Atlanta 1993) basado en el conteo absoluto de linfocitos T CD4⁺ y en el manejo clínico de los individuos infectados. El 50% de los individuos manifestó una conducta heterosexual y el 50% homosexual. De estos individuos 76 no recibían tratamiento antirretroviral y 9 recibían una terapia combinada (Triterapia) sin inhibidores de proteasa. Los pacientes que finalmente fueron incluidos en el estudio, no tenían enfermedades oportunistas activas.

De igual forma los sujetos seleccionados no fumaban, no llevaban tratamiento antioxidante o vitamínico, no padecían hiperlipidemia, ni diabetes, ni disfunciones hepáticas o renales, no padecían de diarreas intratables (consideradas como al menos 6 pérdidas líquidas diarias durante un mes), no padecían de vómitos o evidencias de sangramiento gástrico y no tenían antecedentes de enfermedades coronarias. Se estudiaron además 40 individuos aparentemente sanos, investigadores del IFAL y el IPK, comprendidos en un intervalo de 25 a 48 años de edad, de los cuales 22 (55%) eran hombres y 18 (45%) mujeres.

II.3 DISEÑOS EXPERIMENTALES

II.3.1 Consideraciones éticas generales en relación con los ensayos

Todos los procedimientos fueron realizados según lo aprobado por los Comités Internacionales para ensayos en humanos (Declaraciones de Helsinki, Asamblea Médica Mundial, 2000), los de ética de manejo del paciente VIH-SIDA, y de acuerdo con las regulaciones nacionales establecidas.

Las investigaciones realizadas se justificaron desde el punto de vista ético, teniendo en cuenta los elementos siguientes

- Las PVVIH evaluadas a escala internacional, en diferentes grupos de riesgo, han manifestado alteraciones del metabolismo oxidativo.
- La intervención dietética del tipo antioxidante ha sido sugerida internacionalmente con un efecto beneficioso basada en los reportes anteriores.
- Los alimentos naturales, en su mayoría, no producen efectos tóxicos sino más bien influyen positivamente en el funcionamiento normal de los eventos fisiológicos de los organismos.
- Las PVVIH del grupo suplementado con **Vimang**[®] recibieron un nutracéutico del cual existían evidencias etnomédicas de su efecto beneficioso para este tipo de infección.
- El personal vinculado al estudio conocía y manejaba bien los resultados terapéuticos beneficiosos y los posibles efectos adversos del mismo. Estaba previsto que de aparecer eventos adversos, se evaluaría el caso y se tomarían las conductas terapéuticas necesarias por personal entrenado.
- El protocolo fue sometido a la consideración de los Comités de Ética Médica de ambas instituciones (IPK y SSV), así como, por el Consejo Científico Especializado de Atención Médica del IPK y por el CITMA. Ambos evaluaron el protocolo de Ensayo Clínico desde el punto de vista ético, científico y metodológico, emitiendo por escrito la aprobación y las sugerencias (Anexos 4, 5 y 6).
- Todos los individuos involucrados firmaron un consentimiento informado según modelo realizado al efecto (Anexo 7). Expresando su acuerdo de participación en el estudio después de conocer de manera escrita y verbal los posibles riesgos y los métodos a seguir.

- El ensayo comenzó una vez dada la aprobación por parte de los niveles referidos según las regulaciones vigentes. Las PVVIH podían abandonar el estudio cuando lo desearan. Al divulgar los resultados del ensayo se garantizó no revelar los datos personales de las PVVIH.

II.3.2 Caracterización de la población VIH en relación con una población aparentemente sana

El diagnóstico del estado redox (TAS, PP, MDA, GSH, OT, SOD, GPx, % F ADN), los marcadores de progresión de la enfermedad (CD3, CD8⁺/CD38⁺, CD4, CD95/Fas), los índices nutricionales de ingesta, y los índices bioquímicos clínicos (Hb, leucograma con diferencial, Plq, ALAT, Creat, Alb, AU) fueron evaluados en 85 PVVIH y 40 individuos aparentemente sanos.

II.3.3 Estudio de la influencia del incremento en la oferta de micronutrientes dietarios.

De acuerdo a la estación (Octubre-Diciembre) y la biodisponibilidad de frutas y vegetales ricos en compuestos antioxidantes, se realizó un conversatorio con las PVVIH estimulándolas a incrementar el consumo de frutas y vegetales en la dieta. Durante 3 meses y con el apoyo institucional, la oferta de los mismos fue incrementada y evaluada a través de encuestas realizadas en el transcurso de 7 días, al inicio y, a los 3 meses del estudio en 40 PVVIH (Anexos 8 y 9). Estas personas fueron seleccionadas de un total de 85 del estudio de caracterización. Muestras de suero, sangre y orina fueron procesadas para evaluar la influencia de la dieta en los marcadores del estado redox, marcadores de progresión de la infección e índices clínicos al inicio y a los tres meses del experimento (los mismos indicadores que se midieron en II.3.2).

II.3.4 Estudio de la influencia de la suplementación con **Vimang**[®]

Tipo de ensayo: Se elaboró un protocolo de ensayo clínico controlado de fase II monocéntrico, a doble ciego, con grupo placebo y aleatorizado.

Método de asignación aleatoria: Los 82 individuos fueron aleatorizados para formar dos grupos. Grupo A: Placebo y Grupo: B **Vimang**[®]

Esta asignación se realizó al azar mediante una tabla de números aleatorios según el orden de entrada de los datos. Se utilizó el programa Med Stat. El código de identificación estuvo en poder de la monitora del ensayo, investigadora del CQF y no fue manejado por los investigadores.

II.3.4.1 Selección de sujetos

Universo de estudio y criterio diagnóstico: La muestra quedó constituida por PVVIH, masculinos o femeninos, entre 20-47 años de edad, de cualquier raza que fueron diagnosticados con 2 *western blot* positivos (al menos dos proteínas de envoltura del VIH) y que se encuentran acogidos al sistema sanatorial de Ciudad de La Habana (SSV). Estos pacientes fueron seleccionados de 85 caracterizados en el primer estudio y donde se incluían los 40 pacientes del segundo estudio.

Criterios de inclusión:

- Paciente seropositivo al VIH (A2, A3, B2, B3)
- 20-50 años de edad, incluyendo ambas
- Ambos sexos
- Conteo CD4+ absoluto menor de quinientas células por milímetro cúbico
- No-pérdida del 10% o más del peso corporal en los últimos 3 meses

Criterios de exclusión:

- Embarazo y lactancia
- Enfermedades crónicas asociadas al estrés oxidativo no relacionadas con el VIH
- Enfermedades oportunistas relacionadas con el VIH en estado agudo
- Consumo regular de bebidas alcohólicas
- No cumplir los criterios de inclusión
- Participar en otro ensayo con antioxidantes

Criterios de salida después de la inclusión:

- Incumplimiento del tratamiento (7 días)
- Fallecimiento durante el estudio (por causas no asociadas al consumo de **Vimang®**)
- Pacientes en los que se manifiesten eventos adversos moderados, severos o muy severos mantenidos durante 24 horas
- Aparición de cualquiera de los criterios de exclusión
- Deseo expreso del paciente en salir del estudio
- Apertura del código por cualquier causa

II.3.4.2 Vías de administración, dosis, frecuencia y duración del tratamiento

El tratamiento se administró por vía oral. La dosis y frecuencia de administración del producto se seleccionó considerando los resultados positivos de los estudios etno médicos en este tipo de pacientes (Guevara *et al.*, 1998).

Grupo A: 8 tabletas diarias de placebo durante 6 meses, 3 antes de desayuno y almuerzo y 2 antes de la comida

Grupo B: 8 tabletas diarias de **Vimang**[®] (300 mg) durante 6 meses, 3 antes de desayuno y almuerzo y 2 antes de la comida, lo que representa aproximadamente 20 mg·kg⁻¹ de peso del principio activo (**Vimang**[®]).

Tratamiento concomitante:

Durante el ensayo se controló y registró el uso de otros suplementos y fármacos (tipo, dosis y período de administración) relacionados con la infección debido a que el paciente VIH/SIDA no se puede mantener sin tratamiento sintomático. Sólo se eliminó por criterio médico, aquellos medicamentos que no afectaban la calidad de vida del paciente. Los efectos tóxicos o colaterales fueron recogidos por el facultativo en el modelo de Karch y Lasagna (Laporte y Tognoni, 1993) que se encuentra anexo al protocolo de ensayo clínico.

II.3.4.3 Evaluación de la eficacia

La eficacia se evaluó mediante la determinación de indicadores del estado redox celular, subpoblaciones linfocitarias e índices bioquímicos clínicos.

Las variables principales:

TAS, PP

Las variables secundarias:

- En sangre total: CD3, CD8⁺/CD38⁺, CD4, CD95/Fas
- En suero: MDA, GSH
- En eritrocitos: SOD, GPx
- En leucocitos: Fragmentación del ADN
- Sintomatología clínica: Datos referidos por el paciente incluidos en las situaciones clínicas diagnósticas de SIDA aceptadas por la OMS desde 1993.

Las variables relacionadas con la seguridad del tratamiento:

- Sangre: Hb, leucograma con diferencial, conteo de plaquetas
- Suero: ALAT, Creat, AU

Las variables de control:

- Edad, peso, sexo, raza, antecedentes patológicos, tratamientos anteriores, tratamientos concomitantes.

Criterios de evaluación de la respuesta:

La mejoría (cambio favorable estadísticamente significativo ($p < 0,05$) de las variables principales, conjuntamente con la disminución estadísticamente significativa ($p < 0,05$) de variables indicadoras de daño oxidativo) y la estabilización de los indicadores de progresión de la enfermedad de las PVVIH tratadas con **Vimang**[®] con respecto al grupo control (placebo) y al valor inicial en un período de 6 meses de suplementación, fue el criterio esencial para la evaluación de la efectividad del tratamiento.

Criterios de fracaso terapéutico:

Se consideró fracaso cuando el 30% de los pacientes evaluados:

1. En relación a TAS y PP:

Estuvieron dentro de la categoría de no mejorado (TAS y PP igual) o empeorado (TAS inferior, PP mayor), respecto al grupo que utilizó placebo y a su valor inicial.

2. Con respecto a los marcadores de progresión de la infección se consideró:

Descenso de los niveles absolutos de linfocitos TCD4+ a un ritmo superior a los de la evolución normal de la enfermedad y aumento de la expresión del marcador CD95 y de la subpoblación CD8/CD38+, respecto al grupo que utilizó placebo y a su valor inicial.

3. Con respecto a los indicadores clínicos:

Pérdida del 10% de peso corporal, presencia de astenia, síndrome febril de 21 días y aparición de enfermedades oportunistas relacionadas con la infección VIH.

Criterios de éxito terapéutico:

Se consideró éxito cuando el 70% de los pacientes involucrados en el estudio estuvieron en la categoría de mejorado (TAS superior, PP inferior y disminución de los valores de las variables MDA, OT y % F ADN). Con respecto a los indicadores de progresión clínica y de laboratorio, se consideró éxito cuando el valor de los mismos se encontró en la categoría de estabilizado (igual), respecto al valor inicial y al grupo placebo, además de no presentar alteraciones en los indicadores bioquímicos clínicos en un período de 6 meses de suplementación.

II.4 DETERMINACIONES BIOQUIMICAS

Las determinaciones bioquímicas, utilizadas como indicadores del balance redox celular y de seguridad toxicológica, se llevaron a cabo mediante la siguiente metodología.

II.4.1 Determinación del Estado Antioxidante Total

Se empleó un estuche diagnóstico de RANDOX (Diamond Road, Crumlin UK) Cat NX 2332. El diagnóstico se basó en la incubación de ABTS con metmioglobina y peróxido de hidrógeno que genera el radical catión $ABTS^{\cdot+}$, el cual tiene una coloración azul-verdoso relativamente estable y que puede ser medido a 600 nm. Los antioxidantes en la mezcla añadida producen una supresión del color proporcional a su concentración (Romay *et al.*, 1996).

II.4.2 Determinación de Malonildialdehído

Se empleó el juego de reactivos para diagnóstico LPO-586 de Calbiochem (La Jolla, CA USA). En el ensayo se midió la producción de un cromóforo, después de 40 min de

incubación a 45° C, a 586 nm en un espectrofotómetro Pharmacia. Soluciones recién preparadas de MDA (bis [dimetil acetal] (Sigma, St Louis, MO, USA) fueron preparadas bajo las mismas condiciones y empleadas como sustancias de referencia (10 µM). Los resultados se expresaron como µM (Esterbauer y Cheesman, 1990; Erdelmeier *et al.*, 1998).

II.4.3 Determinación del Potencial de Peroxidación

Para la determinación de la susceptibilidad a la peroxidación lipídica muestras de suero fueron incubadas con una solución de sulfato de cobre II (concentración final 2 mM) a 37° C por 24 h. El PP fue calculado sustrayendo la concentración de MDA al tiempo 0 del medido a las 24 h de incubación (Ozdemirler *et al.*, 1995). Las determinaciones de MDA se realizaron según el método descrito anteriormente.

II.4.4 Determinación de Organoperóxidos Totales

Se empleó el estuche diagnóstico de Bioxytech H₂O₂-560 cat. 21024 (Oxis International Inc. Portland USA). El ensayo se basó en la oxidación del ferroso a férrico por los peróxidos orgánicos y el H₂O₂ en condiciones ácidas. El férrico se une con el indicador xilenol naranja (3,3'-bis (N,N-di(carboximetil)-aminometil)-*o*-cresolsulfonateína, sal sódica) y forma un complejo coloreado que puede ser medido espectrofotométricamente a 560 nm. Se utilizó como solución de referencia H₂O₂ 100 µM.

II.4.5 Determinación del Porcentaje de Fragmentación del ADN

La fragmentación del ADN fue cuantificada según el ensayo colorimétrico con difenilamina descrito por Burton (1968). Los leucocitos fueron obtenidos de muestras de sangre total por lisis osmótica de los eritrocitos y luego lisados con solución amortiguadora

(0,2% v/v Tritón X-100, 10mM Tris-HCl y 1 mM EDTA pH 8,00). El lisado fue centrifugado a 1 300 g durante 10 min. El sobrenadante que contenía pequeños fragmentos de ADN fue removido del sedimento que contenía el ADN intacto. El sedimento fue resuspendido en solución amortiguadora de lisis. El ácido perclórico fue añadido a una concentración final de 0,5M a ambos con 2 volúmenes de solución de difenilamina (0,088 M difenilamina, ácido acético glacial 98%, 1,5% v/v ácido sulfúrico y 0,5% v/v de una solución de acetaldehído a 1,6%). Las muestras fueron refrigeradas a 4°C durante 48 h y luego se registró su absorbancia a 575 nm. La fragmentación del ADN se expresó como el porcentaje del ADN total que se cuantificó en la fracción sobrenadante (Ray *et al.*, 1992; Gibb *et al.*, 1997).

II.4.6 Determinación del Glutati6n reducido o grupos sulfidrilo no proteicos.

El GSH reducido se evalu6 seg6n el m6todo descrito por Sedlak y Lindsay (1968). La muestra se precipit6 con 6cido tricloroac6tico 10% p/v m6s EDTA 10⁻³ M y el sobrenadante se hizo reaccionar con el reactivo de Ellman (6cido 5,5' ditio-bis (2-nitrobenzoico) 10⁻² M. Se utilizaron patrones de GSH (Sigma, St Louis, USA) de concentraciones conocidas (300-1300 mg·L⁻¹). Los resultados se expresaron como mg·L⁻¹ de GSH.

II.4.7 Actividad de la Super6xido Dismutasa

Se emple6 un juego de reactivos para diagn6stico de RANDOX (Diamond Road, Crumlin UK) cat. No. SD125. El ensayo se bas6 en la generaci6n de radical super6xido empleando la xantina y la xantina oxidasa. El radical reacciona con 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolium cloruro (INT) para formar un formazano rojo. La actividad SOD se midi6 por el grado de inhibici6n de esta reacci6n (Randox, Radicales Libres 1996).

II.4.8 Actividad de Glutación peroxidasa

Se empleó un juego de reactivos para diagnóstico de RANDOX (Diamond Road, Crumlin UK) cat. No. RS505. El ensayo se basó en la oxidación del GSH por la GPx con hidroperóxido de cumeno. En presencia de glutación reductasa y NADPH el GSH oxidado es inmediatamente convertido a su forma reducida con la oxidación concomitante del NADPH a NADP⁺. La disminución de la absorbancia se midió a 340 nm (Randox, Radicales Libres 1996)..

II.4.9 Determinación de la función hematológica

Se determinó Hb, Hematocrito (Hto), leucograma con diferencial y Plq en sangre total en el Contador hematológico de la Firma ABX (Francia). Este equipo emplea para su funcionamiento ABX minidy1 Ref. 08002010 (Roche), como solución tamponada isotónica para la determinación de elementos figurados de la sangre y ABX minilyse LMG Ref. 0702010, como solución de lisis eritrocitaria para el conteo y diferenciación de células blancas sanguíneas, así como para la determinación de Hb. Según la firma los valores de referencia para cada uno de ellos son los siguientes: Hb ($110-150 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), Hto (37-50 %), y los siguientes considerando los mismos como límites superiores Plq ($280 \cdot 10^9 \text{ L}^{-1}$), Conteo de diferencial: Segmentados (65%), linfocitos (25%), monocitos (6%) y eosinófilos (4%).

La eritrosedimentación se determinó mezclando proporciones adecuadas del anticoagulante citrato de sodio al 3,8 % (1,8 M) y sangre, montando la muestra en una pipeta de Westergreen, los resultados se expresaron en mm considerando como valores de referencia normal hasta 20 en la mujer y hasta 10 en el hombre.

II.4.10 Determinación de las funciones hepática y renal

Para evaluar la función hepática se determinó en suero la ALT, las proteínas totales (PT), Alb e índice albúmina/globulina y para evaluar la función renal se determinó en suero Creat y AU, todos ellos utilizando juegos de reactivos de la Roche y el equipo HITACHI 704.

Determinación de la Alanina Amino Transferasa:

La ALT se determinó según método enzimático basado en la adición de α -ceto-glutarato que produce por reacción con la enzima el piruvato, que reacciona con NADH en presencia de la enzima lactato deshidrogenasa y produce NAD⁺. La velocidad de disminución de NADH se midiófotométricamente y fue directamente proporcional a la actividad de ALT. Se empleó el juego de reactivos para diagnóstico de la Roche Ref. 816442 según el cual los valores de referencia para una población normal son de 0 a 40 U·L⁻¹.

Determinación proteínas totales:

Las PT se determinaron por el método de formación del complejo con Cu²⁺ que es de color purpúreo (Biuret), midiendo fotométricamente la intensidad cromática que es proporcional a la concentración de proteínas. Se empleó el juego de reactivos para diagnóstico de la Roche Ref. 1553836 según el cual los valores de referencia para una población normal son de 6,6- 8,7 g·dL⁻¹.

Determinación de albúmina (Alb):

La Alb se determinó por el método de formación de un complejo con el reactivo verde de bromocresol a pH 4,2 midiendo fotométricamente la intensidad cromática que es proporcional a la concentración de Alb. Se empleó el juego de reactivos para diagnóstico de

la Roche Ref. 816272 según el cual los valores de referencia para una población normal son de 3,5 a 5 g·dL⁻¹.

Determinación de creatinina:

La Creat se determinó por un método cinético de formación de un complejo con el reactivo picrato en solución salina. Este complejo de color amarillo naranja es medido fotométricamente, la intensidad cromática es proporcional a la concentración de Creat. Se empleó el juego de reactivos para diagnóstico de la Roche Ref. 1489291 según el cual los valores de referencia para una población normal son de 44 a 106 $\mu\text{M}\cdot\text{L}^{-1}$.

Determinación de ácido úrico:

El AU se determinó por un método enzimático, variante del método de color modificado por Siedel (Greiling y Gressner, 1995). El AU presente en la muestra con la uricasa produce H₂O₂, que al reaccionar con 4- aminopirazona y el N etil- N-(2 hidroxí -3 sulfopropil)-3- metilanilina, forma un colorante quinoadiimino que es medido fotométricamente. La intensidad cromática es proporcional a la concentración de AU. Se empleó el juego de reactivos para diagnóstico de la Roche Ref. 16611850 según el cual los valores de referencia para una población normal son de 142 a 416 μM .

II.5 EVALUACIÓN DE INDICES NUTRICIONALES

Se aplicaron dos encuestas alimentarias, una siguiendo el método de registro de alimentos y otra de frecuencia de consumo de alimentos (Anexos 8 y 9) durante 7 días consecutivos, en un mes. Las porciones estándar fueron introducidas en el programa CERES (1997) que cuenta con una base de datos con el contenido nutricional de los alimentos y bebidas comúnmente consumidas en Cuba. Mediante este programa se

determinó la ingesta nutricional de cada nutriente y se evaluó la adecuación de la dieta para cada nutriente de acuerdo a los requerimientos nutricionales de los individuos.

Evaluación antropométrica: se realizaron medidas de peso y talla, tomando en cuenta otros datos básicos como la edad y el sexo para realizar el cálculo del índice de masa corporal.

$$\text{IMC} = P \text{ (kg)} / T^2 \text{ (m}^2\text{)}$$

Donde IMC: Índice de masa corporal

P: Peso en kg

T²: Talla en metros elevada al cuadrado

II.6 CONTEO DE SUBPOBLACIONES LINFOIDES

Las subpoblaciones linfoides fueron evaluadas en sangre total con una solución lisante Becton Dickinson (BD). Para cada subpoblación se empleó un ensayo de triple marcaje (Tri Test CD3 CD45 CD4; CD8 CD45 CD38 y CD3 CD4 CD95) todos de la firma BD. El análisis se realizó en un citómetro de flujo FACScan (BD immunocytometry System) empleando el programa MULTISSET (Giorgi, 1993).

II.7 ESTADÍSTICA

Tamaño muestral:

El tamaño muestral fue determinado por la variabilidad poblacional de la variable principal que es TAS, la potencia con que se esperó encontrar diferencia entre los grupos fue de 0,2, con un error de tipo I de 0,05, la n bajo estas condiciones fue de 30 pacientes por grupo. Considerando las características de este tipo de individuo y un 15 % de pérdidas, el número total de individuos para cada grupo fue 40.

Procesamiento estadístico de las variables:

El análisis estadístico se inició con la prueba preliminar OUTLIERS para detectar valores aberrantes. Se determinaron los parámetros estadísticos descriptivos para cada variable (valor máximo, mínimo, media, error estándar de la media y desviación estándar (DE). Para cada una de las variables se expresó su valor como la media \pm DE. Después fue usado el ensayo de normalidad descrito por Shapiro Wilks seguido por la prueba de homogeneidad de varianza (Levene).

Para el caso de los índices nutricionales de ingesta los valores fueron normalizados por logaritmo cuando fue necesario. Se realizó un análisis de varianza y comparación de medias de la evaluación de los índices nutricionales al inicio y al final de cada ensayo empleando el Software estadístico CERES (versión 5.1, 1997). Fue considerada diferencia significativa cuando $p < 0,05$.

Para el caso de los indicadores bioquímicos, el grupo PVVIH fue comparado con el grupo VIH-, y de acuerdo al experimento los valores de cada indicador del grupo PVVIH fueron comparados con la evaluación de los mismos al final de cada ensayo empleando la prueba t no pareada para variables no paramétricas (Kruskall Wallis) y el paquete software SPSS (versión 10.0), considerando diferencia significativa cuando $p < 0,05$. Además siguiendo este mismo análisis se comparó el cambio en cada marcador al inicio y al final de cada experimento en el grupo de PVVIH.

Para evaluar la posible relación en la variación de los indicadores inmunológicos y del estado redox se empleó el coeficiente de correlación de Pearson.

Para evaluar el efecto de cada experimento se calculó, primeramente, la diferencia entre los valores iniciales y finales de cada uno de los marcadores bioquímicos evaluados. Con estas diferencias se conformaron dos variables de estudio, variables compuestas que,

evalúan la variación conjunta de varios de los indicadores. El análisis estadístico de la respuesta al ensayo se realizó considerando los individuos que terminaron el estudio.

En el caso de la intervención nutricional:

La variable 1 evalúa respuesta antioxidante total y la 2 respuesta antioxidante en conjunto.

1. Variación conjunta de TAS, vitamina A, vitamina E, vitamina C, frutas y vegetales
2. Variación conjunta de TAS, GPx, GSH, vitamina A, vitamina E, vitamina C, frutas y vegetales.

En el caso de la suplementación con **Vimang®**:

La variable 1 evalúa respuesta antioxidante y la 2 respuesta antioxidante y daño.

1. Variación conjunta del TAS y PP
2. Variación conjunta de TAS, PP, MDA, OT y % F ADN

En el análisis de las diferencias entre variables se consideró *éxito* a la mejoría conjunta de las mismas en el paciente y *fracaso* si al menos una de las variables consideradas no mejoraba. Se realizaron tablas de contingencia donde se mostró la frecuencia de respuesta (*éxito* y *fracaso*) por grupos de tratamientos y finalmente se compararon los grupos mediante la prueba de chi cuadrado de independencia. Se calculó además el intervalo de confianza para la diferencia de proporciones con un nivel de confiabilidad de un 95%.

En el caso de la evaluación del efecto para los indicadores inmunológicos cuando el análisis de varianza resultó no significativo ($p > 0,05$) se realizó una distribución de los valores individuales iniciales y finales para el experimento. Mediante el software STATISTICA,

1996 para WINDOWS se realizó un análisis de variación, resultando en una tendencia significativa de la población cuando $p < 0,05$ (Allard *et al.*, 1998b).

CAPÍTULO III RESULTADOS

III.1 CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN PVVIH

La caracterización inmunológica, redox y nutricional de los pacientes VIH/SIDA fueron el punto de partida de la presente investigación. El conocimiento de estos indicadores en la población estudiada aportaría los datos necesarios no solo para su comparación con una población aparentemente sana (VIH-), sino también, para conocer si se modificaban al tratar los individuos con regímenes dietéticos especiales o con suplementos dietéticos.

III.1.1 Características generales e inmunológicas

La población VIH caracterizada de manera general y subdividida según la clasificación A2B2, y A3B3 fue comparada con la población supuestamente sana (Tabla III.1). No se detectó diferencia significativa en cuanto a la edad en los grupos VIH- y VIH+. Las proporciones en cuanto a sujetos de cada sexo entre individuos VIH+ y VIH- fueron similares, correspondiendo el sexo femenino a un 42-45% y el masculino a un 57-55% respectivamente. Existió diferencia significativa ($p < 0,05$) en cuanto al conteo de linfocitos T CD4+, T CD8+, CD38 y CD95 entre el grupo VIH- y los tres grupos de VIH (VIH+, A2B2 y A3B3). Los grupos VIH tienen un conteo relativo menor de CD4+ (Tabla III.1) y mayor de CD8⁺/CD38⁺ y CD95 con respecto al grupo control (Figura III.1). En cuanto a las subpoblaciones linfoides la cuantificación entre los grupos estratificados A2B2 y A3B3

resultó significativamente diferente ($p < 0,05$) existiendo una relación inversa entre CD4 vs. CD8⁺/CD38⁺ y CD95. Los valores de los marcadores bioquímicos indicativos de la función renal, hepática y hematológica se encontraron en su mayoría dentro del intervalo de referencia normal, con las excepciones de los valores de eritrosedimentación y el % de monocitos, que aunque evidencian una alteración fisiológica, resulta una característica de los individuos infectados como consecuencia del proceso inflamatorio crónico (Tabla III.2).

III.1.2 Características del balance redox.

En cuanto a los marcadores de estrés oxidativo, el GSH reducido fue significativamente menor ($p < 0,05$) en los individuos VIH+ que en el grupo VIH-, sin que existieran diferencias significativas entre los grupos VIH+ estratificados (Figura III.2). La concentración de MDA fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en los individuos VIH+ que en el grupo control, existiendo diferencias significativas entre los grupos VIH+ estratificados (Figura III.2). El %F ADN y los niveles plasmáticos de OT fueron significativamente mayor ($p < 0,05$) en los individuos VIH+ con respecto al grupo control sin que existieran diferencias significativas entre los grupos estratificados A2B2 y A3B3 (Figura III.3).

La actividad enzimática de la SOD fue significativamente mayor ($p < 0,05$) mientras la actividad de la GPx fue significativamente menor ($p < 0,05$) en los individuos VIH+ comparados con el grupo VIH-. No existieron diferencias significativas entre los grupos estratificados A2B2 y A3B3 (Figura III.4). El PP incrementó significativamente ($p < 0,05$) mientras que el TAS disminuyó con carácter significativo ($p < 0,05$) en los individuos VIH+ comparados con el grupo VIH-. Existieron diferencias significativas entre los grupos estratificados resultando el grupo A3B3 el de menor capacidad antioxidante y que en correspondencia exhibió el mayor valor de PP y el menor valor de TAS (Figura III.5). Se

realizó un análisis de correlación (Pearson) entre las variables del estado redox y los marcadores inmunológicos resultando en una correlación significativa ($p < 0,05$) para las variables CD4, CD8 y CD95 con MDA, SOD, PP y TAS (Tabla III.3).

III.1.3 Caracterización nutricional

La evaluación de la ingesta de macro y micronutrientes y las características antropométricas de la población VIH+, evaluados según el programa CERES, revelaron índices que, de acuerdo a los requerimientos específicos de cada estrato A2B2 y A3B3 no evidenciaron diferencias significativas, pero los niveles de adecuación difieren para cada uno (Tabla III.4). En el caso de la población A3B3 los requerimientos energéticos están adecuados a un 75% y en la población A2B2 a un 90%. Los porcentajes de adecuación para proteínas y carbohidratos toman valores similares a los anteriores. En el caso de los lípidos el porcentaje de adecuación estuvo por encima de los requerimientos en ambos grupos. Los porcentajes de adecuación de los micronutrientes resultaron variados pero deficitarios con una media de un 52% para A2B2 y un 55% para A3B3.

III.2 ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL INCREMENTO EN LA OFERTA DE MICRONUTRIENTES DIETARIOS

Una vez caracterizada la población VIH+ se procedió a estudiar los efectos que, sobre estos indicadores producía el incremento de micronutrientes dietarios, teniendo en cuenta que muchos de ellos se encontraron por debajo de los niveles recomendados para estos individuos y que gran parte de estos pueden incidir potencialmente en el mejoramiento del estado redox e inmunológico de los PVVIH. Tras un período de 3 meses de intervención nutricional se evaluó el comportamiento de las variables inmunológicas, redox y nutricionales.

III.2.1 Características inmunológicas y clínicas

El análisis de las subpoblaciones linfoides no mostró diferencias significativas ($p > 0,05$) durante el período de estudio, aunque se evidenció una tendencia a la disminución en la subpoblación CD8/CD38 a los 3 meses (Figura III.6). No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en cuanto a los índices bioquímicos de función hepática, renal y hemoquímica comparando los valores al tiempo 0 y a los 3 meses (Tabla III.5)

III.2.2 Características del balance Redox

De acuerdo al análisis de los marcadores del balance redox, el grupo VIH+ mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) en cuanto a algunos índices evaluados, en comparación con el grupo control al tiempo cero y a los 3 meses. El TAS se incrementó significativamente a los 3 meses de estudio ($p < 0,05$) con respecto al tiempo 0. La peroxidación lipídica evaluada como MDA y OT no mostró diferencias significativas a los 3 meses. El GSH fue significativamente mayor a los 3 meses ($p < 0,05$) así como se evidenció diferencias significativas en la actividad enzimática de SOD y GPx a los 3 meses ($p < 0,05$) con respecto al tiempo 0. El % F ADN no mostró diferencias significativas durante el período de estudio (Tabla III.6). En el análisis global de la respuesta el 68% de los pacientes mejoraron el valor de TAS en correspondencia con los cambios positivos en los índices de ingesta de micronutrientes (Tabla III.7) y el 56% experimentó una mejoría conjunta de los valores de TAS, GPx y GSH en correspondencia con los cambios analizados anteriormente (Tabla III.7).

III. 2.3 Características nutricionales

Durante la evaluación de los índices dietarios no se encontraron diferencias significativas al inicio y a los 3 meses, en ingesta de macronutrientes (grasa, proteína, carbohidratos) y energía. Se detectó diferencias significativas a diferentes niveles de significación en el incremento de la ingesta de micronutrientes (vitaminas A, E, C y frutas y vegetales) al inicio y a los 3 meses de estudio (Tabla III.8). Los niveles de ingesta se mantuvieron menores a los índices requeridos por estos pacientes y la adecuación media para todos los micronutrientes fue de un 56% (Figura III.7).

Estos resultados se corresponden con un período estacional de mayor disponibilidad de frutas y vegetales ricos en sustancias antioxidantes como polifenoles, terpenos y vitaminas, lo que se corresponde con un incremento significativo en la frecuencia del empleo de los mismos en la alimentación (Figura III.8). No se observaron diferencias significativas en el índice de masa corporal después de someter a las PVVIH a la dietoterapia.

Los resultados hasta aquí obtenidos demostraron que transcurridos tres meses de una ingesta dietaria con antioxidantes se mejoraba el estado redox celular de los pacientes VIH+ en estudio, a pesar de encontrarse esta ingesta a un 56% de los requerimientos establecidos. Estos hallazgos condicionaron la realización de un ensayo clínico, incorporando un suplemento nutricional natural denominado **Vimang[®]** que posee una actividad antioxidante de carácter multifuncional.

III.3 ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA SUPLEMENTACIÓN CON **Vimang[®]**

III.3.1 Características generales

Los pacientes fueron aleatorizados en dos grupos: 42 fueron suplementados con **Vimang[®]** y 40 con placebo. Al inicio (tiempo 0) se analizaron las características generales,

los índices dietarios y el número de pacientes con terapia antirretroviral de los dos grupos sin que se detectaran diferencias significativas (Tabla III.9). El cumplimiento de la toma de tabletas fue evaluado de excelente con un 93% para el placebo y un 96 % para el **Vimang**[®]. Culminaron el estudio 68 pacientes, de los 14 pacientes que lo abandonaron 8 pertenecían al grupo placebo y 6 al grupo **Vimang**[®]. El abandono fue voluntario, 2 de los pacientes manifestaron molestias epigástricas y acidez, estos tomaban placebo y los restantes 12 por actitudes que incidían en lo acordado en el consentimiento informado y constituían criterios de exclusión. Durante la suplementación, por un período de 6 meses, no se observaron reacciones adversas o colaterales.

III.3.2 Características inmunológicas y clínicas

El conteo relativo de las subpoblaciones linfoides no evidenció diferencias significativas ($p > 0,05$) observándose una estabilización en cuanto al conteo de CD4, CD95 o CD8/CD38 aunque se detectó una tendencia a la disminución del valor de CD95 en el grupo suplementado con respecto al placebo a los 6 meses (Figura III.9). En cuanto a los índices bioquímicos de función renal, hepática y hematológica no se detectaron diferencias significativas entre los grupos a los 6 meses (Tabla III.10), encontrándose la mayoría de ellos dentro de los intervalos de referencia considerados como normales.

III.3.3 Características del balance redox

Todos los indicadores del estado redox celular experimentaron modificaciones en el sentido de un restablecimiento del balance antioxidante – prooxidante, para los pacientes VIH+ suplementados con **Vimang**[®] con respecto al valor inicial y al grupo placebo. Se obtuvo un incremento en el TAS y una disminución del PP, ambas de carácter significativo

($p < 0,05$). Los niveles de MDA, OT, SOD, GPx, GSH y el % F ADN difirieron significativamente ($p < 0,05$ y $p < 0,01$) en el grupo suplementado con relación al placebo (Tabla III.11).

La evaluación global de la respuesta evidenció que el 48 % de los individuos en el grupo placebo y el 81% de los individuos en el grupo suplementado incrementaron la capacidad antioxidante medida como TAS y PP. Estos valores son significativamente diferentes para $p < 0,05$ entre los grupos (Tabla III.12). Cuando en el análisis se introduce la disminución del daño oxidativo medido como MDA, OT y % F ADN, el 2% del grupo placebo y el 43,9 % del grupo suplementado evidenciaron incremento de la capacidad antioxidante con disminución del daño oxidativo, con diferencia significativa entre los grupos (Tabla III.12).

III.3.4 Características nutricionales

Durante el estudio no se detectaron diferencias significativas entre los índices de ingesta nutricional para macro y micronutrientes evaluados al inicio ($t=0$) y al final ($t=6$ meses) para ambos grupos ni entre grupos. Tampoco se detectaron diferencias en cuanto al peso corporal (Tabla III.9). La evaluación de la frecuencia en la ingestión de frutas y vegetales no evidenció diferencias significativas durante el período de estudio (Figura III.10).

CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN

La inmunodeficiencia con una pérdida selectiva y progresiva de los linfocitos T CD4 + es la principal característica de los individuos VIH+ (Mellors *et al.*, 1997). Esta disminución se correlaciona con la progresión de la enfermedad desde estadios VIH asintomáticos hasta la fase SIDA. Los pacientes involucrados en el presente estudio dan muestra de ello y de acuerdo a las características demográficas reportadas no son representativos de la población VIH+ cubana. La selección de los mismos estuvo dirigida al control y homogenización de una serie de características que pudieran influir en el análisis de los experimentos programados. El intervalo del conteo absoluto de los linfocitos T CD4+ oscila entre 500 y 100 cel./mm³ que de acuerdo a la sintomatología clínica permite su estratificación en dos grupos A2B2 y A3B3. Existen varias teorías para explicar esta disminución, entre ellas la apoptosis es una de las más aceptadas (Groux *et al.*, 1991; Greenspan *et al.*, 1994; Gehri *et al.*, 1996; Sloand *et al.*, 1997; Jaworowski y Crowe, 1999). Entre las vías de apoptosis reconocidas en el curso de la infección se encuentra la mediada por la interacción del receptor Fas/APO-1/CD95 con su ligando Fas (Westendorp *et al.*, 1995), la cual reconoce entre los mecanismos moleculares de inducción el ambiente oxidante con activación del factor NF- κ B (Radrizzani *et al.*, 1997; Dörmeyer *et al.*, 1997; Romero-Avila y Roche, 1998). Los resultados de la evaluación de este marcador CD95 (Fig. III.1) concuerdan con los datos reportados en la literatura científica sobre el tema (Aries *et al.*, 1995; Bohler *et al.*, 1997). En la población de pacientes VIH+ estudiada se produce un incremento en el conteo de CD95, que se hace mayor con la progresión de la enfermedad, del estadio A2B2 al A3B3 y está inversamente correlacionado con la disminución de los linfocitos T CD4 + (McCloskey *et al.*, 1995; Bohler *et al.*, 1997).

Algunos estudios han puesto en evidencia que la determinación de células T CD4+ puede constituir un marcador poco sensible para el pronóstico de la enfermedad. Sin embargo, se ha comprobado que el incremento de CD8⁺/CD38⁺ correlaciona con varios indicadores de la severidad del estado de la enfermedad causada por el VIH, que incluyen su alteración en relación con la elevación de la carga viral (Ferbass *et al.* 1995; Bouscarat *et al.* 1996).

En el grupo de pacientes estudiados los valores de CD8⁺/CD38⁺ son altos en comparación con los sujetos VIH- y se incrementan con relación al estado evolutivo de los pacientes lo que confirma lo reportado en la literatura sobre el comportamiento de este indicador y la progresión de la infección (Froebel *et al.*, 2000).

La infección por VIH produce una inflamación crónica con generación sostenida de citocinas inflamatorias y como consecuencia y a la vez causa de ello una generación sostenida de ERO que conlleva a la disminución de la capacidad antioxidante (Delmas-Beauvieux *et al.*, 1996; Tzavara *et al.*, 1997; Allard *et al.*, 1998a). Entre las sustancias antioxidantes más afectadas se encuentra el GSH, los resultados de la determinación de este tripéptido no permiten distinguir diferencias entre estos valores y los observados en otros reportes y los estados de progresión de la infección (Buhl *et al.*, 1989; Herzenberg *et al.*, 1997; Opalenik *et al.*, 1998), pero sugieren que su disminución ocurre desde los momentos iniciales de la infección. El GSH, por otra parte, es cofactor de la enzima GPx. En los resultados podemos apreciar que el comportamiento de los valores de esta enzima coincide con el patrón de valores del GSH, resultando en un coeficiente de correlación de 0,89. Estos resultados permiten inferir la incidencia de ambos elementos en la alteración del estado redox en estos individuos. Debido a la función antioxidante de ambos, su disminución ha sido asociada al aumento de las concentraciones de peróxido de hidrógeno y a la formación

del radical hidroxilo (Aruoma, 1989; Rabaud *et al.*, 1997; Walmsley *et al.*, 1997). La oxidación de GSH contribuye además a potenciar el EO por generación concomitante de ERO independientemente de las condiciones del microambiente donde se produce la reacción, lo que se traduce en daño oxidativo a las diferentes biomoléculas (Herzenberg *et al.*, 1997).

La participación de las ERO en la patogénesis de las enfermedades virales ha sido objeto de diversas investigaciones. En este contexto se conoce que durante estos procesos se genera una sobreproducción de $O_2^{\cdot-}$ (Akaike *et al.*, 1998). El origen de este incremento está asociado a la respuesta del sistema inmune del hospedero frente a la replicación viral, sin embargo más que beneficiar, daña al hospedero. El $O_2^{\cdot-}$, aunque no es particularmente reactivo, participa en la reacción de Fenton para generar $\cdot OH$, mucho más lesivo. En la infección por VIH, de manera particular se ha detectado una disminución de la SOD mitocondrial y SOD extracelular de las células sanguíneas periféricas (Pace y Leaf, 1995; Treitinger *et al.* 2000). La disminución en la actividad SOD guarda relación con los efectos de la proteína viral Tat sobre sus mecanismos de síntesis e inducción (Pace y Leaf, 1995). La actividad SOD determinada en este estudio se corresponde con la SOD eritrocitaria. Esta se encontró incrementada (Fig. III.4) y correlacionó inversamente con el conteo CD4+. Lo anterior puede ser explicado, al menos en parte, teniendo en cuenta que el ambiente oxidativo predominante en el paciente pudo actuar como agente inductor de la síntesis de SOD en los eritrocitos durante su generación en la médula.

Existen evidencias que el EO es elevado tanto en pacientes VIH+ asintomáticos como en pacientes SIDA. En correspondencia con lo anterior se han detectado incrementos en la

concentración de diferentes derivados de la oxidación de biomoléculas como el MDA y HPO (Favier *et al.*, 1994; Pace y Leaf, 1995; McLemore *et al.*, 1998).

Los resultados muestran un incremento en las concentraciones de OT y MDA (Fig. III.2B y Fig. III. 3B) que coinciden con lo reportado en la literatura (Favier *et al.*, 1994; Fuchs *et al.*, 1994; Jareno *et al.*, 1998) pudiendo reconocer diferencias en los valores de MDA entre los diferentes estados A2B2 y A3B3. Estos productos de la oxidación constituyen productos citotóxicos que pueden dañar biomoléculas y difundir del sitio donde se producen y provocar edema, alteraciones de la permeabilidad vascular, desencadenar la reacción inflamatoria, entre otros (Southorn y Powis, 1988). Los OT promueven daños al ADN (Grisham y McCord, 1986; Cheeseman, 1993), sus valores en los pacientes VIH+ son mayores en relación a los sujetos VIH- independientemente del estado evolutivo de la infección.

El PP y el TAS son indicadores globales del estado redox y reflejan el balance entre las influencias antioxidantes y prooxidantes. Como era de esperar, considerando el EO que acompaña la infección por VIH, se encontraron valores elevados de PP y bajos de TAS en pacientes VIH+ comparados con sujetos VIH- (Fig III.5). Los valores de TAS se encontraron en un intervalo similar al encontrado en este tipo de pacientes por McLemore y cols. (1998). Por otra parte, la correlación entre el incremento de los valores de MDA y PP y la disminución de TAS, evidencia la relación entre el aumento del daño oxidativo y la disminución de la capacidad antioxidante observada en estos individuos (Pace y Leaf, 1995).

El % F ADN puede resultar del proceso de apoptosis, en este caso a nivel linfocitario y los valores elevados detectados (Fig. III.3A) coinciden con la teoría planteada en 1991 por

numerosos grupos que reportan una asociación entre los niveles de CD4, la F ADN y la muerte celular por apoptosis (Terai *et al.*, 1991; Laurent-Crawford *et al.*, 1991; Groux *et al.*, 1991; Gougeon *et al.*, 1991). El daño por ERO está relacionado con la ruptura de hebras y cromosomas por la oxidación del ADN. Algunos de estos efectos pueden ser reparados pero un daño extenso puede conllevar a la apoptosis o ser consecuencia de ésta (Reid y Loeb, 1993) la cual es reconocida como la forma por la que mueren la mayoría de las células CD4+ infectadas o no, en la infección por VIH (Famularo *et al.*, 1997; Jaworowski y Crowe, 1999).

Debido a la posible interacción entre los diferentes antioxidantes *in vivo* puede considerarse como poco representativa la medición de un antioxidante individual en comparación con una evaluación global del estado antioxidante (Romay *et al.*, 1996; Delatrade y Bonnefont-Rousselot, 1998; Prior y Cao, 1999). El PP y TAS fueron evaluados considerando la anterior reflexión. Los resultados sugieren que los eventos metabólicos que ocurren a consecuencia de la infección por VIH contribuyen a la disminución de la capacidad antioxidante y por consecuencia al incremento del EO, apuntando además al carácter multifactorial de esta infección.

A partir de los resultados analizados y aquellos que argumentan la activación de la replicación viral mediada por ERO (Cullen, 1991; Premanathan *et al.*, 1997; Muller *et al.*, 2000) es que consideramos en la hipótesis de la presente investigación el posible beneficio de la terapia antioxidante, pudiendo considerar estos marcadores como indicadores de la efectividad de la terapia así como contribuir los mismos conjuntamente con los marcadores clínicos y de progresión de la infección a un análisis y valoración integral de la respuesta al tratamiento en pacientes VIH+.

Para la evaluación de los índices dietarios se decidió emplear los niveles de ingesta en lugar de las evaluaciones plasmáticas de los micronutrientes, lo que permitió reconocer las deficiencias o no existentes en estos individuos,. La cuantificación de los mismos en el plasma no es del todo fidedigna debido a la multiplicidad de funciones que estos cumplen y la asociación a biomoléculas *in vivo* para su metabolismo. A través de la evaluación de los niveles de ingesta se pudo evaluar el régimen dietario para estos individuos, comportándose de manera homogénea para la población pero no garantiza los niveles de adecuación según las características específicas de cada estado de evolución de la enfermedad. En el caso de los individuos A3B3 el compromiso inmunológico es mayor, así como las enfermedades oportunistas y recurrentes lo que equivale a un mayor requerimiento en el ámbito de la mayoría de los índices nutricionales (Baum *et al.*, 1992; Castetbon *et al.*, 1997; Macallan, 1999). En el caso de los niveles de energía, su adecuación, según los requerimientos, ha sido evaluada por diversos autores como importante en los eventos de pérdida de peso o desgaste físico, reconocido como uno de los primeros síntomas en los inicios de la caracterización de la enfermedad (Suttman *et al.*, 1995; Macallan, 1998).

Los niveles de adecuación de macro y micronutrientes han sido evaluados como básicos en el desarrollo fisiológico unido al reconocido papel de la nutrición en la sobrevivencia y calidad de vida de los individuos VIH+, un bajo nivel de consumo de energía contribuye a la pérdida progresiva de peso lo que constituye un mal pronóstico en la infección y las ingestas bajas de vitaminas repercuten en la disminución de los linfocitos T CD4 + (Baum *et al.*, 1992; Macallan *et al.*, 1999; Semba y Tang 1999). Los resultados de esta evaluación

permiten clasificar indistintamente a los individuos involucrados en el estudio con niveles de adecuación de exceso, adecuado, insuficiente y crítico con respecto a todos los índices nutricionales de ingesta teniendo en cuenta los grupos estratificados A2B2 y A3B3, considerando su posible influencia en los marcadores del estado redox. Estos resultados evidencian una deficiencia de moderada a severa en la ingesta de micronutrientes, por debajo de los requerimientos para estos individuos. No se evidenciaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los grupos A2B2 y A3B3 para los índices nutricionales. Teniendo en cuenta estos antecedentes se decidió tomar en lo adelante la población VIH+ en estudio como un solo grupo para el análisis del efecto sobre éstos de las intervenciones dietarias realizadas.

Alrededor del 90% de los nuevos casos de VIH+ aparecen en los países subdesarrollados. Aunque los mayores avances en las investigaciones sobre el VIH se han dirigido a la comprensión de los procesos biológicos de la infección, alcanzándose en los últimos años avances importantes en la terapia, el papel de la nutrición en la patogénesis del VIH es aún la mayor laguna del conocimiento científico en esta patología. La idea de que los hospederos malnutridos son mucho más susceptibles a la infección es universalmente aceptada (Semba y Tang, 1999).

Al alcanzar la infección VIH/SIDA el estado de pandemia en los países subdesarrollados, donde son comunes los estados de malnutrición y donde los fármacos antirretrovirales no están disponibles o tienen precios muy elevados, la identificación y corrección de las deficiencias en micronutrientes adquiere una gran importancia.

El incremento de la frecuencia de oferta de vegetales, frutas y algunos alimentos ricos en sustancias de reconocido carácter antioxidante durante 3 meses a 40 PVVIH, contribuyó a

elevar de forma significativa los índices nutricionales de ingesta de las vitaminas A, C, E, frutas y vegetales en estos individuos, lo que repercutió en el incremento de la capacidad antioxidante, evidenciándose en la mejoría de indicadores como TAS, GPx y GSH en el 56 % de la población. A pesar de esto, los pacientes mostraron valores de los marcadores del estado redox celular que no alcanzaron los detectados en los individuos sanos, lo que sugiere el mantenimiento de un EO elevado. Entre los valores al tiempo 0 y 3 meses no se detectaron diferencias en cuanto a la ingesta de energía, ni de macronutrientes. Se evidenció diferencia significativa ($p < 0,05$) en la frecuencia en la alimentación de vegetales y frutas como naranja, papa, tomate, plátano, col, lechuga, calabaza y pepino, alimentos estos ricos en flavonoides, terpenos, ácido fenólico y vitaminas y sus precursores, todos ellos de reconocido carácter antioxidante. Este incremento en la ingesta de frutas y vegetales puede explicar la mejoría que tuvo lugar en algunos marcadores del balance redox en estos pacientes.

Una disminución moderada no significativa de $CD8^+/CD38^+$ fue detectada en los pacientes VIH+ que participaron de este experimento. El CD38 es una glicoproteína transmembrana que se expresa en diferentes etapas de diferenciación y maduración de este subtipo celular, estando asociado su incremento con la activación celular y la movilización intracelular de calcio. En algunas investigaciones la subpoblación CD38 se encuentra en la fase pre G_0 - G_1 que sugiere un estado preapoptótico (Jackson *et al.*, 1990; Aarhus *et al.*, 1995). Algunos autores han identificado subgrupos de pacientes VIH+ con bajos niveles de CD8/CD38 que permanecen clínicamente estables, considerando el incremento en este marcador como un mal pronóstico en la progresión de la infección (Mahalingam *et al.*, 1995; Froebel *et al.*, 2000). La relación inversa no está clara, sugiriendo una asociación

entre los niveles de antioxidantes y el balance antioxidante-oxidante en el conteo de CD38. Los mecanismos moleculares para explicar estos resultados no están dilucidados pero numerosos efectos farmacológicos, reportados para las vitaminas antioxidantes y los flavonoides, como: protección vascular, efectos antiinflamatorios, antitumorales y actividad antihipertensiva pudieran estar relacionados con las observaciones clínicas (Fontham, 1994; Chen *et al.*, 1995; Olson, 1996; Pérez y Sánchez, 2001). El análisis de distribución evidencia una tendencia significativa a la disminución de este indicador lo que resulta un efecto positivo en estos individuos de la dieta empleada.

Los flavonoides poseen propiedades antioxidantes fundamentalmente caracterizada por la captura de radical hidroxilo y anión superóxido, implicados ambos en la iniciación de la peroxidación lipídica (Ungemach, 1987; Gardner, 1989; Hogg *et al.*, 1992). Solamente un número limitado de estudios sobre la acción de los flavonoides en el ámbito celular han sido reportados (Whally *et al.*, 1990; Nègre-Salvayre y Salvayre, 1992; Nakayama *et al.*, 1993). Por lo que poco se sabe del mecanismo por el cual actúan previniendo el daño oxidativo o incrementando las concentraciones de GSH (el cual es indispensable para la reducción de los peróxidos por la actividad de la GPx) o protegiendo contra la disminución de GSH en cooperación con el ácido ascórbico. Nagata y colaboradores en 1999, reportaron su acción citoprotectora relacionada con la activación de la GPx en cooperación con el selenio.

Por otra parte, no se detectaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en cuanto a los índices bioquímicos de función renal, hepática y hemoquímica en los pacientes estudiados en este período, lo anterior sugiere que la enfermedad no evolucionó en grado tal que

produjera alteraciones en estos órganos y que el incremento en la ingesta de nutrientes tampoco produjo alteraciones en el funcionamiento fisiológico.

Los resultados sugieren el posible efecto beneficioso del empleo de antioxidantes dietarios en el aumento de la capacidad antioxidante, tal y como ha sido descrito por otros autores (Evans y Halliwell, 2001) aunque no hubo evidencias de protección contra el daño oxidativo a biomoléculas probablemente por la intensidad de la generación de ERO, durante el curso de la infección, o a que las cantidades de micronutrientes contenidas en este régimen dietético fueron insuficientes para lograr recuperar el balance oxidante-antioxidante.

Lo anterior unido a la tendencia significativa a la disminución de CD8⁺/CD38⁺ reafirma el papel crucial que pueden jugar los micronutrientes en la patogénesis de la infección causada por el VIH (Semba y Tang, 1999).

Teniendo en cuenta el reconocido efecto que ejercen los micronutrientes en el curso de las infecciones virales (Beck, 2000) y en el VIH en particular, las evidencias de déficit nutricional de estos pacientes y cómo su corrección conduce a la mejoría de algunos indicadores del balance redox; teniendo en cuenta además, que la relación déficit de micronutrientes/ingesta de micronutrientes es tan desproporcionada en esta patología que se hace prácticamente imposible alcanzarla aún con una dieta rica en este tipo de nutrientes es que se procedió a suplementar los individuos VIH+ con un producto antioxidante nacional (**Vimang**[®]) evaluándose sus acciones a través de un ensayo clínico a doble ciego, vs. placebo, garantizando mayores cantidades de sustancias antioxidantes de diferentes características de origen natural. En estudios preclínicos *in vitro e in vivo* este producto demostró su potente carácter antioxidante incluso en comparación con otras sustancias

naturales y comerciales o compuestos de referencia como Vit. C, E, β -carotenos o mezclas de Vit. C y E (Sánchez *et al.*, 2000).

En la caracterización inicial de los grupos placebo y **Vimang**[®] se evidenció que los pacientes del grupo placebo tuvieron un valor medio de MDA inferior a los pacientes del grupo **Vimang**[®] ($p < 0,05$), aspecto que no se manifestó en el resto de los marcadores y que resultó del proceso de aleatorización. A los 6 meses se evidenció un efecto beneficioso de la suplementación en un 81% de los individuos del grupo **Vimang**[®], detectándose un incremento de la capacidad antioxidante total. De este grupo el 43,9 % resultó en un aumento simultáneo de la capacidad antioxidante y la protección contra el daño a las diferentes biomoléculas. Este resultado contrasta con el 48,1% de los individuos del grupo placebo que manifestaron un incremento de la capacidad antioxidante como consecuencia del efecto compensatorio del sistema en respuesta al estímulo pro-oxidante crónico, en el que solo el 2,5% de los cambios del sistema redox estuvieron asociados a un cambio simultáneo de mejoría de los indicadores globales de daño oxidativo y las variables asociadas a la protección de biomoléculas. Este último resultado es explicable considerando el estado general de los pacientes en estudio y además valida el análisis sistémico realizado, considerando la variación conjunta de varios de los indicadores del estado redox. Estos resultados se obtuvieron sin interferencias de los antioxidantes dietarios ya que no se detectaron diferencias ($p < 0,05$) en la ingesta entre los grupos durante el período estudiado.

Los hallazgos anteriores corroboran en la clínica lo reportado previamente en la fase de investigación preclínica de este antioxidante (Sánchez *et al.*, 2000, 2001a, 2001b, 2003) donde se había demostrado que la administración oral de **Vimang**[®] era capaz de producir

efectos antioxidantes sistémicos y sus efectos trascendían a órganos tales como cerebro e hígado.

De notable importancia resultó el comprobar que tras el tratamiento con **Vimang**[®] todos los indicadores del balance redox analizados se modificaron de manera significativa ($p < 0,05$ o $p < 0,01$) evolucionando hacia valores cercanos a la normalidad (Tabla III.11). El indicador de daño al ADN linfocitario (%F ADN) retornó a valores comparables al que se aprecia en sujetos VIH-. Por otra parte, la mejoría detectada en cuanto a la recuperación de las concentraciones de GSH es también de gran relevancia. Además del impacto sobre los sistemas antioxidantes que originan la disminución de GSH, que en los pacientes VIH+ esta asociada a la aparición de enfermedades relacionadas con el EO crónico o la propia disminución crónica de GSH, cómo las cataratas o el incremento de la sensibilidad a la toxicidad por fármacos (Pace y Leaf, 1995).

En la fase de estudios preclínicos se demostró que el **Vimang**[®] era capaz de ejercer efectos antioxidantes y una de las características que contribuye a esta propiedad, es como quelante de Fe. Reconociendo las posibles implicaciones de este elemento en los eventos de generación de ERO es que consideramos que esta propiedad pudiera contribuir al resultado obtenido, que sin duda es consecuencia de la acción sinérgica entre los diferentes constituyentes del producto (Sánchez *et al.*, 2000).

Es conocido que el VIH afecta el SNC originando alteraciones cognitivas y motoras en la mayoría de los pacientes (Kolso y González-Serrano, 2000). Las células microgliales constituyen un blanco importante de la infección por VIH y un sitio poco accesible para la terapia antirretroviral (Nicolini *et al.*, 2001). Sin embargo en la fase de estudios preclínicos se demostró que el **Vimang**[®], administrado por vía oral, era capaz de ejercer efectos

antioxidantes a nivel de neuronas de la región CA1 del hipocampo (Sánchez *et al.*, 2001a), por lo que lo anterior sería un elemento que aportaría valores adicionales a esta terapia.

Los marcadores de progresión evaluados no evidenciaron cambios en el conteo de CD4, manifestándose una estabilización de esta subpoblación y de CD38, lo que resultó importante para la seguridad del estudio, teniendo en cuenta, la posible implicación de los mismos en un mal pronóstico de la infección. En estudios recientes se ha puesto de manifiesto que, para que cualquier terapia antiviral sea efectiva debe reducir los niveles de CD38 y aumentar los CD4 (Vigano *et al.*, 2000). La tendencia a la disminución del CD95 que tuvo lugar tras la suplementación con **Vimang**[®] (Fig. III.9) puede ser un resultado importante que necesite confirmación en nuevos estudios, donde se incremente el período de suplementación.

El efecto sobre los indicadores clínicos evidenció, conjuntamente con el no reporte de reacciones adversas, el comportamiento inocuo del producto **Vimang**[®], sin efectos tóxicos en la función renal, hepática y hemoquímica en los pacientes en estudio. Estos resultados demuestran por primera vez la inocuidad del uso sistemático (6 meses) de este extracto natural en humanos portadores de VIH y contribuye a validar su uso en disrupciones crónicas del balance redox en los mismos.

Estos resultados avalan la suplementación, como una alternativa, para restaurar las condiciones de homeostasia considerando los efectos patológicos del virus y los efectos adversos reconocidos de la terapia antirretroviral que pudieran estar relacionados con un metabolismo oxidativo (Prakash *et al.*, 1997; Vittecoq *et al.*, 1998; Pujol *et al.*, 2000).

El surgimiento de la terapia antirretroviral transformó la infección por VIH en una enfermedad crónica manejable. El éxito de esta terapia llevó a reconsiderar el uso de una

terapia alternativa como la antioxidante. Sin embargo, además de otros inconvenientes el uso de la terapia antirretroviral está limitada por su alto costo a alrededor del 10% de los individuos infectados en el ámbito mundial (Kotler, 1998).

La aplicación de la terapia antioxidante enfrenta numerosos retos, el principal continua siendo la validación clínica de su utilidad, más que la especulación teórica de sus potenciales beneficios. En este sentido, algunos estudios reportan mejorías clínicas con el uso de antioxidantes en pacientes VIH+ (Roederer *et al.*, 1990; Harakeh *et al.*, 1990; Cirelli *et al.*, 1991; Roberts *et al.*, 1995; Delmas-Beauvieux *et al.*, 1996) y otros no encuentran evidencias de beneficio (Clotet *et al.*, 1995; Coodley *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1997). La principal limitante de estos estudios ha sido el no abordaje de un conjunto de variables que permitan conocer de manera integral la incidencia de la terapia sobre el sistema redox, el sistema inmunológico e indicadores de progresión de la enfermedad.

El presente estudio sí permitió conocer tanto los efectos del incremento en micronutrientes dietarios como la suplementación antioxidante sobre indicadores de varios componentes del sistema redox e indicadores inmunológicos estrechamente correlacionados con la replicación viral y la progresión de la infección. Lo anterior permite dar una respuesta más integral sobre los mecanismos por los que dicha terapia pudiera estar actuando (Fig. IV.1).

Otro aspecto clave ampliamente debatido y al que debe responder el empleo de la terapia antioxidante es el hecho de que los antioxidantes pueden inhibir la apoptosis de células T infectadas contribuyendo a perpetuar reservorios virales o a incrementar la producción viral. Es importante dominar que las determinaciones de VIH en sangre de individuos infectados ha permitido conocer que típicamente solo un porcentaje bajo (0,01- 0,1%) del

total de células sanguíneas mononucleares y células de los linfonodos son las infectadas (Jaworoski y Crowe, 1999). Aún en las células infectadas, el VIH a través de la inducción de la síntesis de proteína pro o anti apoptóticas ejerce un control sobre este proceso en dependencia del estadio de la infección (Kaplan *et al.*, 1998).

Lo explicado anteriormente junto a otros resultados experimentales han puesto en evidencia que las células infectadas inducen el proceso apoptótico en células no infectadas y que además el VIH y las infecciones oportunistas, por mecanismos directos o indirectos, originan un ciclo que favorece el ambiente pro-oxidante, la replicación viral, el debilitamiento de los sistemas antioxidantes y la progresión de la enfermedad (Pace y Leaf, 1995). No menos importante resulta el hecho de que el ambiente pro-oxidante puede contribuir a la mutación del ARN viral, lo que undio a las mutaciones que introduce la transcritasasa reversa implicaría formas más resistentes a la terapia (Schweizer y Peterhans, 2000).

Por otra parte, la translocación de NF- κ B al núcleo es un paso obligado para el proceso de replicación viral y puede iniciarse tanto por la acción de agentes oxidantes sobre κ B como por Tat, lipopolisacáridos bacterianos, citoquinas y otros agentes (Kotler, 1998).

En este ámbito, podemos señalar que existen evidencias experimentales recientes de que el mecanismo de activación de NF- κ B es inhibido por el **VimangÒ** (R. Delgado, comunicación personal, 2003), lo cual contribuiría a impedir la replicación viral. Adicionalmente la mejoría que se pudo apreciar en los pacientes en cuanto a indicadores de daño oxidativo a biomoléculas (Tabla III.11) contribuye significativamente a romper el ciclo degenerativo sistémico que tiene lugar tras la infección. Por otra parte, la medición de indicadores inmunológicos como CD38/CD8 estrechamente correlacionado con la carga

viral, demuestra que en los pacientes estudiados con incremento de antioxidantes dietarios hay una tendencia a su disminución. Es probable que un tratamiento más prolongado con este antioxidante o la aplicación de terapias combinadas (antirretrovirales, **VimangÒ**, dieta) produzca efectos beneficiosos adicionales.

CAPITULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los resultados han permitido arribar a las siguientes conclusiones:

Conclusiones

1. Los pacientes VIH+ cubanos del régimen sanatorial manifiestan deficiencias en los sistemas antioxidantes (bajos valores de GSH y GPx) y evidente daño oxidativo en las biomoléculas (altas concentraciones de MDA, OT y % F ADN) lo cual indica que están bajo un severo estado de desbalance redox. La subpoblación T CD4+ esta disminuida y CD38+/CD8+ y CD95 incrementados. Por otra parte, desde el punto de vista nutricional la deficiencia más seria se corresponde con los micronutrientes, los que solo alcanzan como promedio el 52-55% de la dosis diaria recomendada.
2. El incremento de la ingesta de micronutrientes dietarios mejora el balance redox en el 56% de los pacientes, manifestándose un efecto positivo en las variables TAS, GPx y GSH. Los porcentajes de adecuación media ascienden a un 56% de la dosis diaria media recomendada para este tipo de pacientes y no se producen modificaciones en las variables inmunológicas analizadas.
3. La suplementación con el **Vimang®**, por un período de 6 meses, mejoró los sistemas antioxidantes (SOD, GPx ,GSH) y disminuyó los indicadores de daño a biomoléculas, alcanzándose en el caso del % F ADN valores normales. Las variaciones de los indicadores globales de actividad antioxidante junto a variaciones positivas de marcadores de daño a biomoléculas, tienen lugar en un 43,9% de los pacientes tratados con **Vimang** frente a un 2% de los tratados con placebo. Este tratamiento no ocasionó la aparición de efectos adversos o reacciones colaterales y produjo una tendencia significativa a la disminución de CD95.

Recomendaciones

1. Realizar el estudio de suplementación con **VimangÒ** en individuos VIH+ por un período de al menos un año incluyendo en el sistema diagnóstico la medición de la carga viral y la evaluación de la calidad de vida.
2. Realizar un estudio fase II combinando la terapia antirretroviral con la terapia antioxidante (**VimangÒ**).
3. Realizar una estrecha vigilancia nutricional sobre los pacientes VIH+ ambulatorios y en régimen sanatorial con vistas a indicar las medidas correctivas adecuadas.

BIBLIOGRAFIA

- Aarhus R, Graeff RM, Dickey DM, Walseth TF, Lee HC. ADP-ribosyl cyclase and CD38 catalyse the synthesis of a calcium-mobilizing metabolite from NADP. *J Biol Chem* 1995; **270**: 30327-33.
- Akaike T, Suga M, Maieda H. Free Radicals in viral pathogenesis: Molecular Mechanism involving superoxide and NO. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998; **217**:64-73.
- Akerlund B, Jarstrand C, Lindeke B, Sonnerborg A, Akerblad AC, Rasool O. Effect of N-acetylcysteine (NAC) treatment on HIV-1 infection: a double-blind placebo-controlled trials. *Eur J Clin Pharmacol* 1996; **50** :457-61.
- Alan R, Lifson J, George W. The natural history of HIV infection. *J Infect Dis* 1998; **158**: 1360-7.
- Alessio M, Roggero S, Funaro A, De Monte LBPL, Geuna M, Malavasi F. CD38 molecule: structural and biochemical analysis on human T lymphocytes, thymocytes and plasma cells. *J Immunol* 1998; **145**: 878-84.
- Allard J, Aghdassi E, Chau J, Salit Irving, Walmsley Sh. Oxidative stress and plasma antioxidant micronutrients in humans with HIV infection. *Am J Clin Nutr* 1998a; **67**: 143-7.
- Allard JP, Aghdassi E, Chau J, Tam C, Kovacs C, Salit IE, Walmsley Sh. Effects of vitamin E and C supplementation on oxidative stress and viral load in HIV infected subjects. *AIDS* 1998b; **12**: 1653-9.
- Aries SP, Schaaf B, Muller C, Dennin RH, Dalhoff K. Fas (CD95) expression on CD4+ T cells from HIV infected patient's increases with disease progression. *J Mol Med* 1995; **73**: 591-3.

- Aruoma OI, Halliwell B, Mahmood N, Burke A, Greespan HC. Evaluation of the antioxidant and antiviral actions of herbal preparations: rosvital and carciverin. *Phytother Res* 1996a; **10**:152-5.
- Aruoma OI, Spencer J, Rossi R, Aeschbach R, Khan A, Mahmood N. An evaluation of the antioxidant and antiviral action of extracts of rosemary and provencal herbs. *Food Chem Tox* 1996b; **34**: 449-56.
- Aruoma OI. The antioxidant action of N-acetylcysteine: Its reaction with H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$, O_2^- and HOCl. *Free Rad Biol Med* 1989; **6**: 593-7.
- Asamblea Médica Mundial 2000, Declaraciones de Helsinki, Guía de Recomendaciones Médicas para las Investigaciones Biomédicas en Humanos, adoptada por la XVIII Asamblea en Finlandia Junio del 1964, enmendada por la II Asamblea General de Edimburgo, Escocia, anexo a protocolo clínico.
- Asensi M, Sastre J, Pallardo FV, Lloret A, Lehner M, García de la Asunción J, Viña J. Ratio of reduced to oxidized glutathione as indicator of oxidative stress status and DNA damage. *Methods Enzymol* 1999; **299**: 267-76.
- Baier-Bitterlich G, Fuchs D, Wachter H. Chronic immune stimulation, oxidative stress, and apoptosis in HIV infection. *Biochem Pharmacol* 1997 Mar 21; **53** : 755-63.
- Barrerras-Sinoussi F, Cherman JC, Rey F. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983; **225**: 63-6.
- Baum MK, Shor-Posner G, Bonvehi P, Cassetti I, Lu Y, Mantero-Atienza E, Beach RS and Sauberlich HE. Influence of HIV infection on vitamin status and requirements. *Ann N Y Acad Sci* 1992; **669**:165-73.

- Beach, R.S., Mantero-Atienza E, Shor-Porner G, Javier JJ, Szapocznik J, Morgan R, Sauberlich HE, Cornwell PE, Eisdorfer C and Baum MK. Specific nutrient abnormalities in asymptomatic HIV-1 infection. *AIDS* 1992; **6**: 701-8.
- Beck MA. Nutritionally induced oxidative stress: effect on viral disease. *Am J Clin Nutr* 2000; **72** :1082-7.
- Beckman JS, Beckman TW, Chen J. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**: 1 620-4.
- Blanchard A, Montagnier L. AIDS associated Mycoplasmas. *Annu Rev Microbiol* 1994; **48**: 687-712.
- Boelaert JR, Weinberg GA, Weinberg ED. Altered iron metabolism in HIV infection: mechanism, possible consequences, and proposals for management. *Infect Agents Dis* 1996 Jan; **5** : 36-46.
- Bohler T, Baumler C, Herr I, Groll A, Kurz M, Debatin KM. Activation of CD95 system increases with disease progression in human immunodeficiency virus type 1-infected children and adolescent. *Pediatr Infect Dis J* 1997; **16**:754-9.
- Borg DC, Schaich KM. Iron and hydroxyl radicals in lipid oxidation: Felton reactions in lipid and nucleic acids co-oxidized with lipid. In: *Oxy-radicals in molecular biology and pathology* 1988. New York, Alan R. Liss Inc. pp 427-41.
- Bouscarat F, Levacher-Clergeot M, Dazza MC. Correlation of CD8 lymphocyte activation with cellular viremia and plasma HIV RNA levels in asymptomatic patients infected by human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res Hum Retrov* 1996; **12**: 17-24.
- Brent JA, Rumack BH. Role of free radicals in toxic hepatic injury I. Free Radical

- Biochemistry. *Clin Tox* 1993; **31** :139-71.
- Buhl R, Holroyd KJ, Mastrangeli A, Cantin AM, Jaffe HA, Well FB, Saltini FB, Cristal RG. Systemic glutathione deficiency in symptom-free HIV-seropositive individuals. *Lancet* 1989; **2**:1294-8.
- Burack JH, Cohen MR, Hahn JA, Abrahms DI. Pilot randomized controlled trial of chinese herbal treatment for HIV- associated symptoms. *J AIDS Res Hum Retrovirology* 1996; **12** (4): 386-93.
- Burton, K. Determination of DNA concentration with diphenylamine. *Methods Enzymol* 1968; **12B**: 163-7.
- Cabelli DEI, Bielski BHJ. Kinetics and mechanism for the oxidation of ascorbic acid/ascorbate by $\text{H}_2\text{O}_2/\text{O}_2^{\bullet-}$ radicals. *J Phys Chem* 1983; **87**:1809-12.
- Carr A, Samaras K, Chisholm DJ and Cooper DA. Pathogenesis of HIV-1 protease inhibitor- associated peripheral lipodystrophy, hyperlipidaemia, and insulin resistance. *Lancet* 1998; **351**:1881-3.
- Castetbon K, Kadio A, Bondurand A, Yao AB, Barouan C, Coulibaly Y, Anglaret X, Msellati P, Malvy D and Dabis F. Nutritional status and dietary intakes in HIV- infected outpatients in Abidjan, Cote D'Ivoire 1995. *Eur J Clin Nut* 1997; **51** : 81-6.
- Center for Disease Control (1993) Revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *Morb Mortal Wkly Rep* 1992; **14**:1-18.
- CQF, 1998. Pharmaceutical compositions including a mixture of polyphenols, terpenoids, steroids, fatty acids and microelements with antioxidant, analgesic, anti-inflammatory and anti-spasmodic properties. Patent pending 203/98, OCPI. Habana, Cuba.

CERES, automatic system: Evaluation of food intake for Latin America and the Caribbean
1997. Version 1.02 *INHA*.

Cirelli A, Ciardi M, Desimone C. Serum selenium concentration and disease progress in patients with HIV infection. *Clin Biochem* 1991; **24**: 211-4.

Clotet B, Gomez M, Ruiz L, Sirere G, Romeu J. Lack of short term efficacy of N-acetyl-L-cysteine in human immunodeficiency virus-positive patients with CD4 counts < 250/mm³. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1995; **9**: 96-7.

Colburn WA. Selecting and validating biologic markers for drug development. *J Clin Pharmacol* 1997; **37**(5): 355-62.

Coodley GO, Coodley MK, Lusk R, Green TR, Bakke AC, Wilson D, Wachenheim D, Sexton G, Salveon C. Betacarotene in HIV infection: an extended evaluation. *AIDS* 1996; **10**: 967-73.

Coutsoudis A, Bobat RA, Coovadia HM, Kuhn L, Tsai WY and Stein ZA. *Am J Pub. Health* 1995; **85**: 1076-81.

Cullen BR. Regulation of human immunodeficiency virus replication. *Annu Rev Microbiol* 1991; **45**: 219-50.

Cheeseman KH. Lipid peroxidation and cancer. DNA and free radicals. ed. Halliwell B, Aruoma OI. Ellis Horwood 1993: 109-44.

Chen H, Tappel AL. Protection of Vit. E, Se, trolox and Vit. C, against oxidative damage to rat blood and tissue in vivo. *Free Radic Biol Med* 1995; **18**: 949-53.

Chen P, Bauer G, Mitchell J, Factor R, Markham R, Schwartz DH. N-acetyl-L-cysteine and L-2-oxathiazoline-4-carboxylic acid enhance contact-dependent growth of HIV in

- resting peripheral blood mononuclear cells (PBMC) *in vitro* and increase recovery of HIV from human PBMC SCID mice. *AIDS* 1997; **11**:33-41.
- Cho YK, Lee HJ, Oh WI, Kim YK. Long-term immunological effect of ginseng on HIV-infected patients. *Abstr Gen Meet Am Soc Microbiol* 1997; **97**: 247 (abstract no E44).
- De Rosa SC, Zaretsky MD, Dubs JG, Roederer M, Anderson M, Green A, Mitra D, Watanabe N, Nakamura H, Tjioe I, Deresinski SC, Moore WA, Ela SW, Parks D, Herzenberg LA, Herzenberg LA. N acetylcysteine replenishes glutathione in HIV infection. *Eur J Clin Invest* 2000; **30**:915-29.
- Delatrade J, Bonnefont-Rousselot D. Oxidative stress, free radicals and aging. *Biotech Lab International* 1998; **3** (2) 21-23.
- Delmas-Beauvieux MC, Peucant E, Couchouron A, Constans J, Sergeant C, Simonoff M, Pellegrin JL, Leng B, Conri C, Clerc M. The enzymatic antioxidant system in blood and glutathione status in human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients: effects of supplementation with selenium or beta-carotene. *Am J Clin Nutr* 1996; **64**: 101-7.
- Dianzani MU. Lipid peroxidation and cancer. *Crit Rev Onc Hem* 1993;**15**:125-47.
- Diplock A, Charleux G, Crozier G, Kok F, Rice Evans C, Roberfroid M, Stahl W, Vin J. Functional food science and defence against reactive oxidative species. Nutrition Society 1998.
- Diplock AT. Antioxidant and disease prevention. *Mol Asp Med* 1994; **15**:293-376.
- Dobmeyer TS, Findhammer S, Dobmeyer JM, Klein SA, Raffel B, Hoelzer D, Helm EB, Kabelitz, D, Rossol R. Ex vivo induction of apoptosis in lymphocytes is mediated by oxidative stress: role for lymphocyte loss in HIV infection *Free Radic Biol Med* 1997;

22 : 775-85.

Epstein LG, Gelbard HA. HIV-1 induced neuronal injury in the developing brain. *J Leukoc Biol* 1999; **65**: 453-7.

Erdelmeier I, Gerard D, Yadan JC, Chaudiere J. Reactions of N-methyl-2-phenyl-indole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Mechanistic aspects of the colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chem Res Toxicol* 1998; **11**: 1184-94.

Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation product: Malondialdehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 1990;**186**: 407-21.

Evans P, Halliwell B. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *Br J Nutr* 2001; **850007-1145**: 567-74.

Famularo G, De Simone C, Marcellini S. Apoptosis: mechanism and relation to AIDS. *Med Hypotheses*. 1997; **48** : 423-9.

Favier A, Sappey C, Leclerc P, Faure P, Micoud M. Antioxidants status and lipid peroxidation in patients infected with HIV. *Chem-Bio Interact* 1994; **91**: 165-80.

Fawzi WW, Msamanga GI, Spiegelman D, Urassa EJM, McGrath N, Mwakagile D, Antelman G, Mbise R, Herrera G, Kapiga S, Willett W, Hunter DJ, for the Tanzania Vitamin and HIV Infections Trial Team. Randomized trial of effects of vitamin supplements on pregnancy outcomes and T cell counts in HIV-1 infected women in Tanzania. *Lancet* 1998; **351**:1477-82

Ferbas JJ, Kaplan AH, Housner MA. Virus burden in long-term survivors of human immunodeficiency virus (HIV) infection is a determinant of anti-HIV CD8+ lymphocyte activity. *J Infect Dis* 1995; **172**:329-39.

Fernández A, Kiefer J, Fosdick L, McConkey DJ. Oxygen radical production and thiol

- depletion are required for Ca^{2+} mediated endogenous activation in apoptotic thymocytes. *J Immunol* 1995; **155** : 5 133-9.
- Foga I, Nath A, Hasinoff B, Geiger J. Antioxidant and dipyridamole inhibit HIV-1 gp 120-induced free radical-based damage to human monocytoïd cells. *J AIDS Res Hum Retrovirology* 1997; **16** : 223-9.
- Fontham ETH. Vitamin C, vitamin C-rich foods and cancer. Frei B ed Natural antioxidants in human health and diseases. London. Acad Press 1994: 157-97.
- Frenk S. Enfermedades relacionadas con la acción de radicales libres. *Gac Méd Méx* 1995; **132** (2): 199-203.
- Froebel KS, Raab GM, D'Alessandro C, Armitage MP, MacKenzie KM, Struthers M, Whitelaw JM, Yang S. A single measurement of CD38/CD8 cells in HIV+, long-term surviving injecting drug users distinguishes those who will progress to AIDS from those who will remain stable. *Clin Exp Immunol* 2000; **122** :72-8.
- Fuchs J, Schofer H, Ochesendorf F, Janka S, Milbradt R, Buhl R. Antioxidants and peroxidation products in the blood of HIV-1 infected patients with HIV associated skin diseases. *Eur J Dermatol* 1994; **4**: 148-53.
- García T B, Morín S MA, Céspedes MEM, Caples HS, Olembe ES. Radicales Libres: Sueños moleculares o realidades clínicas ? *Rev Cub Inv Biomed* 1994; **13**): 12-18.
- Gardner HW. Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. *Free Rad Biol Med* 1989; **7**: 65-86.
- Gehri R, Hahn S, Rothen M, Steuerwald M, Nuesch R, Erb P. The Fas receptor in HIV infection: Expression on peripheral blood lymphocytes and role in the depletion of T cells. *AIDS* 1996; **10**:9-16.

- Gibb RK, Taylor DD, Wan T O'Connor DM, Doering DL, Gerceł-Taylor C. Apoptosis as measure of chemosensitivity. *Ginecol Oncol* 1997; **65**:13-22.
- Giorgi JV. Characterization of T lymphocytes subset alterations by flow cytometry in HIV disease. *Ann NY Acad Sci* 1993; **677**: 126-37.
- Goldstein S. The fenton reagents. *Free Rad Biol Med* 1993; **15**: 435-45.
- Gougeon ML, Oliver R, Garcia S. Demonstration of an engagement process towards cell death by apoptosis in lymphocytes of HIV infected patients. *C R Acad Sci* 1991; **312**: 529-37.
- Greenson JK, Belitsos PC, Yardley JH and Bartlett JG. AIDS enteropathy: occult enteric infections and duodenal mucosal alterations in chronic diarrhoea. *Annals Int Med* 1991; **114**: 366-72.
- Greenspan HC, Aruoma O. Could oxidative stress initiate programmed cell death in HIV infection? A role from plant derived metabolites having synergistic antioxidant activity. *Chem Biol Interact* 1994; **143**: 145-8.
- Greiling H, Gressner AM (eds) Guide for Clinical Chemistry and Pathobiochemical. 3rd Edition Stuttgart/New York Schattauer Verlag 1995.
- Grisham MB, McCord JM. Chemistry and cytotoxicity of reactive oxygen metabolites. In: Physiology of oxygen radicals. Taylor AE, Matalon S, Ward P, eds, Bethesda, Maryland, Am Phys Soc 1986:1-18.
- Groux H, Monte D, Bourrez JM, Capron A, Ameisen JC. Activation of CD4⁺ T-lymphocytes in asymptomatic HIV infected patients induces the program action of lymphocyte death by apoptosis *C R Acad Sci* 1991; **312**: 599-606.

- Guevara GM, Tamayo D, Gonzalez S. Estudio etnofarmacológico del extracto de *Mangifera Indica L.* (QF-808). 1er Congreso Internacional de Farmacología. Ciudad Habana, Agosto 1998.
- Haber F, Weiss J. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc R Soc Ser A* 1934; **147**:332-52.
- Halliwell B, Gutteridge JMC, Aman P, Harkonen H, Hallmans G, Bach KKE. Iron as a biological prooxidant. ISI Atlas. *Sci Biochem* 1988; **1**: 48-52.
- Halliwell B. How to characterize a biological antioxidant. *Free Rad Res* 1990, Comms 9: 1-32.
- Halliwell B. Superoxide, iron, vascular endothelium and reperfusion injury. *Free Rad Res Comm* 1989; **5**:315-8.
- Harakeh S, Jariwalla RJ, Pauling L. Suppression of human immunodeficiency virus replication by ascorbate in chronically and acutely infected cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**:7245-9.
- Herzenberg L, De Rosa SC, Dubs JG, Roederer M, Anderson MT, Ela AW, Deresinski SC, Herzenberg LA. Glutathione deficiency is associated with impaired survival in HIV disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**:1967-72.
- Hogg N, Darley-Usmar VM, Wilson MT, Moncada S. Production of hydroxyl radicals from the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide. *Biochem J* 1992; **281**: 419-24.
- Huie RE, Padmaja S. The reaction of NO with superoxide. *Free Rad Res Com* 1993; **18**: 195-200.
- Hussey G, Hughes J, Potgieter S, Kessow G, Burgess J, Beatty D, Keraan M, Carlesle E. Vitamin status and supplementation and its effects on immunity in children with AIDS.

In abstracts of XVII International Vitamin A Consultative Group Meeting 1998, Guatemala City pág 6: Washington DC: International Life Science Institute.

Ishikawa Y, Yokoo T, Kitamura M. c-Jun/AP-1, but not NF-kappa B, is a mediator for oxidant-initiated apoptosis in glomerular mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997; **240** : 496-501.

Israel N, Gougerot- Pocidalo MA: Oxidative stress in human immunodeficiency virus infection. *CMLS* 1997; **53**: 864-70.

Jackson DG, Bellesia E. Isolation of cDNA encoding human CD38 (T10) molecule, a cell surface glycoprotein with an unusual discontinuous pattern of expression during lymphocytes differentiation. *J Immunol* 1990; **144**:2811-5.

Jareno EJ, Bosch Morell F, Fernández Delgado R, Donat J, Romero FJ. Serum malondialdehyde in HIV seropositive children. *Free Radic Biol Med* 1998; **24**: 503-6.

Jaworowski A, Crowe SM. Does HIV cause depletion of CD4⁺ T cells *in vivo* by the induction of apoptosis? *Immunol Cell Biol* 1999; **77**: 90-98.

Jin DY, Chae HZ, Rhee SG, Jeang KT. Regulatory role for a novel human thioredoxin peroxidase in NF-kappa B activation. *J Biol Chem* 1997; **272**: 30952-61.

John GC, Nduati RW, Mbori-Ngacha D, Overbaugh J, Welch M, Richardson BA, Ndinya-Achola, J, Bwayo J, Krieger J, Onyango F and Kreiss JK *J Infect Dis* 1997; **175**, 57-62

Kaneko M, Matsumoto Y, Hayashi H. Oxygen free radicals and calcium homeostasis in the heart. *Mol Cell Biochem* 1994; **135**: 99-108.

Kaplan D, Sieg S. Role of the Fas/Fas ligand apoptotic pathway in human immunodeficiency virus type 1 disease. *J Virol* 1998; **72**:6279-82.

Keating J, Bjarnason I, Somasundaram S, Macpherson A, Francis N, Prices AB, Sharpstone

- D, Smithson J, Menzies IS, Gazzard BG. Intestinal absorptive capacity, intestinal permeability and jejunal histology in HIV and their relation to diarrhoea. *Gut* 1995; **37**: 623-9.
- Kinloch R A, Treherne JM, Furness L M, Hafimohamadreza Y. The pharmacology of apoptosis. *Trends Pharmacol Sci* 1999; **20**: 35-42.
- Kolso DL, Gonzalez-Serrano F. HIV and HIV dementia. *J Clin Invest* 2000; **106**:11-3.
- Kotler DP. Antioxidant therapy and HIV infection. *Am J Clin Nutr* 1998; **67**:7-9.
- Krinsky NI. The biological properties of carotenoids. *Pure Appl Chem* 1994; **66**: 1003-10.
- Kruman I, Nath A, Mattson M. HIV-1 protein Tat induces apoptosis in hippocampal neurons by a mechanism involving caspase activation, calcium overload and oxidative stress. *Exp Neurobiol* 1998; **154**: 276-88.
- Laporte JR, Tognoni G. Principios de epidemiologia del medicamento. 2da Edicion 1993:102-22.
- Laurent-Crawford AG, Krust B, Muller S. The cytopathic effect of HIV is associated with apoptosis. *Virology* 1991; **185**: 829-39.
- Lee R, Beauparlant P, Elford H, Ponka P, Hiscott J. Selective inhibition of I kappa alpha phosphorylation and HIV-1 LTR-directed gene expression by novel antioxidants compounds. *Virology* 1997; **234**: 277-90.
- Look MP, Rockstroh JK, Rao GS, Barton S, Lemonch H, Kaiser R, Kupfer B, Sudhop T, Spengler U, Sauerbruch T. Sodium selenite and N acetylcysteine in antiretroviral naïve HIV-1 infected patients: a randomized, controlled pilot study. *Eur J Clin Invest* 1998; **28**: 389-97.

- Look MP, Rockstroh JK, Rao GS, Kreuzer KA, Barton S, Lemoch H, Sudhop T, Hoch J, Stockinger K, Spengler U, Sauerbruch T. Serum selenium, plasma glutathione (GSH) and erythrocyte glutathione peroxidase (GSH Px) levels in asymptomatic versus symptomatic human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) infection. *Eur J Clin Nutr* 1997; **51**: 266-72.
- Macallan DC. Metabolic abnormalities and wasting syndrome in HIV infection. *Proc Nutr Soc* 1998; **57**: 373-80.
- Macallan DC. Nutrition and immune function in HIV infection. *Proc Nutr Soc* 1999; **58**: 743-8.
- Mahalingam M, Pozniac A, McManus Tj, Vergani D, Peakman M. Cell cycling in HIV infection: analysis of *in vivo* activated lymphocytes. *Clin Exp Immunol* 1995; **102**: 481-6.
- Marmor M, Alcabes P, Titus S, Frenkel K, Krasinski K, Penn A, Pero RW. Low serum thiol levels predict shorter times to death among HIV infected injecting drug users. *AIDS* 1997; **11**: 1389-93.
- Marnett LJ, Burcham PC. Endogenous DNA adducts: Potential and paradox. *Chem Res Tox* 1993; **6**: 771-85.
- Masutani H. Oxidative stress response and signaling in hematological malignancies and HIV infection. *Int J Hematol* 2000; **71**: 25-32.
- Maxwell SRJ. Antioxidant therapy: does it have a role in the treatment of human disease. *Exp Opin Invest Drugs* 1997; **6**: 211-36.
- McCloskey TW, Oyaizu N, Kaplan M, Pahwa S. Expression of the Fas antigen in patients infected with human immunodeficiency virus. *Cytometry* 1995; **22**: 111-14.

- McLemore J L, Beeley P, Thorton K, Morriroe K, Blackwell W, Dasgupta A. Rapid automated determination of lipid hydroperoxide concentrations and total antioxidant status of serum samples from patients infected with HIV. *Am J Clin Pathol* 1998; **109**: 268-73.
- Mellors JW, Muñoz A, Giorgi JV. Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection *Ann Intern Med* 1997; **126**: 946-54.
- Mocchegiani E, Veccia S, Ancarani F, Scalise G, Fabris N. Benefit of oral zinc supplementation as an adjunct to zidovudine (AZT) therapy againts opportunistic infections in AIDS. *Inter J Immunopharmacol* 1995; **17**: 719-27.
- Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; **43**:109-43.
- Muller F, Svardal AM, Nordoy I, Berge R, Aukrust P, Froland SS. Virological and immunological effects of antioxidant treatment in patients with HIV infection. *Eur J Clin Invest* 2000; **30**: 905-14.
- Nagano F, Fridovich I. Does the aerobic xanthine oxidase reaction generate singlet oxygen? *Photochem Photobiol* 1985; **41**: 33-7.
- Nagata H, Takekoshi T, Takagi T, Honma T, Watanabe K. Antioxidative action of flavonoids, quercetin and catechin, mediated by activation of glutathione peroxidase. *Tokai J Ex Clin Med* 1999; **24**:1-11.
- Nakamura H, De Rosa S, Roderer M, Anderson MT, Dubs JG, Yodoi J, Holmgren A, Herzenberg LA, Herzenberg LA. Elevation of plasma thioredoxin levels in HIV-infected individuals. *Int Immunol* 1996; **8**): 603-11.
- Nakayama T, Yamada M, Osawa T, Kawakishi S. Suppression of active oxygen-induced

- cytotoxicity by flavonoids. *Biochem Pharmacol* 1993; **45**:265-7.
- Négre-Salvayre A, Salvayre R. Quercetin prevents the cytotoxicity of oxidized LDL on lymphoid cell lines. *Free Radic Biol Med* 1992; **12**: 101-6.
- Nicolini A, Ajmone-Cat MA, Bernardo A, Levi G, Minghetti L. Human immunodeficiency virus type-1 tat protein induced nuclear factor (NF)- κ B activation and oxidative in microglial cultures by independent mechanisms. *J Neurochem* 2001, **79**:713-6.
- Nishikimi M. Oxidation of ascorbic acid with superoxide anion generated by xanthine-xanthine oxidase system. *Biochem Biophys Res* 1975; **63**: 463-8.
- Okamoto T, Sakurada S, Yang JP, Merin JP. Regulation of NF-kappa B and disease control: identification of a novel serine kinase and thioredoxin as effectors for signal transduction pathway for NF-kappa B activation. *Curr Top Cell Regul* 1997; **35**: 149-61.
- Omene JA, Cordus RE, Glew RH, Prosper M and Ledlie S. *J Natl Med Assoc* 1996; **88**: 789-93
- Olson AJ. Benefits and liabilities of vitamin A and carotenoids. *J Nutr* 1996; **126**: 12085-125.
- Olson AJ. Vitamin A and carotenoids as antioxidants in a physiological context. *J Nutr Sci Vitaminol* 1993; **39**:557-65.
- Opalenik SR, Ding Q, Mallery SR, Thompson JA. Glutathione depletion associated with the HIV-1 Tat protein mediates the extracellular appearance of acidic fibroblast growth factor. *Arch Biochem Biophys* 1998; **351**): 17-26.
- Orrenius S, Mc Cabe MJ, Nicotera P. Ca²⁺-dependent mechanism of cytotoxicity and programmed cell death. *Toxicol Lett* 1992; (64-65): 357-64.
- Orrenius S, McConKey DJ, Bellomo G. Role of Ca²⁺ in toxic cell killing. *Trends*

- Pharmacol Sci* 1989; **10**: 281-5.
- Ozdemirler G, Mehmetcik G, Oztezcan S, Toker G, Sivas A, Uysal M. Peroxidation potential and antioxidant activity of serum in patients with diabetes mellitus and myocard infarction. *Metab Res* 1995; **271**: 194-6.
- Pace GW, Leaf CD. The role of oxidative stress in HIV disease. *Free Radical Biol Med* 1995; **19** :523-8.
- Pérez, G. and Sánchez, G. M. Flavonoids as natural antioxidants, *Acta Farm Bonaerense* 2001; **20**: 297-306.
- Peterhans E. Oxidants and antioxidants in viral diseases: disease mechanisms and metabolic regulation. *J Nutr* 1997b; **127**:962s-5s.
- Peterhans E. Reactive oxygen species and nitric oxide in viral diseases. *Bio Trace Elem Res* 1997a; **56**: 107-16.
- Piedimonte G, Guetard D, Magnani M, Corsi D, Picerno I, Spataro P, Kramer L, Montroni M, Silvestri G, Torres JF, Montagnier L. Oxidative protein damage and degradation in lymphocytes from patients infected with human immunodeficiency virus. *J Inf Dis* 1997; **176**: 655-64.
- Prakash O, Teng S, Ali M, Zhu X, Coleman R, Dabdoub RA, Chambers R, Yee T, Flores SC, Joshi BH. The HIV-1 Tat protein potentiates Zidovudine-induced cellular toxicity in transgenic mice. *Arch Biochem Biophys* 1997; **343**: 173-80.
- Premanathan M, Nakashima H, Igarashi R, Mizushima Y, Yamada K. Lecithinized superoxide dismutase: an inhibitor of human immunodeficiency virus replication. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1997; **13**: 283-90.
- Prior RL, Cao G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Rad Biol Med* 1999; **27**: 1173-81.

- Pujol R, Domingo P, Guiu XM, Francia E, Snabeat MA, Alomar A, Vazquez G. HIV-1 protease inhibitor associated partial lipodystrophy: clinicopathologic review of 14 cases. *J Am Acad Dermatol* 2000; **42**: 193-8.
- Rabaud Ch, Tronel H, Fremont S, May T, Canton P, Nicolas JP. Radicaux libres et infection par le VIH. *Ann Biol Clin* 1997, **55**:565-71.
- Radi R, Beckman JS, Bush KKM, Freeman BA. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem* 1990; **266**: 4 244-50.
- Radrizzani M, Accornero P, Delia D, Kurrle R, Colombo MP. Apoptosis induced by HIV-gp120 in a Th1 clone involves the generation of reactive oxygen intermediates downstream CD95 triggering. *FEBS-Lett* 1997; **411**: 87-92.
- RANDOX Radicales Libres. Ed. Randox Laboratories Ltd. 1996; Crumlin, UK 1-16.
- Ray SD, Kamendulis M, Gurule WM, Yorki DR, Corcoran BG Ca^{2+} antagonist inhibit DNA fragmentation and toxic cell death induced by acetaminophen. *FASEB J* 1992; **156**:453-63.
- Reid TM, Loeb LA. Effect of DNA repair enzymes on mutagenesis by oxygen free radicals. *Mut Res* 1993; **289**: 181-6.
- Repetto M, Reides C, Gómez ML, Costa M, Griemberg G, Llesuy S. Oxidative stress in blood of HIV patients. *Clin Chim Acta* 1996; **255**:107-17.
- Roberts RL, Aroda VR, Ank BJ. N-acetylcysteine enhances anti-body-dependent cellular cytotoxicity in neutrophils and mononuclear cells from healthy adults and human immunodeficiency virus-infected patients. *J Infect Dis* 1995; **172**:1492-502.
- Roederer M, Staal FJT, Raju PA, Ela SW, Herzenberg LA, Herzenberg L. Cytokine-stimulated human immunodeficiency virus replication is inhibited by N-acetyl-L-cysteine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; **87**:4884-8.

- Romay C, Pascual C, Lissi EA. The reaction between ABTS radical cation and antioxidants and its use to evaluate the antioxidant status of serum samples. *Braz J Med Biol Res* 1996; **29**: 175-83.
- Romero-Avila D, Roche E. The keys of oxidative stress in acquired immune deficiency syndrome apoptosis. *Med Hyp* 1998; **51**: 169-73.
- Sahnoun Z, Jamoussi K, Zeghal KM. Free radicals and antioxidants: human physiology, pathology and therapeutics aspects. *Therapie* 1997; **52**: 251-70.
- Sánchez GM, Candelario-Jalil E, Giuliani A, León OS, Sam SR, Delgado R, Núñez-Sellés AJ. *Mangifera indica* L. extract (**Vimang**[®]) reduces ischemia-induced neuronal loss and oxidative damage in the gerbil brain. *Free Rad Res* 2001a; **35**: 465-73.
- Sánchez GM, Delgado R, Pérez GD, Garrido G, Núñez-Sellés AJ, León OS. Evaluation of the *in vitro* antioxidant activity of *Mangifera indica* L. extract (QF808). *Phytother Res* 2000; **15**:1-4.
- Sánchez GM, Giuliani A, León OS, Pérez-Davison GD, Núñez-Sellés AJ. Effect of *Mangifera indica* L. Extract (**Vimang**[®]) on protein and hepatic microsomes peroxidation. *Phytother Res* 2001b; **15**:581-5.
- Sánchez GM, Re L, Giuliani A, Núñez-Sellés AJ, Pérez-Davison G, León OS. Protective effect of *Mangifera indica* L. extract, mangiferin and selected antioxidants against TPA-induced biomolecules oxidation and peritoneal macrophage activation in mice. *Pharmacol Res* 2000; **42**:555-73;.
- Sánchez GM, Rodríguez M, Núñez-Sellés AJ, Pons N, Giuliani A, León OS. Protective effect of *Mangifera indica* L extract on the injury associated with hepatic ischemia reperfusion. *Phytotherapy Res* 2003; **17**:197-201.

- Scherer NM, Deamer DW. Oxidative stress impairs the function of sarcoplasmic reticulum by oxidation of sulfhydryl group in the Ca²⁺ ATPase. *Arch Biochem Biophys* 1986; **246**: 589-601.
- Schoonbroodt S, Legrand Poels S, Best Belpomme M, Piette J. Activation of the NF-kappa B transcription factor in a T-lymphocytic cell line by hypochlorous acid. *Biochem J* 1997; **131** : 777-85
- Schreck R, Rieber P and Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kB transcription factor and HIV-1. *EMBO J* 1991; **10**: 2247-58.
- Schweizer M, Peterhans E. Metabolic regulation and autotoxicity in viral disease. In pharmacology of HIV and AIDS. Ed. Dietmar Fuchs. OICA International, Saint Lucia and London 2000.
- Seddon JM. Dietary carotenoids, vitamins A, C and E advanced age related macular degeneration. *JAMA* 1994; **272**: 1413-20.
- Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total protein bound and non protein sulfhydryl group in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 1968; **25**:192-205.
- Semba RD and Tang AM. Micronutrients and the pathogenesis of human immunodeficiency virus infection *British J Nut* 1999; **81**: 181-9.
- Semba RD, Graham NMH, Caiaffa WT, Margolick J, Clement L and Vlahov D. Increased mortality associated with vitamin A deficiency during human immunodeficiency virus type 1 infection. *Arch Internal Med* 1993; **153**: 2149-54.
- Semba RD, Miotti P, Chiphangwi JD, Saah A, Canner J, Dallabetta G and Hoover DR *Lancet* 1994; **343**: 1593-7

- Sepkowitz KA. Effects of HAART on natural history of AIDS-related opportunistic disorder. *Lancet* 1998; **351**:228-30.
- Seve M, Favier A, Osman M, Hernandez D, Vaitaitis G, Flores NC, McCord JM, Flores SC. The HIV-1 Tat protein increases cell proliferation, alters sensitivity to zinc chelator-induced apoptosis, and change Sp1 DNA binding in HeLa cells. *Arch Biochem Biophys* 1999; **361**:165-72.
- Shatrov VA, Boelaert JR, Chouaib S, Droge W, Lehmann V. Iron chelation decreases human immunodeficiency virus-1 Tat potentiated tumor necrosis factor-induced NF-kappa B activation in Jurkat cells. *Eur Cytokine Netw* 1997 ; **8**: 37-43.
- Shi B, Raina J, Lorenzo A, Busciglio J, Gabuzda D. Neuronal apoptosis induced by HIV-1 Tat protein and TNF-alpha: potentiation of neurotoxicity mediated by oxidative stress and implications for HIV-1 dementia. *J Neurovirol* 1998 ; **4**: 281-90.
- Siems W, Pimenov A, Esterbauer H, Grune T. Metabolism of 4- hydroxynonenal, a cytotoxic lipid peroxidation product, in thymocytes as an effective secondary antioxidative defense mechanism. *J Biochem* 1998; **123**: 534-9.
- Singh K. Oxidants, antioxidants and diseases. *Indian J Med Sci* 1997 ; **51**: 226-30.
- Skurnick J.H., Bogden J.D., Baker H., Kemp F.W., Sheffet A, Quattrone G. and Louria D.B. Micronutrients profiles in HIV-1 infected heterosexual adults. *J Acqui. Immune Defic Syndr Hum Retrov* 1996, **12**: 75-83.
- Sloand EM, Young NS, Kumar P, Weichold FF, Sato T, Maciejewski JP. Role of Fas ligand and receptor in the mechanism of T-cell depletion in acquired immunodeficiency syndrome: Effect on CD4+ lymphocyte depletion and human immunodeficiency virus replication. *Blood* 1997; **89**: 1357-63.

- Sonnerborg A, Carlin G, Akerlund B, Jarstrand C. Increased production of malondialdehyde in patients with HIV infection. *Scand J Infect Dis* 1988; **20**:287-90.
- Southorn PA, Powis G. Free radicals in medicine I. Chemical nature and biologic reactions. *Clinic Proc* 1988; **63**: 381-9.
- Stamler JS, Singel AJ, Loscalzo J. Biochemistry of NO and its redox-activated forms. *Science* 1992; **258**: 1 898-902.
- Strack PR, Frey MW, Rizzo CJ, Cordova B, George HJ, Meade R, Ho SP, Corman J, Tritch R, Korant BD. Apoptosis mediated by HIV protease is preceded by cleavage of bcl-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 ; **93**: 9571-6.
- Suttman U, Ockenga J, Selberg O, Hoogestraat L, Deicher H and Muller MJ. Incidence and prognostic value of malnutrition and wasting in Human Immunodeficiency virus-infected outpatients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1995; **8**:239-46.
- Tang A.M., Graham N.M.H., Kirby A.J., McCall L.D., Willet W.C. and Saah A.J. Dietary micronutrient intake and risk of progression to Acquired Immunodeficiency syndrome (AIDS) in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected homosexual men. *Am. J. Epim.* 1997; **138**: 937-51.
- Teixeira A, Leu JC, Honderlick P, Trylesinski A and Zucman D. Variation in body weight and plasma viral load in HIV patients treated with tritherapy including a protease inhibitor. *Nutrition* 1997; **13**: 269 abstracts.
- Terai C, Kornbluth RS, Pauza CD, Richman DD, Carson DA. Apoptosis as a mechanism of cell death in culture T lymphoblasts acutely infected with HIV-1. *J Clin Invest* 1991; **87**: 1710-15.

- Tzavara V, Vlachoyiannopoulos PG, Kordossis T, Galaris D, Travlou A, Dafni U, Moutsopoulos HM. Evidence for non-adaptive immune response in HIV infection. *Eur J Clin Invest* 1997 ; **27**): 846-9.
- Ungemach FR. Pathobiochemical mechanisms of hepatocellular damage following lipid peroxidation. *Chem Phys Lipid* 1987; **45**: 171-205.
- Vigano A, Saresella M, Villa ML, Ferrante P, Clerici M. CD38+/ CD8+ T cells as a marker of poor response to therapy in HIV-infected individuals. *Chem Immunol* 2000; **75**:207-17.
- Vittecoq D, Escaut L and Monsuez JJ. Vascular complications associated with use of HIV protease inhibitors. *Lancet* 1998; **351**: 1959.
- Walmsley Sh, Louise MW, Maureen LH, Jack PV, Peter GW. Oxidative stress and thiol depletion in plasma and peripheral blood lymphocytes from HIV-infected patients: toxicological and pathological implications. *AIDS* 1997; **11**: 1689-97.
- Wang Y and Watson RR. Is vitamin E supplementation a useful agent in AIDS therapy? *Progress in Food and Nutrition Sciences* 1993, **17**:351-75.
- Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *New Eng J Med*. 1989; **320**:365-76.
- Westendorp MO, Frank R, Ochsenbauer C, Stricker K, Dhein J, Walczak H. Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120. *Nature* 1995; **375**: 497-500.
- Whally CA, Rankin AM, Houlst JRS, Jessup W, Leake DS. Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. *Biochem Pharmacol* 1990; **39**:1743-50.

Zwart LL, Meerman JHN, Commandeur JNM, Vermeulen NPE. Biomarkers of free radical damage. Applications in experimental animals and in humans. *Free Rad Biol Med* 1999; **26**: 202-26.

AUTOBIBLIOGRAFIA

Publicaciones que contienen los resultados que se presentan en la tesis:

Gil L, Martínez G, González I, Pérez J. Estrés oxidativo: Mecanismos generales involucrados y su relación con el virus de la inmunodeficiencia humana. *BIOQUIMIA* 1999, 24 (4): 85-93.

Gil L, Tarinas A, Martínez G, León OS. Terapia antioxidante en la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. *Acta Farmacéutica Bonaerense* 2002; 21(4):301-308.

Gil L, Martínez G, González I, Tarinas A, Alvarez A, Giuliani A, Molina R, Tápanes R, Pérez J, León OS. Contribution to characterization of oxidative stress in HIV/AIDS patients. *Journal of Pharmacological Research* 2003; 47:217-24.

Gil L, Martínez G, González I, Tarinas A, Alvarez A, Molina R, Robaina M, Tápanes R, Perez J, Nuñez A. Effects of **Vimang**[®] on oxidative stress and marker of disease progression in HIV/AIDS patients. *Journal of Free Radicals Research* 2002; 36 (9/suppl):107-9.

Gil L, Lewis L, Martínez G, Tarinas A, González I, Alvarez A, Fernández Y, González L, Tápanes R, León OS, Perez J. Effects of dietary micronutrients on oxidative stress indicators in HIV/AIDS patients enviado a *Journal of Human Nutrition and Dietetics*

Relacionadas con la investigación

Gil L, Gebru D, Martínez A, Tápanes R, Ramos F, Pérez J. Contribution to the determination of G1 chemotherapeutic drug in biological fluids. *J Chromatog B* 1997; 698: 312-16.

Tápanes R, **Gil L**, Pérez L, Díaz M, Pérez J. Evaluación del estrés oxidativo en un paciente con isquemia cerebral transitoria. *Rev Neurol* 2000; 31(1):98-99.

Tarinas A, **Gil L**, Caveda H, Tápanes RD, Hernández Y, Pérez Avila J. Farmacoepidemiología en pacientes VIH/SIDA cubanos tratados con antirretrovirales. *Rev Cub Farmacia* 2000; 34:48-9.

Gil L, González I, González Y, Tarinas A, Pérez L, Alvarez A, Luzardo C, Díaz S, Tápanes RD, Pérez Avila J. Estudio genotóxico en pacientes VIH/SIDA. *Rev Cub Farmacia* 2000; 34:509-11.

Gil L, Martínez G, González I, Tarinas A, Molina R, Alvarez A, Luzardo C, Ramos F, Tápanes R, Pérez J. El estrés oxidativo como cofactor de enfermedades relacionadas con retrovirus: VIH y HTLV-1. *Rev Cub Química* 2001;13: 47.

Gil L, Daumy Y, Pérez L, Alvarez A, Díaz H, Luzardo C, Ramos F, Tápanes R, Pérez J. Evaluación del estado redox y de algunos marcadores inmunológicos en individuos seropositivos al virus linfo-trópico de células T humanas tipo I. *BIOQUIMIA* 2002; 27(2): 26-31.

Gil L, Pérez J. Estrés oxidativo en la infección por el virus linfo-trópico de células T humanas tipo I. Acta Farmaceutica Bonaerense 2003; 22(3).

Presentación en (8) eventos, Internacionales (6), Nacionales (2)

Los resultados que se exponen en la tesis han sido presentados en los siguientes eventos:

1. III Simposio Internacional de Estrés oxidativo. 24-26 de Noviembre de 1999. Ciudad de La Habana. Cuba. Determinación de marcadores de estrés oxidativo en pacientes VIH/SIDA relacionados con el conteo absoluto de linfocitos T CD4+.
2. IV Conferencia Internacional sobre VIH/SIDA en Cuba, Centroamérica y el Caribe. Enero 2000 Ciudad de La Habana Cuba. Estudio del estado redox y genotóxico en PVVIH.
3. I Encuentro Interamericano de Farmacia y Nutrición. 25-27 de Junio 2001. Ciudad de La Habana Cuba. Evaluación del estrés oxidativo relacionado con las subpoblaciones linfoides CD4, CD38 y CD95 en pacientes VIH/SIDA.
4. IV Simposio de Estrés oxidativo. 16-18 de Julio 2001 Ciudad de La Habana. Cuba. Estrés oxidativo: implicaciones en la fisiopatología de la infección por VIH.
5. Free Radicals, Nitric oxide and Inflammation: Molecular, biochemical and clinical aspects. 23 Sept-3 Octubre. Antalya Turquía. El estrés oxidativo relacionado con los marcadores de progresión de la enfermedad y los índices nutricionales en pacientes VIH/SIDA.

6. X Exposición Forjadores del Futuro 2002 Ciudad de La Habana, Cuba.

Efecto de la suplementación con **VimangÒ** sobre marcadores de estrés oxidativo y de progresión de la enfermedad en pacientes VIH/SIDA.

7. VII Seminario Internacional de Atención primaria de la salud. 17-21 de Junio del 2002 Ciudad de La Habana, Cuba. Estudios preclínicos y clínicos de los efectos antioxidantes de un producto natural cubano (**VimangÒ**) (Mesa redonda).

8. XIV Conferencia Internacional sobre SIDA. 7-12 de Julio del 2002. Barcelona, España.

Efecto del incremento de micronutrientes dietarios en el estrés oxidativo en pacientes VIH/SIDA.

Evaluación del estrés oxidativo relacionado con las subpoblaciones linfoides CD4, CD38 y CD95 en pacientes VIH/SIDA del sistema sanatorial cubano.

Premios:

Premio UH 2002 en la Dirección de Salud Humana “Estudios preclínicos y clínicos de los efectos antioxidantes de un extracto de *Mangifera indica L* (**Vimang®**): Contribución al expediente de registro médico.

Premio Destacado Municipal y Provincial X Exposición Forjadores del Futuro 2002

Resultado Relevante del Consejo Científico General del IPK 2002

Premio Relevante XIV Forum de Ciencia y Técnica Provincial 2002

“Efecto de la suplementación con **Vimang®** sobre marcadores de estrés oxidativo y de progresión de la enfermedad en pacientes VIH/SIDA”.

ANEXOS

Anexo 3

CLASIFICACION DE LOS INDIVIDUOS CON VIH/SIDA SEGÚN CDC 1993

Categorías según conteo absoluto de linfocitos T CD4+	Categorías clínicas		
	A	B	C
1). ≥ 500 cel /mm ³	A1	B1	C1
2). 200-499 cel /mm ³	A2	B2	C2
3). < 200 cel /mm ³	A3	B3	C3

Categorías Clínicas

A

- Infección asintomática por VIH
- Infección primaria
- Linfadenopatía persistente generalizada (LPG)

B Sintomático (no condición A o C)

- Angiomatosis bacilar
- Candidiasis orofaríngea
- Candidiasis vulvovaginal: persistente por más de 1 mes o que responde pobremente al tratamiento.
- Displasia cervical severa o carcinoma *in situ*
- Enfermedad pélvica inflamatoria
- *Herpes zoster*: más de 2 episodios o más de 1 dermatoma
- Leucoplaquia vellosa oral
- Listeriosis
- Neuropatía periférica
- Púrpura idiopática trombocitopénica
- Síntomas constitucionales, como fiebre ($>38,5^{\circ}$) o diarrea por más de 1 mes.

C (Situaciones Clínicas Diagnósticas de SIDA)

- Candidiasis traqueal, bronquial o pulmonar
- Candidiasis esofágica.
- Carcinoma cervical invasivo
- Coccidiomicosis diseminada (en una localización diferente o además de los pulmones y los ganglios linfáticos cervicales o hiliares).

- Criptococosis extrapulmonar.
- Criptosporidiasis con diarreas de más de un mes
- Infección por Citomegalovirus, de un órgano diferente del hígado, bazo o ganglios linfáticos, en un paciente de edad, superior a un mes.
- Retinitis por Citomegalovirus.
- Encefalopatía por VIH.
- Infección por virus de *Herpes simplex* que cause una úlcera mucocutánea de más de un mes de evolución, o bronquitis, neumonitis o esofagitis de cualquier duración, que afecten a un paciente de más de 1 mes de edad.
- Histoplasmosis diseminada (en una localización diferente o además de los pulmones y los linfáticos cervicales o hiliares).
- Isosporidiasis crónica (>1 mes).
- Sarcoma de Kaposi.
- Linfoma de Burkitt o equivalente.
- Linfoma inmunoblástico o equivalente.
- Linfoma cerebral primario.
- Infección por *Mycobacterium avium-intracellulare* o *M. Kansasii* diseminada o extrapulmonar.
- TBC pulmonar.
- TBC extrapulmonar o diseminada
- Infección por otras micobacterias, diseminadas.
- Neumonía por *Pneumocystis carinii*.
- Neumonía recurrente.
- Leucoencefalopatía multifocal progresiva.
- Sepsis recurrente por especies de *Salmonella* diferentes de *S. typhi*.
- Toxoplasmosis cerebral en un paciente de más de 1 mes de edad.
- Síndrome de desgaste

Afecciones clínicas aceptadas por la OMS para Europa en 1993 incluyendo la clasificación de 1986 y 1987.

ANEXO 7

CONSENTIMIENTO INFORMADO

El **VimangÒ** es un suplemento nutricional desarrollado por el Centro de Química Farmacéutica, que cuenta con propiedades antiinflamatorias y analgésicas declaradas y una potente actividad antioxidante. Este suplemento puede ser administrado a personas con déficit nutricional y en aquellos en que la enfermedad diagnosticada este relacionada con el estado de estrés oxidativo. Los estudios etnofarmacológicos realizados al producto han demostrado su inocuidad y su efectividad en el tratamiento de diversas enfermedades con bases inflamatorias.

Con el objetivo de evaluar la efectividad de este suplemento en el tratamiento del paciente VIH/SIDA, se ha diseñado un ensayo clínico que incluye dos grupos de tratamiento (**VimangÒ** y Placebo) a los cuales usted podrá ser asignado de forma aleatoria. El tratamiento será administrado por vía oral y tendrá una duración de 6 meses.

Se me ha informado que seré incluido en el protocolo y deberé asistir a 7 consultas médicas planificadas para evaluar la sintomatología clínica y a 3 extracciones de sangre, una antes de comenzar el tratamiento que será considerada como el valor inicial y a los 21 y 180 días. Estas extracciones se realizarán con el fin de evaluar el efecto en la restauración de la capacidad antioxidante y la seguridad toxicológica, así como medir la repercusión del tratamiento en los marcadores de progresión de la enfermedad.

Igualmente se me ha informado que puedo aceptar o no, y una vez aceptado, puedo abandonar el tratamiento en cualquier momento sin que esto signifique problema alguno para continuar mi atención. La información obtenida será del conocimiento de los médicos e investigadores participantes en el ensayo y los datos personales de los pacientes no serán divulgados.

De acuerdo a las informaciones recibidas, se me ha solicitado el consentimiento de participación y se han respondido mis preguntas y aclaradas mis dudas, por tanto he aceptado mi inclusión y para que así conste firmo conjuntamente con los investigadores principales.

Nombre y Apellidos del Paciente:

Firma:

Investigadores Principales:

Firma:

Anexo 8. Encuestas nutricionales

Ante todo MUCHAS GRACIAS por haber aceptado prestar su apoyo a esta investigación. La siguiente encuesta tiene el objetivo de recoger el consumo total de alimentos consumidos por el paciente, en cada día señalado. Sólo Usted, mediante su importante cooperación y exactitud en sus anotaciones, nos permitirá conocer si el paciente es alimentado en forma adecuada para su estado de salud actual.

Para su completamiento, usted será instruido por el personal que llevará a cabo la investigación. Para comenzar bastará completar primeramente los datos que nos aportan una información general del paciente. En la segunda parte de la encuesta Usted deberá anotar la hora en que fueron consumidos el o los alimentos, que fue lo ingerido, así como la cantidad servida. Al finalizar debe anotar la cantidad aproximada que no ingirió.

Piense detenidamente antes de escribir sobre las cantidades de alimentos que le fueron servidos y los que no ingirió. Tenga presente que incluye lo consumido tanto en el comedor del sanatorio, como lo que consumió en la casa, le agradeceríamos que diera la información más precisa posible.

A continuación le sugerimos algunas ideas de como efectuar mediciones por apreciación para después remitirlo a la encuesta:

Usted dispondrá de las siguientes medidas:

Tamaños: G= Grande; M= Medio; C= Chico

Tipo: CU= Cucharón; E = Espumadera; CA = Cuchara; CP = Cucharita; V = Vaso; TC = Taza de café; T = Taza de café con leche.

En caso de no ajustarse la medida por favor usar la letra D = Diferente.

Siempre que ponga “D” tiene que anotar al dorso la medida que se usó ejemplo:

Frutabomba 1D = Frutabomba 1 tajada grande

Cerveza 3D = 3 botellas de cerveza

Cuando se refiera a alimentos líquidos, especifique la cantidad en vaso pequeño, mediano o grande.

En caso de cualquier tipo de carne, debe decir el tamaño aproximado de la ración (pequeño, mediano o grande) y el tipo de cocción (ejemplo: frito, asado, en salsa, picadillo, etc).

En caso de las aves debe anotar que parte del ave fue consumida (ejemplo: pechuga, muslo, etc.).

Si consume helado especifique si estaba derretido, semiderretido o congelado y por supuesto la cantidad.

Cuando lo consumido es lo ofrecido en el comedor del sanatorio, no especifique la cantidad servida, sólo lo que no es consumido. En caso de que sea comida elaborada en la casa u otro lugar, entonces añada de ser posible, los ingredientes de la receta en la parte III de la encuesta.

Seguidamente, le mostramos un ejemplo para que le sirva cuando vaya a llenar la encuesta.

HORA	ALIMENTOS	CANTIDAD SERVIDA	CANTIDAD DEJADA
8:10 am	Leche c/ chocolate Pan	1 V G (vaso grande) 1 M (1 unidad mediana)	2 dedos 1 cuarto
9:15 am	Refresco de fresa	1 V C (vaso chico)	-
12: 30 pm	Arroz(comedor) Frijoles (comedor) Ensalada de col (comedor) Mermelada de mango	- - - ¼ VG (1/4 vaso grande)	2 CA (2 cucharadas) 4 CA la mitad -
3:45 pm	Maní molido	Tamaño mediano	-
7:20 pm	Arroz c/ mortadella Sopa de pollo Boniato Pepino	3 E (3Espumaderas) 2 CU (2 cucharón) 1M (1 mediano) 4 CA (4 cucharadas)	la mitad - más de la mitad todo
10:15 pm	Leche	1 V M	3 dedos

Registro de Alimentos

Datos Generales:

Nombre y Apellidos: _____ edad: _____

sexo: _____ peso: _____ kg talla: _____ cm

código: _____ fecha: _____

se encontraba en el sanatorio si _____ no _____

II. CONSUMO DE ALIMENTOS:

HORA	ALIMENTOS	CANTIDAD SERVIDA	CANTIDAD DEJADA	GRAMOS*

*Para llenar por el encuestador

III. Descripción de las recetas utilizadas:

Receta 1

Nombre de la receta _____

Tamaño de la porción _____

Receta 2

Nombre de la receta _____

Tamaño de la porción _____

Ingredientes	Cantidad
1. _____	_____
2. _____	_____
3. _____	_____
4. _____	_____

Ingredientes	Cantidad
1. _____	_____
2. _____	_____
3. _____	_____
4. _____	_____

Anexo 9. ENCUESTA DE FRECUENCIA ALIMENTARIA (ESCALOGRAMA)

Señale la frecuencia con que ingirió los siguientes alimentos en los últimos 7 días (entre 0-21 veces a la semana).

Cereales: Arroz____ Pan____ Galletas____ Maíz____ Pizza____ Espaguetis____
otros____ ¿Cuáles?_____ veces_____

Tubérculos: papa____ yuca____ boniato____
malanga____ otros____ ¿Cuáles?____ veces_____

Leguminosas: frijoles
negros____ colorados____ chícharos____ otros____ ¿Cuáles?____ veces_____

Cárnicos: carne de res____ cerdo____ pollo____ pescado____ pic. Soya____ masa cárnica_____

Huevos: veces_____

Frutas:
mango____ guayaba____ melón____ piña____ frutabomba____ anón____ naranja____ chirimolla____
mamey____ otras ____ ¿Cuáles?_____ veces_____

Vegetales:
lechuga____ col____ zanahoria____ habichuela____ pepino____ calabaza____ tomate____
Otras ¿Cuáles?_____ veces_____

Dulces y postres: ¿Cuáles?_____ veces_____ ¿Cuáles?_____ veces_____

Jugos y refrescos: ¿Cuáles?_____ veces_____ ¿Cuáles?_____ veces_____

Bebidas: té____ café____ otra infusión____ ¿Cuáles?_____ veces_____

Alimentos fritos: ¿Cuáles?_____ veces_____

Otros alimentos: ¿Cuáles?_____ veces_____

Tipo de grasa que utiliza: manteca____ aceite_____

TABLAS

Tabla I. 1 Evidencias de daño oxidativo a biomoléculas y deficiencia de antioxidantes en pacientes VIH/SIDA.

Lugar	NPE	Criterios de evaluación *	Referencia
Grenoble, Francia	43	Glutación peroxidasa en plasma, malondialdehído en plasma, hidroperóxido en plasma	Favier <i>et al.</i> (1994)
Buenos Aires, Argentina	20	Capacidad antioxidante total en plasma, superoxido dismutasa en eritrocitos, glutación en plasma	Repetto <i>et al.</i> (1996)
Bonn, Alemania	102	Glutación peroxidasa en eritrocitos, glutación y selenio en suero	Look <i>et al.</i> (1997)
Stanford EEUU	204	Glutación en plasma	Herzenberg <i>et al.</i> (1997)
Texas, EEUU	14	Estado antioxidante total e hidroperóxidos en suero	McLemore <i>et al.</i> (1998)
Toronto, Canadá	29	Glutación en linfocitos, Cisteína en linfocitos	Walmsley <i>et al.</i> (1998)
Toronto, Canadá	49	Peróxidos lipídicos en plasma, Etano en el aire expirado	Allard <i>et al.</i> (1998a)

Leyenda: NPE: Número de pacientes estudiados

* Los valores medios de la concentración de los diferentes marcadores reportados en los individuos seropositivos a VIH son estadísticamente diferentes a los valores medios de concentración de estos indicadores analizados en individuos sanos según cada experimento ($p < 0,05$).

Tabla I. 2 Evidencias de deficiencia de micronutrientes en pacientes VIH/SIDA.

Lugar	Grupo de riesgo	NPE	Criterios de evaluación *	Referencia
New York, EEUU	Adultos heterosexuales	64	Vitamina A < 0,87 μM Vitamina E < 14 μM Zinc < 10,7 μM	Skurnick <i>et al.</i> (1996)
Baltimore/ Washington, EEUU	Hombres homosexuales	311	Vitamina A < 1,05 μM Vitamina E < 11,6 μM	Tang <i>et al.</i> (1997)
Miami, EEUU	Hombres homosexuales	100	Vitamina A < 1,05 μM Vitamina E < 5 μM Zinc < 11,5 μM	Beach <i>et al.</i> (1992)
Malawi	Mujeres embarazadas	338	Vitamina A < 1,05 μM	Semba <i>et al.</i> (1994)
New York, EEUU	Niños	24	β caroteno < 0,1 μM	Omene <i>et al.</i> (1996)
Kenya	Mujeres embarazadas	205	Vitamina A < 0,07 μM	Jonh <i>et al.</i> (1997)
Baltimore, EEUU	Personas que usan drogas inyectables	126	Vitamina A < 1,05 μM	Semba <i>et al.</i> (1993)

Leyenda:

NPE: Número de pacientes estudiados

* Determinaciones realizadas en suero o plasma

Valores de referencia normales según Skurnick *et al.* (1996):

Zn 10,7- 18,4 μM; β-carotenos 1,5-5,6 μM

Vit. E 14-35 μM; Vit. A 0,87-2,62 μM

Tabla I.3. Evidencias de estudios controlados de intervención nutricional y suplementación antioxidante en pacientes VIH/SIDA.

Lugar	Grupo de riesgo	NPE	Intervención	Criterios de evaluación	Referencia
Durban, Sudáfrica	Niños	28	Vitamina A dosis diaria ajustada a la edad 6 meses	↓ diarrea	Coutsoudis <i>et al.</i> (1995)
Portland, EEUU	Adultos	72	β-caroteno 180 mg diarios 3 meses	Linfocitos T CD4+ (no cambio)	Coodley <i>et al.</i> (1996)
Korea	Adultos	16	Ginseng rojo coreano 5,4 g diarios durante 4 años	↑ linfocitos T CD4+ ↓ linfocitos T CD8+	Cho <i>et al.</i> (1997)
Bonn, Alemania	Adultos	24	Selenio 500 mg + N acetilcisteína 600 mg diarios por 6 meses	Tendencia al ↑ linfocitos T CD4+ Carga viral sin alteración	Look <i>et al.</i> (1998)
Cape Town, Sudáfrica	Niños	75	Vitamina A 60 mg 2 días	↑ linfocitos T CD4+ después de 1 mes	Hussey <i>et al.</i> (1998)
Dar Es Salaam	Mujeres embarazadas	1075	Multivitaminas + Vitamina A (1,5 mg)/ β-caroteno (30 mg), Vitamina A/ β-caroteno 6 meses	↓ mortalidad fetal y bajo peso en recién nacidos	Fawzi <i>et al.</i> (1998)
Toronto, Canadá	Adultos	49	Vitamina C (1g) y E (800 mg) diarias por 3 meses	↓ peroxidación lipídica ↓ carga viral	Allard <i>et al.</i> (1996)
Italia	Adultos	35	Sulfato de zinc 200 mg diarios 30 días	↓ morbilidad de la infección	Mocchegiani <i>et al.</i> (1995)
Stanford, EEUU	Adultos	246	N-acetilcisteína (2,3-8,8 mg) diarios 8 meses	↑ glutatión en sangre total ↑ supervivencia en dos años	Herzenberg <i>et al.</i> (1997)
Stanford, EEUU	Adultos	81	N-acetilcisteína (8,0 mg) diarios por 8 semanas	↑ glutatión en sangre total	De Rosa <i>et al.</i> (2000)

NPE: Número de Pacientes Estudiados

Tabla III.1 Características y porcentajes de CD4⁺ y CD8⁺ en grupo control y VIH+ estratificados según clasificación CDC 1993.

Grupo	n	Edad (años)	Sexo		CD4+ (%)	CD8 + (%)
			F	M	Media (Intervalos)	Media (Intervalos)
VIH ⁻	40	25-45	18	22	41 (37-45) ^a	30 (26-34) ^a
VIH ⁺	85	25-47	36	49	15 (9-21) ^b	58 (46-70) ^b
VIH+A2B2	46	20-45	20	26	17 (11-17) ^b	53 (37-69) ^b
VIH+A3B3	39	26-47	18	21	9 (5-13) ^c	61 (49-73) ^c

Leyenda:

VIH- individuos seronegativos al VIH (grupo control)

VIH+ individuos seropositivos al VIH

VIH+ fueron divididos en dos grupos A2B2 o A3B3 según criterios CDC1993

La determinación del conteo relativo de las subpoblaciones linfoides CD4 y CD8 se realizó en un citometro de flujo empleando sangre total.

Valores con letras como superíndice diferente, indican diferencias significativas dentro de la misma serie ($p < 0,05$)

Tabla III. 2 Índices bioquímicos clínicos del grupo VIH total y estratificado.

Variables	Grupos			
	Referencia	VIH+	A2B2	A3B3
No de pacientes	-	85	46	39
Hemoglobina (g·L ⁻¹)	110-150	122 ± 20	126 ± 14	106 ± 10
Hematocrito (%)	37-50	40,5 ± 4,7	43,1 ± 4,3	40,1 ± 2,1
Eritrosedimentación (mm)	10-20	29,2 ± 5,0	25,8 ± 5,3	22,8 ± 3,0
Leucocitos (U·10 ³ ·mm ⁻³)	4 - 10	5-8	5-6	5-7
Polimorfonucleares (%)	40 - 74	48-50	42-45	40-42
Linfocitos (%)	19 - 48	50-55	51-56	42-45
Monocitos (%)	6	2-3	1-2	1-2
Eosinófilos (%)	4	3-4	2-3	3,-4
Plaquetas (U·10 ³ ·mm ⁻³)	280	218 ± 11	206 ± 9	189 ± 12
ALT (U·L ⁻¹)	40	31,3 ± 5,3	24,2 ± 6,5	21,7 ± 3,8
Acido úrico (µM)	142-416	331 ± 15	325 ± 17	325 ± 17
Creatinina (µM·L ⁻¹)	44-106	81,3 ± 3,7	84,9 ± 4,3	80,6 ± 3,1
Proteínas totales (g·dL ⁻¹)	6,6-8,7	8,96 ± 2,71	9,4 ± 1,06	8,34 ± 2,11
Albúmina (g·dL ⁻¹)	3,5-5	4,67 ± 0,43	4,51 ± 0,54	4,05 ± 0,72

Leyenda:

VIH+ individuos seropositivos al VIH

ALT: Alanina amino transferasa

Las determinaciones de hemoglobina, leucograma con diferencial, hematocrito, el conteo de plaquetas y eritrosedimentación se realizaron en sangre total y las determinaciones de ALAT, creatinina, ácido úrico, albúmina y proteínas totales se realizaron en suero.

Nota:

A2B2 y A3B3 subgrupos de PVVIH según clasificación del CDC 1993.

Los valores se representan como la media ± la desviación estándar (DE)

No se detectaron diferencias significativas (p>0,05) en la comparación de los valores entre el grupo A2B2 y A3B3.

Tabla III. 3 Coeficientes de correlación entre los índices del estado redox y los marcadores inmunológicos en un grupo de PVVIH.

Marcadores inmunológicos / Índices redox	CD4⁺	CD95	CD8⁺
MDA*	-0,90	+0,89	+0,73
SOD*	-0,81	+0,72	+0,67
PP*	-0,79	+0,71	+0,64
TAS*	+0,86	-0,80	-0,74
GSH	+0,21	-0,32	-0,19
GPx	+0,26	-0,29	-0,15
OT	-0,33	+0,51	+0,46
% F ADN	-0,71	+0,42	+0,38

Leyenda:

Los valores representan el coeficiente de correlación de Pearson.

El asterisco (*) representa correlación significativa ($p < 0,05$)

TAS: Estado Antioxidante Total; GPx: Glutación Peroxidasa; SOD: Superóxido Dismutasa; OT: Organoperóxidos Totales; MDA: Malonildialdehído; GSH: Glutación Reducido; % F ADN: Porcentaje de Fragmentación del ADN.

La evaluación de TAS, PP, MDA, GSH y OT se realizó en suero, la evaluación de la actividad enzimática de SOD y GPx en eritrocitos y el % F ADN se determinó en linfocitos.

El conteo de linfocitos T CD4+, de CD8/CD38 y CD95 se realizó en sangre total empleando un citómetro de flujo.

Tabla III. 4 Ingesta dietaria y características antropométricas en individuos

VIH/SIDA.

Variables	Grupos		
	VIH+	A2B2	A3B3
No de pacientes	85	46	39
Energía (kcal·d ⁻¹)	2883 ± 250,6	2730 ± 311,4 [2680]	2895 ± 412,5 [3450]
Proteínas (g· d ⁻¹)	94, 60 ± 11,7	91,72 ± 10,26 [100]	97,14 ± 11,3 [130]
Lípidos (g· d ⁻¹)	93,27 ± 21,4	96,36 ± 19,24 [66]	93,20 ± 26,62 [77]
Carbohidratos (g· d ⁻¹)	421,5 ± 51,8	390, 2 ± 43,6 [435]	433,2 ± 48,1 [560]
Frutas y vegetales (g· d ⁻¹)	222,6 ± 91,5	218,1 ± 86,2	226,2 ± 90,4
Vitamina A (µg)	789,4 ± 330,1	790,3 ± 314,1 [1950]	781,5 ± 303,7 [2000]
Vitamina C (mg)	70,5 ± 29,3	69,8 ± 27,2 [250]	80,2 ± 30,6 [500]
Vitamina E (mg)	7,87 ± 1,29	7,72 ± 1,40 [100]	8,01 ± 2,11 [150]
Talla (cm)	164,2 ± 18,1	183,6 ± 10,2	160,4 ± 12,5
Peso corporal (kg)	67,3 ± 5,18	68,07 ± 3,41	65,4 ± 4,22
Indice de masa corporal (kg·m ²)	24,81 ± 3,25	24,33 ± 3,60	25,35 ± 4,98

Leyenda:

VIH+ individuos seropositivos al VIH

A2B2 y A3B3 subgrupos de PVVIH según clasificación del CDC 1993.

Los índices nutricionales de ingesta fueron obtenidos del procesamiento de encuestas aplicadas durante 7 días en el sistema CERES, versión 5, 1997.

Nota: Los valores entre [] representan los requerimientos para los grupos según Baum *et al.* 1992.

Tabla III.5 Índices clínicos en el grupo VIH+ al inicio y a los 3 meses del estudio de intervención dietética con incremento en la oferta de alimentos ricos en micronutrientes antioxidantes.

Indicador	Tiempo (meses)	n	Media ± DE	p
Hemoglobina (g·L ⁻¹)	0	40	128 ± 14,5	0,41
	3	36	132 ± 14,1	
Hematocrito (%)	0	40	42,3 ± 4,36	0,35
	3	36	45,0 ± 4,50	
Eritrosedimentación (mm)	0	40	25,9 ± 9,35	0,12
	3	36	18,2 ± 12,4	
Leucocitos (U·10 ³ ·mm ⁻³)	0	40	5-6	0,51
	3	36	5-7	
Polimorfonucleares (%)	0	40	44-55	0,66
	3	36	44-57	
Linfocitos (%)	0	40	51-67	0,37
	3	36	48-65	
Monocitos (%)	0	40	1-2	0,62
	3	36	2-3	
Eosinófilos (%)	0	40	2-3	0,32
	3	36	4-5	
Plaquetas (U·10 ³ ·mm ⁻³)	0	40	210 ± 52,2	0,16
	3	36	223 ± 61,5	
ALT (U·L ⁻¹)	0	40	24,3 ± 3,52	0,25
	3	36	28,7 ± 4,82	
Acido úrico (μM)	0	40	325 ± 18,7	0,09
	3	36	304 ± 21,3	
Creatinina (μM·L ⁻¹)	0	40	84,9 ± 8,61	0,24
	3	36	81,5 ± 7,42	
Proteínas totales (g·dL ⁻¹)	0	40	8,74 ± 2,05	0,46
	3	36	8,43 ± 1,58	
Albúmina (g·dL ⁻¹)	0	40	4,65 ± 0,45	0,53
	3	36	4,88 ± 0,37	

Leyenda:

Los valores se representan como media ± la desviación estándar (DE)

n: número de sujetos analizados

ALT: Alanina amino transferasa

Las determinaciones de hemoglobina, leucograma con diferencial, hematocrito, el conteo de plaquetas y eritrosedimentación se realizaron en sangre total y las determinaciones de ALAT, creatinina, ácido úrico, albúmina y proteínas totales se realizaron en suero.

p: probabilidad resultante de la comparación de cada indicador a tiempo 0 con respecto a su variación a los 3 meses.

Tabla III.6 Indicadores del estado redox celular en grupo control, y en el grupo VIH+ al inicio y a los tres meses del estudio de intervención dietética con incremento en la oferta de alimentos ricos en micronutrientes antioxidantes

Indicador	Tiempo (meses)	n	Media ± DE
TAS (mM Trolox)	control	40	1,693 ± 0,204 ^a
	0	40	0,834 ± 0,188 ^b
	3	35	1,038 ± 0,110 ^c
GPx (U·gHb)	control	40	39,32 ± 5,581 ^a
	0	40	20,40 ± 4,372 ^b
	3	36	28,63 ± 4,357 ^c
SOD (U·gHb)	control	40	1,120 ± 0,050 ^a
	0	40	1,585 ± 0,194 ^b
	3	36	1,368 ± 0,391 ^c
OT (μM)	control	40	249,9 ± 56,98 ^a
	0	40	542,4 ± 277,5 ^b
	3	36	401,9 ± 273,9 ^b
MDA (μM)	control	40	1,740 ± 0,050 ^a
	0	40	2,989 ± 1,424 ^b
	3	35	2,024 ± 1,004 ^b
GSH (mg·L ⁻¹)	control	40	757,5 ± 142,2 ^a
	0	40	120,9 ± 74,01 ^b
	3	36	321,2 ± 169,7 ^c
%F ADN (%)	control	40	6,300 ± 0,104 ^a
	0	40	7,196 ± 1,161 ^b
	3	36	7,296 ± 1,894 ^b

Leyenda:

Grupo control individuos seronegativos al VIH

Nota: Los valores de cada indicador al tiempo 0 y 3 meses son en individuos seropositivos al VIH

TAS: Estado Antioxidante Total, GPx: Glutación Peroxidasa, SOD: Superóxido Dismutasa, OT: organoperóxidos totales, MDA: Malonildialdehído, GSH: Glutación reducido, % F ADN: Porcentaje de Fragmentación del ADN.

La evaluación de TAS, PP, MDA, GSH y OT se realizó en suero, la evaluación de la actividad enzimática de SOD y GPx en eritrocitos y el % F ADN se determinó en linfocitos.

Diferentes letras como superíndice indican diferencia significativa ($p < 0,05$) comparando los valores del grupo control con el grupo VIH+ en cada medición.

Tabla III.7 Análisis global considerando cambios simultáneos en las variables redox y nutricionales a los 3 meses del estudio de intervención nutricional con incremento en la oferta de alimentos ricos en micronutrientes antioxidantes.

	Evaluación global		Total
	Fracaso ^a	Éxito ^b	
N1 (%)	11 (32)	25 (68)	36 (100)
N2 (%)	15 (42)	21 (56)	36 (100)

Leyenda:

a Fracaso en el efecto de la ingesta dietaria en el tiempo 0 y a los 3 meses.

b Éxito en el efecto de la ingesta dietaria en el tiempo 0 y a los 3 meses.

N1 (%) Representa el número de pacientes que manifiestan variación de las variables TAS, vitaminas A, E, C y frutas y vegetales y el porcentaje del total.

N2 (%) Representa el número de pacientes que manifiestan variación de las variables TAS, GPx, GSH, vitaminas A, E, C y frutas y vegetales y el porcentaje del total.

Nota:

La evaluación de TAS, PP, MDA, GSH y OT se realizó en suero, la evaluación de la actividad enzimática de SOD y GPx en eritrocitos y el % F ADN se determinó en linfocitos.

Los índices nutricionales de ingesta de vitaminas, frutas y vegetales fueron obtenidos del procesamiento de encuestas aplicadas durante 7 días en el sistema CERES, versión 5, 1997.

La magnitud de la diferencia Éxito / Fracaso para N1 fue: 36,0% con $p = 0,025$, el intervalo del valor de este indicador a un 95% de confianza fue de (24,8 – 48,2%) en favor del incremento de la ingesta de micronutrientes.

La magnitud de la diferencia Éxito / Fracaso para N2 fue: 14,0% con $p = 0,042$, el intervalo del valor de este indicador a un 95% de confianza fue de (7,7 – 20,3%) en favor del incremento de la ingesta de micronutrientes.

Tabla III. 8 Ingesta dietaria y características antropométricas en individuos VIH+ al inicio y a los 3 meses del estudio de intervención dietética.

Indicador	Tiempo (meses)	n	Media \pm DE	p
Energía (kcal· d ⁻¹)	0	40	2662 \pm 656,5	0,237
	3	36	2714 \pm 648,7	
Proteína (g· d ⁻¹)	0	40	92,10 \pm 10,14	0,279
	3	36	87,90 \pm 19,77	
Grasa (g· d ⁻¹)	0	40	94,31 \pm 12,97	0,538
	3	36	94,62 \pm 21,90	
Carbohidratos (g· d ⁻¹)	0	40	405,4 \pm 49,32	0,196
	3	36	365,3 \pm 109,4	
Vegetales y frutas (g· d ⁻¹)	0	40	210,7 \pm 110,4	0,0079
	3	36	373,97 \pm 138,6	
Vitamina A (μ g)	0	40	655,89 \pm 123,3	0,0027
	3	36	787,4 \pm 178,3	
Vitamina E (mg)	0	40	7,15 \pm 1,27	0,0057
	3	36	9,71 \pm 1,22	
Vitamina C (mg)	0	40	69,83 \pm 27,61	0,010
	3	36	115,5 \pm 39,3	
Peso Corporal (kg)	0	40	68,50 \pm 9,10	0,682
	3	36	70,60 \pm 8,56	
Talla (cm)	0	40	189,5 \pm 9,54	0,874
	3	36	190,7 \pm 9,37	
Indice de masa corporal (kg· m ⁻²)	0	40	19,07 \pm 3,23	0,478
	3	36	19,55 \pm 2,59	

Leyenda: n: número de sujetos analizados

Los índices nutricionales de ingesta fueron obtenidos del procesamiento de encuestas aplicadas durante 7 días en el sistema CERES, versión 5, 1997.

p: probabilidad resultante de la comparación de cada indicador a tiempo 0 con respecto a los 3 meses.

Los valores se representan como la media \pm la desviación estándar

Tabla III.9 Características de los pacientes, variables antropométricas e ingesta dietaria por grupos al inicio del tratamiento (tiempo 0).

Variables	Placebo	Vimang [®]
No de individuos	42	40
Edad (años) Media (\pm DE)	33,8 \pm 6,4	32,1 \pm 7,5
Conteo de CD4 Media (\pm DE)	16,0 \pm 4,6	15,0 \pm 3,7
Con SIDA	6	8
Índice de masa corporal Media (\pm DE)	24,55 \pm 3,87	22,97 \pm 3,15
Ingesta dietaria Media (\pm DE)		
Energía (kcal·d ⁻¹)	2862 \pm 256	2945 \pm 277
Proteínas (g·d ⁻¹)	92,1 \pm 10,14	94,01 \pm 9,76
Lípidos (g·d ⁻¹)	94,31 \pm 12,97	96,67 \pm 11,54
Carbohidratos (g·d ⁻¹)	405,4 \pm 49,3	418,7 \pm 49,9

Nota:

El conteo de linfocitos T CD4+ se realizó en sangre total empleando un citómetro de flujo.

Los índices nutricionales de ingesta fueron obtenidos del procesamiento de encuestas aplicadas durante 7 días en el sistema CERES, versión 5, 1997

No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) para cada una de las variables relacionadas cuando se compararon los grupos Placebo y Vimang[®].

Al final del estudio de seis meses estas variables no cambiaron significativamente ($p > 0,05$)

Tabla III.10 Índices clínicos en los grupos Placebo y Vimang[®] durante el período de suplementación con Vimang[®] (6 meses)

Variables	Placebo		Vimang [®]	
	Inicio	6 meses	Inicio	6 meses
No de pacientes	40	32	42	36
Hemoglobina (g·L ⁻¹)	126 ± 14	131 ± 12	122 ± 13	128 ± 11
Hematocrito (%)	43-47	42,8 ± 4,1	40,5 ± 4,7	41,26 ± 4,0
Eritrosedimentación (mm)	25-30	30-34	29-35	33-37
Leucocitos (U·10 ³ ·mm ⁻³)	5-6	5-8	5-8	6-8
Polimorfonucleares (%)	42-46	44-47	48-50	45-48
Linfocitos (%)	51-57	52-56	50-55	51-55
Monocitos (%)	1-2	2-3	2-3	2-3
Eosinófilos (%)	3-4	3-4	3-4	3-4
Plaquetas (U·10 ³ ·mm ⁻³)	206 ± 9	178 ± 10	218 ± 9	194 ± 10
ALT (U·L ⁻¹)	24,2 ± 6,5	30,5 ± 4,5	31,3 ± 5,3	29,6 ± 5,6
Acido úrico (μM)	325 ± 17	330 ± 17	331 ± 15	321 ± 20
Creatinina (μM·L ⁻¹)	84,9 ± 4,3	78,5 ± 5,6	81,3 ± 3,7	78,9 ± 4,2
Proteínas totales (g·dL ⁻¹)	8,74 ± 1,06	8,00 ± 0,84	8,96 ± 2,71	8,41 ± 1,39
Albúmina (g·dL ⁻¹)	4,65 ± 0,54	4,60 ± 0,48	4,67 ± 0,43	4,73 ± 0,44

Leyenda:

Los datos se representan como media ± la desviación estándar (DE)

ALT: Alanina amino transferasa

Las determinaciones de hemoglobina, leucograma con diferencial, hematocrito, el conteo de plaquetas y eritrosedimentación se realizaron en sangre total y las determinaciones de ALAT, creatinina, ácido úrico, albúmina y proteínas totales se realizaron en suero.

No se detectaron diferencias significativas en la comparación de los valores entre el grupo Placebo y Vimang[®] ni al inicio ni a los 6 meses del estudio.

Tabla III.11 Indicadores de estrés oxidativo en los grupos Placebo y Vimang[®] durante el período de estudio.

Variables	Placebo		Vimang [®]	
	Inicio	6 meses	Inicio	meses
No de pacientes	40	32	42	36
TAS (mM Trolox)	0,792 ± 0,155 [1,693 ± 0,204]	1,051 ± 0,172 [1,693 ± 0,204]	0,776 ± 0,161 [1,693 ± 0,204]	1,352 ± 0,140 *** [1,693 ± 0,204]
PP (µM)	13,81 ± 3,12 [7,12 ± 2,51]	13,95 ± 2,16 [7,12 ± 2,51]	14,60 ± 3,22 [7,12 ± 2,51]	11,56 ± 1,85 ** [7,12 ± 2,51]
OT (µM)	586,5 ± 207,4 [249 ± 56,98]	715,3 ± 217,7 [249 ± 56,98]	600,9 ± 190,6 [249 ± 56,98]	391,9 ± 93,8 ** [249 ± 56,98]
MDA (µM)	2,27 ± 1,70 [1,740 ± 0,50]	3,27 ± 0,76 [1,740 ± 0,50]	3,09 ± 1,62 * [1,740 ± 0,50]	2,22 ± 0,71 ** [1,740 ± 0,50]
SOD (U· mL ⁻¹)	1,338 ± 0,419 [1,120 ± 0,55]	1,589 ± 0,228 [1,120 ± 0,55]	1,476 ± 0,255 [1,120 ± 0,55]	1,286 ± 0,233 *** [1,120 ± 0,55]
GPx (U· mL ⁻¹)	21,15 ± 3,24 [39,32 ± 5,58]	21,22 ± 4,66 [39,32 ± 5,58]	21,41 ± 4,61 [39,32 ± 5,58]	26,44 ± 4,31 *** [39,32 ± 5,58]
GSH (mg· L ⁻¹)	160,9 ± 50,2 [757,5 ± 142,2]	196,6 ± 91,3 [757,5 ± 142,2]	207,4 ± 49,2 [757,5 ± 142,2]	344,6 ± 77,5 ** [757,5 ± 142,2]
% F ADN	7,4 ± 1,3 [6,3 ± 0,10]	7,6 ± 0,8 [6,3 ± 0,10]	7,4 ± 1,2 [6,3 ± 0,10]	6,4 ± 1,0 *** [6,3 ± 0,10]

Leyenda:

Los datos se representan como media ± la desviación estándar (DE)

* Representa diferencia significativa p<0,05 entre el grupo Placebo y Vimang[®] al inicio

No se detectaron diferencias significativas (p>0,05) en ninguno de los indicadores al comparar el grupo Placebo al inicio y a los 6 meses.

Se detectaron diferencias significativas (p<0,05) en todos los indicadores al comparar el grupo Vimang[®] al inicio y a los 6 meses.

** Representa diferencia significativa p<0,05 entre el grupo Placebo y Vimang[®] a los 6 meses

*** Representa diferencia significativa p<0,01 entre el grupo Placebo y Vimang[®] a los 6 meses

TAS: Estado Antioxidante Total, GPx: Glutación Peroxidasa, SOD: Superóxido Dismutasa, OT: Organoperóxidos totales, MDA: Malondialdehído; GSH: Glutación reducido, FDNA: Porcentaje de Fragmentación del ADN.

La evaluación de TAS, PP, MDA, GSH y OT se realizó en suero, la evaluación de la actividad enzimática de SOD y GPx en eritrocitos y el % F ADN se determinó en linfocitos.

Nota: entre corchetes [] se muestra el valor de referencia considerado como normal, obtenido de una población de individuos VIH-

Tabla III.12 Análisis global considerando cambios simultáneos en las variables redox en el estudio de suplementación con Vimang[®] en un período de 6 meses.

Grupo	Evaluación global		Total
	Fracaso ^a	Exito ^b	
Placebo N1 (%)	17 (51,9)	15 (48,1)	32 (100)
Vimang [®] N1 (%)	7 (18,2)	29 (81,8)	36 (100)
Total N1 (%)	24 (33,3)	44 (66,7)	68 (100)
Placebo N2 (%)	31 (97,5)	1 (2,5)	32 (100)
Vimang [®] N2 (%)	21 (56,1)	15 (43,9)	36 (100)
Total N2 (%)	52 (76,5)	16 (23,5)	68 (100)

Leyenda:

a Fracaso del efecto de la suplementación

b Éxito del efecto de la suplementación

N1 (%) Representa el número y el porcentaje del total de pacientes que manifiestan variación considerando la variable TAS y la variable PP en el tiempo 0 y a los 6 meses.

N2 (%) Representa el número y el porcentaje del total de pacientes que manifiestan variación considerando las variable TAS, PP, MDA, OT y %F ADN en el tiempo 0 y a los 6 meses.

TAS: Estado Antioxidante Total, GPx: Glutación Peroxidasa, SOD: Superóxido Dismutasa, OT: Organoperóxidos totales, MDA: Malondialdehído; GSH: Glutación reducido, FDNA: Porcentaje de Fragmentación del ADN.

La evaluación de TAS, PP, MDA, GSH y OT se realizó en suero, la evaluación de la actividad enzimática de SOD y GPx en eritrocitos y el % F ADN se determinó en linfocitos.

Nota: La magnitud de la diferencia Exito / Fracaso para N1 fue: 33,7% con $p = 0,013$, el intervalo del valor de este indicador a un 95% de confianza fue de (10,7 – 56,7%) en favor del éxito de la suplementación con Vimang[®]

La magnitud de la diferencia Exito / Fracaso para N2 fue: 50,8% con $p = 0,000$, el intervalo del valor de este indicador a un 95% de confianza fue de (32,4 – 69,2%) en favor del éxito de la suplementación con Vimang[®]

Tabla III.13 Ingesta nutricional de micronutrientes en los grupos Placebo y Vimang[®] al inicio y al final del estudio de suplementación con Vimang[®] por período de 6 meses.

Variables	Placebo		Vimang [®]	
	Inicio	6 meses	Inicio	6 meses
No de pacientes	40	32	42	36
Frutas y vegetales (g·d ⁻¹)	210,7 ± 80,5	220,3 ± 102,3	234,5 ± 94,1	244,0 ± 100,6
Vitamina A (μg)	793,4 ± 300,2	655,9 ± 210,1	785,4 ± 362,1	666,1 ± 229,4
Vitamina C (mg)	69,8 ± 27,6	79,0 ± 32,7	71,3 ± 30,5	80,6 ± 26,2
Vitamina E (mg)	7,75 ± 1,27	8,08 ± 2,04	8,02 ± 1,32	8,16 ± 2,12
Peso corporal (kg)	67,15 ± 4,21	67,95 ± 4,10	65,8 ± 3,75	67,0 ± 4,15

Nota:

Los índices nutricionales de ingesta fueron obtenidos del procesamiento de encuestas aplicadas durante 7 días en el sistema CERES, versión 5, 1997

No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) para cada una de las variables analizadas cuando se compararon los grupos Placebo y Vimang[®]

FIGURAS

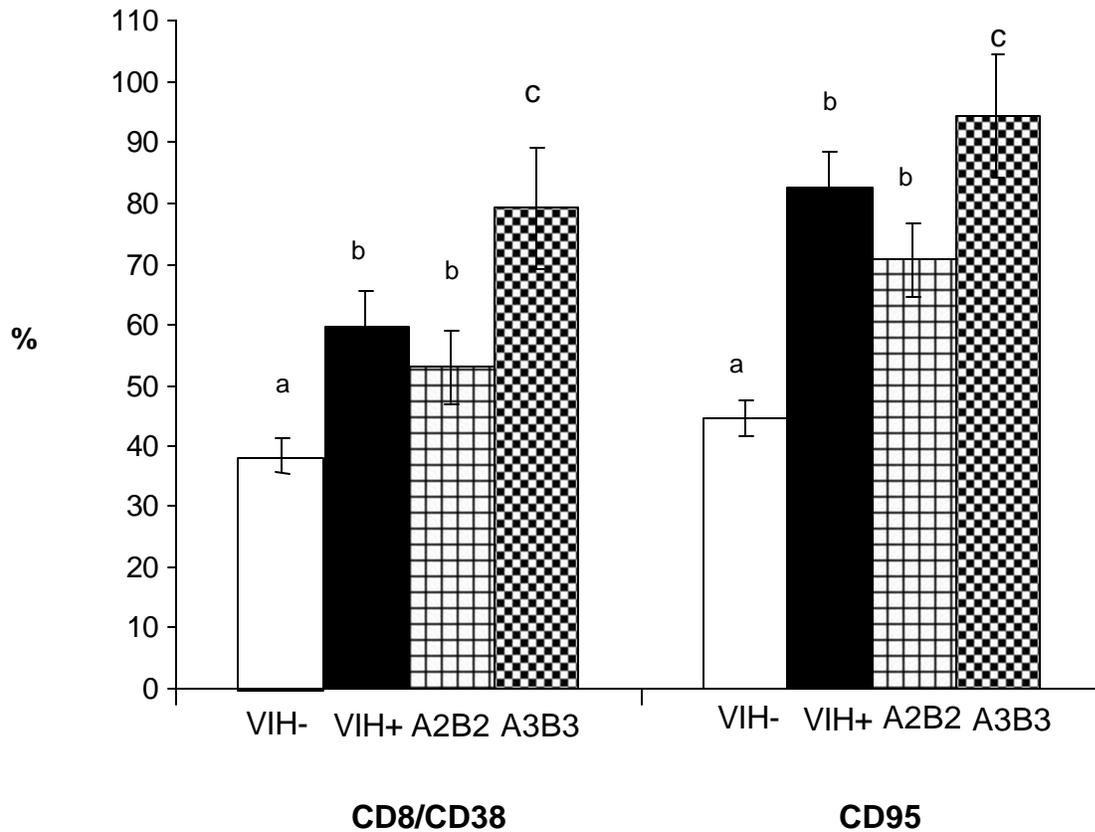


Figura III.1 Porcentaje de subpoblaciones linfoides CD8/CD38 y CD95 en el grupo control, VIH + y VIH + estratificado

Leyenda:

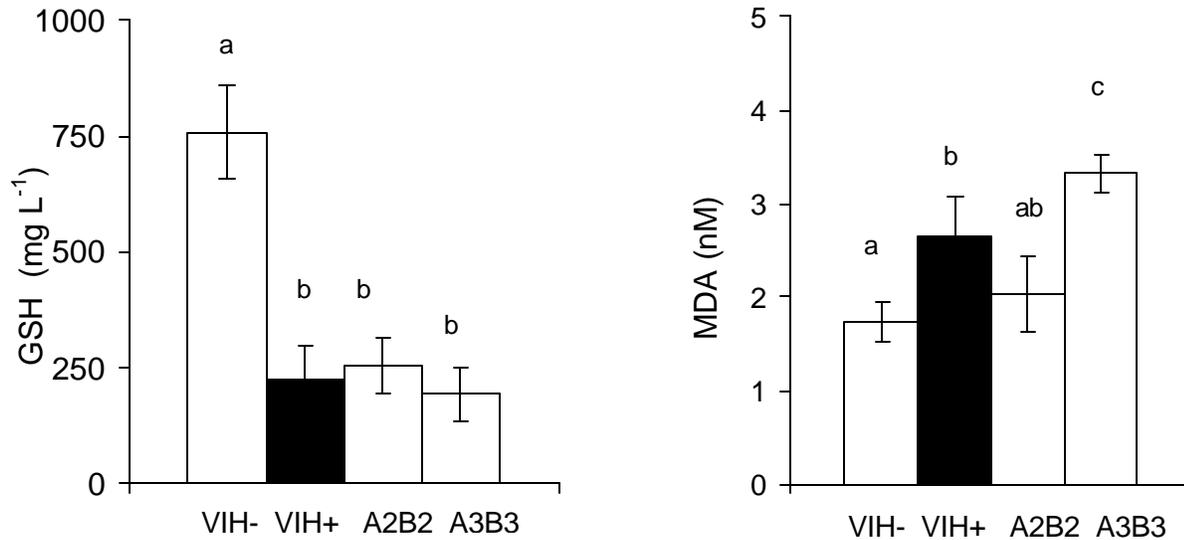
VIH- individuos seronegativos al VIH (grupo control)

VIH+ individuos seropositivos al VIH

A2B2 y A3B3 subgrupos de PVVIH según clasificación del CDC 1993.

La determinación del conteo relativo de las subpoblaciones linfoides CD8/CD38 y CD95 se realizó en un citómetro de flujo empleando sangre total.

Las barras con letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0,05$)



A

B

Figura III.2 Concentración de glutatión (A) y malondialdehído (B) de grupo control y PVVIH total y estratificado.

Leyenda:

VIH- individuos seronegativos al VIH (grupo control)

VIH+ individuos seropositivos al VIH

A2B2 y A3B3 subgrupos de PVVIH según clasificación del CDC 1993.

GSH: Glutatión, MDA: Malonildialdehído.

La determinación de la concentración de GSH y MDA se realizó en suero

Las barras con letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0,05$)

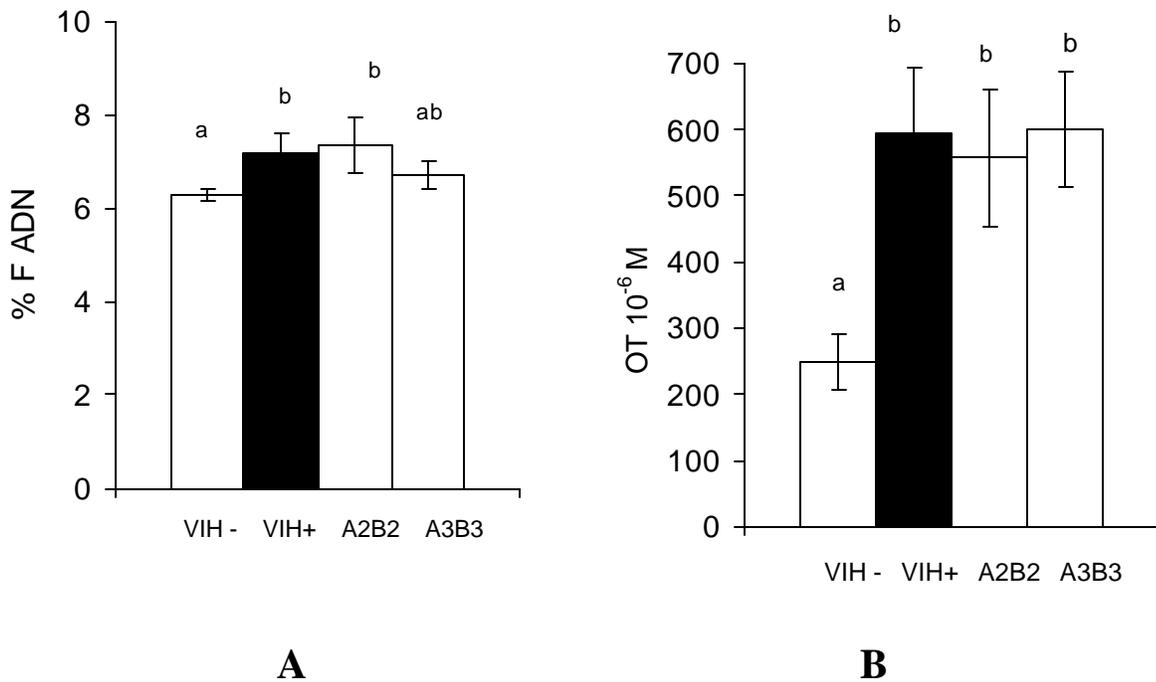


Figura III. 3 Porcentaje de fragmentación de ADN (A) y organoperóxidos totales (B) en grupo control y PVVIH total y estratificado.

Leyenda:

VIH- individuos seronegativos al VIH (grupo control)

VIH+ individuos seropositivos al VIH

A2B2 y A3B3 subgrupos de PVVIH según clasificación del CDC 1993.

OT Organoperóxidos totales, % F ADN Porcentaje de Fragmentación del ADN

La determinación de la concentración de OT se realizó en suero y del % F ADN en linfocitos

Las barras con diferentes letras indican diferencia significativa ($p < 0,05$)

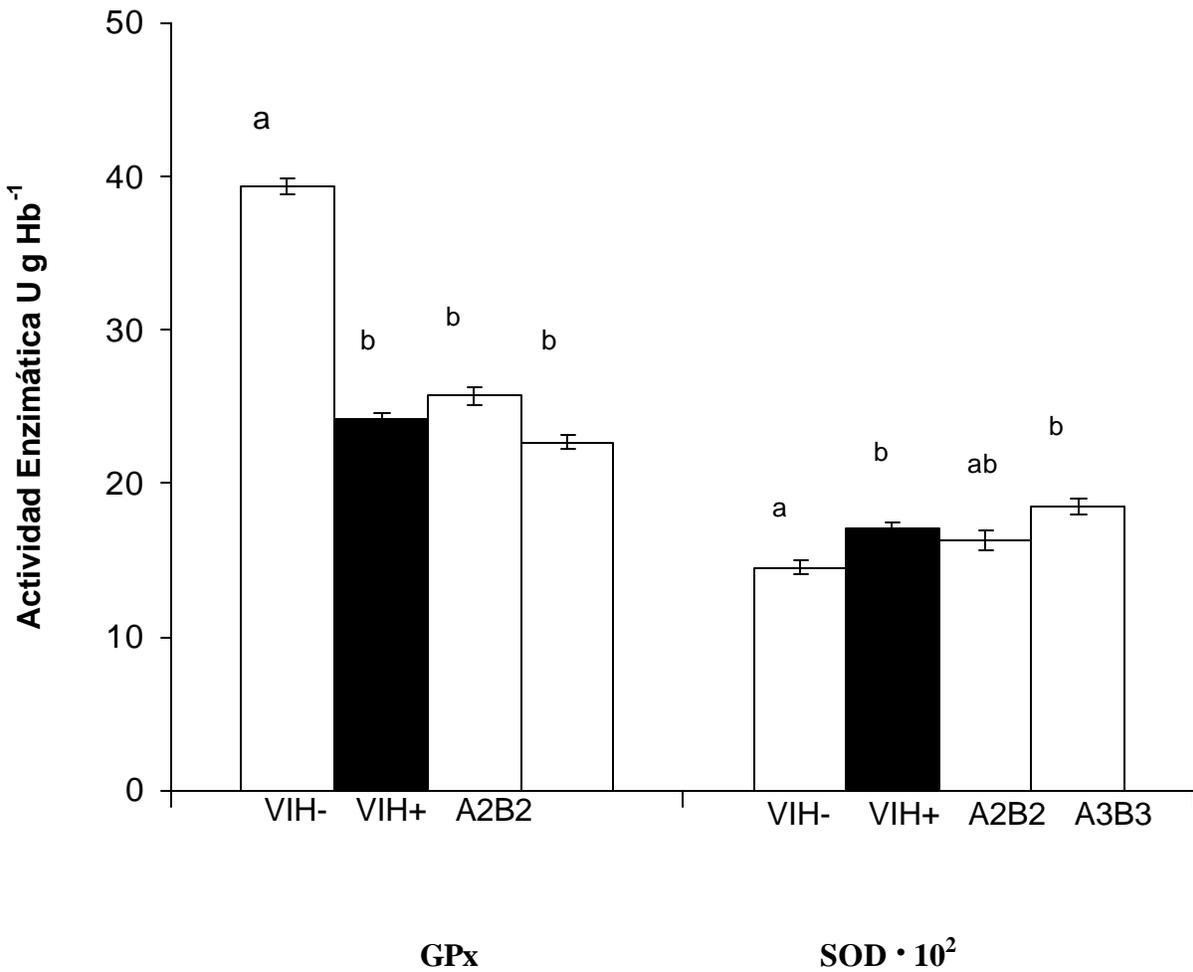


Figura III.4 Actividad de enzimas antioxidantes en eritrocitos en el grupo control y PVVIH total y estratificado.

Leyenda:

VIH- individuos seronegativos al VIH (grupo control)

VIH+ individuos seropositivos al VIH

A2B2 y A3B3 subgrupos de PVVIH según clasificación del CDC 1993.

SOD: Superóxido Dismutasa; GPx: Glutación Peroxidasa.

La evaluación de la actividad enzimática de SOD y GPx se realizó en eritrocitos

Las barras con diferentes letras indican diferencia significativa ($p < 0,05$)

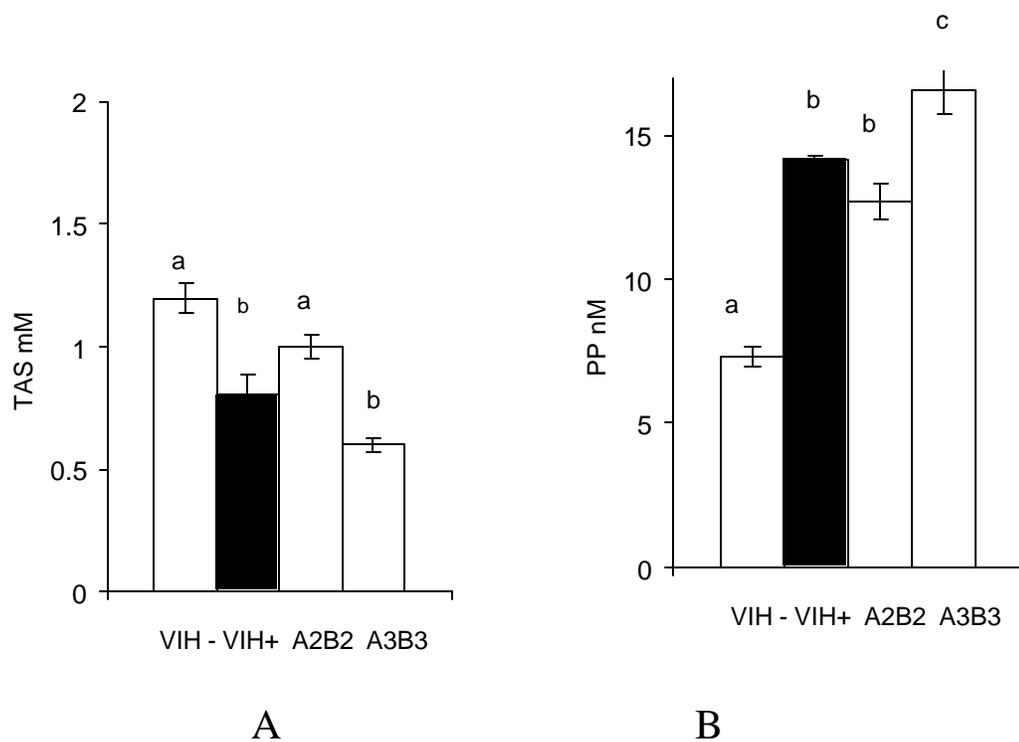


Figura III.5 Estado antioxidante total (A) y potencial de peroxidación (B) en el grupo control y en PVVIH total y estratificado

Leyenda:

VIH- individuos seronegativos al VIH (grupo control)

VIH+ individuos seropositivos al VIH

A2B2 y A3B3 subgrupos de PVVIH según clasificación del CDC 1993.

TAS, Estado Antioxidante Total; PP, Potencial de Peroxidación.

Las determinaciones de TAS y PP se realizaron en suero

Las barras con diferentes letras indican diferencia significativa ($p < 0,05$)

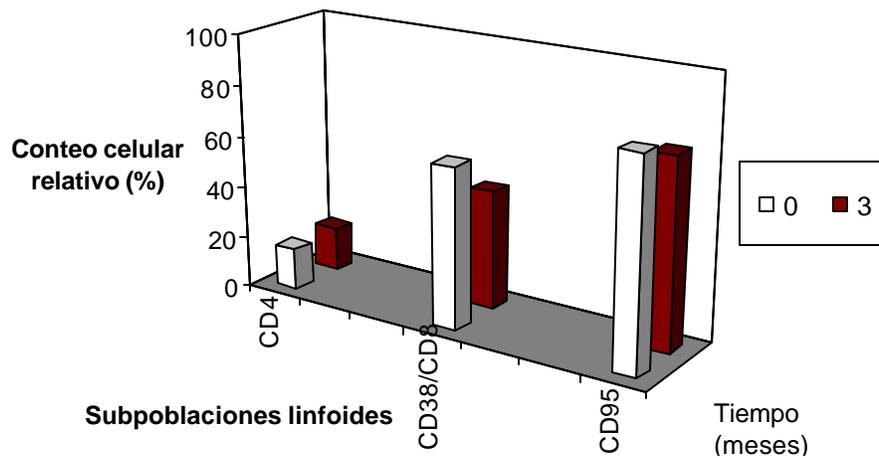


Figura III.6 Conteo relativo de linfocitos T CD4+, CD8+/CD38+ y CD95 a los días 0 y 3 meses en pacientes VIH+ sometidos a intervención nutricional.

El conteo de linfocitos T CD4+, de CD8/CD38 y CD95 se realizó en sangre total empleando un citómetro de flujo.

No se detectaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en ninguna de las subpoblaciones linfoides al comparar el grupo Placebo y Vimang® al inicio y a los 3 meses.

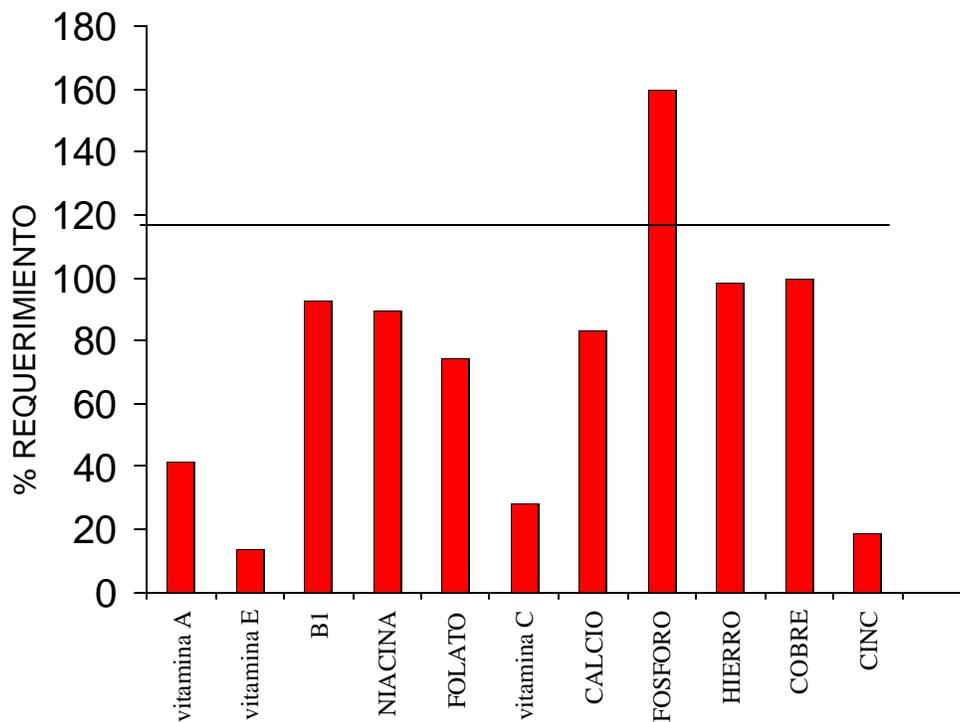


Figura III.7 Porcentaje del requerimiento de micronutrientes en la dieta en PVVIH del Sanatorio de Santiago de Las Vegas (n=40) antes de la intervención nutricional.

Leyenda:

La línea paralela al eje x representa el 100% de adecuación

Los índices nutricionales de ingesta fueron obtenidos del procesamiento de encuestas aplicadas durante 7 días en el sistema CERES, versión 5, 1997.

Los valores de los requerimientos para las PVVIH fueron considerados según Baum *et al.*, 1992.

Nota: Al final del estudio de tres meses esta adecuación no tuvo cambios significativos.

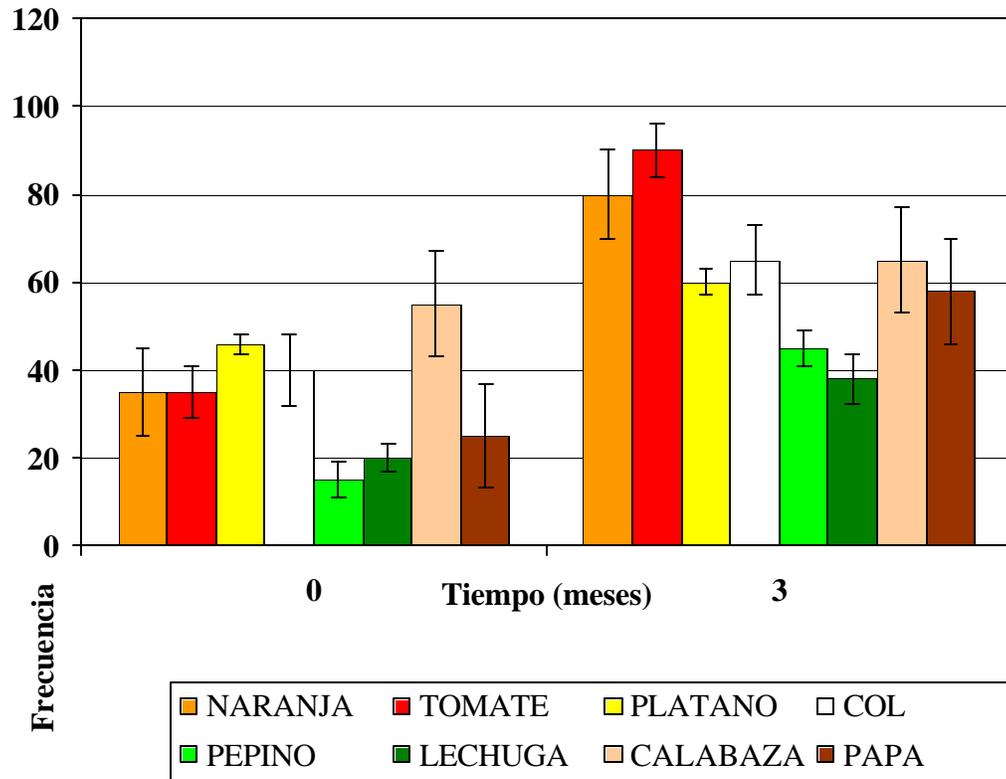


Figura III.8 Frecuencia alimentaria de las principales frutas y vegetales en el período de la intervención nutricional.

La frecuencia alimentaria fue obtenida del procesamiento de encuestas aplicadas durante 7 días consecutivos.

Nota: se encontraron incrementos significativos ($p < 0,05$) en la frecuencia de oferta de frutas y vegetales relacionados a los 3 meses con respecto al tiempo de inicio del ensayo.

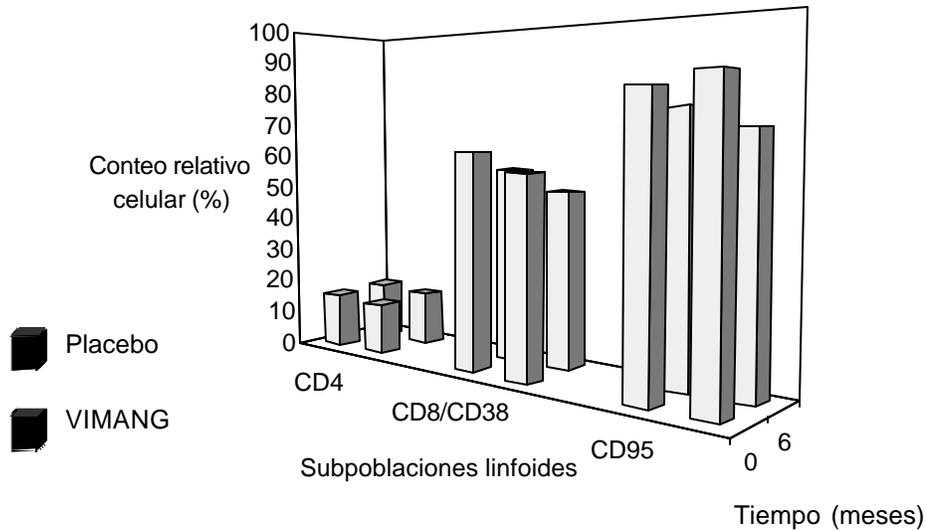


Figura III.9 Conteo relativo de las subpoblaciones linfoides en los grupos placebo y Vimang[®] en el estudio de suplementación en un período de 6 meses

El conteo de linfocitos T CD4+, de CD8/CD38 y CD95 se realizó en sangre total empleando un citómetro de flujo.

No se detectaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en ninguna de las subpoblaciones linfoides al comparar el grupo Placebo y Vimang[®] al inicio y a los 6 meses.

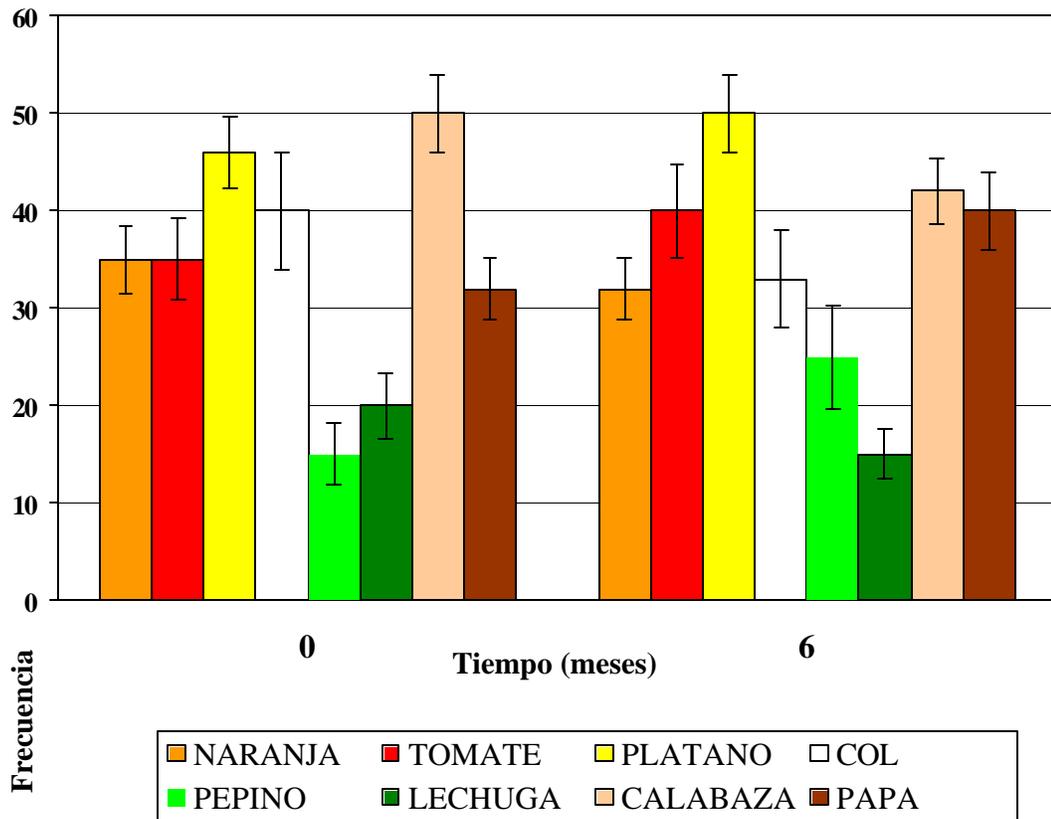


Figura III.10 Frecuencia alimentaria de las principales frutas y vegetales en individuos VIH+ en el período de suplementación con Vimang[®] (6 meses)

La frecuencia alimentaria fue obtenida del procesamiento de encuestas aplicadas durante 7 días consecutivos.

Nota: No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en la frecuencia de oferta de frutas y vegetales relacionados a los 6 meses con respecto al tiempo de inicio del ensayo.

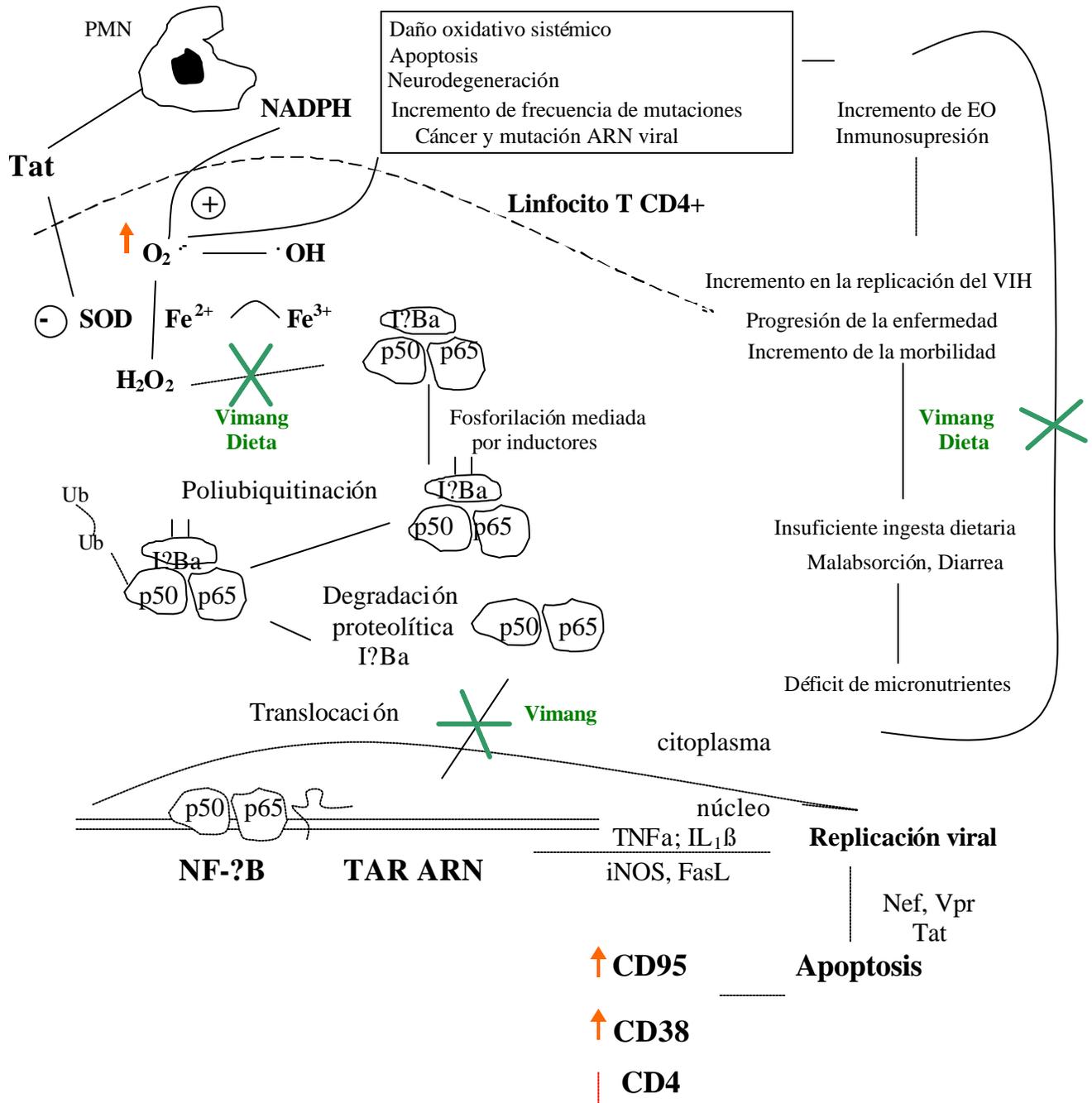


Figura IV.1 Algunos mecanismos probables en los que inciden la intervención nutricional y la suplementación antioxidante sobre eventos mediados por el VIH.