

Especies reactivas de oxígeno y respuesta antioxidante en pacientes VIH positivos y donantes voluntarios de sangre, Pereira, Colombia, 2007-2009

Guillermo Lagos Grisales;
Vicente Cediell Collazos;
Soraya Villegas Rojas.

Docentes, Departamento de Medicina Comunitaria, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, Risaralda, Colombia.
Correo electrónico: glagos@utp.edu.co

Resumen

Introducción: El estrés oxidativo se origina por desequilibrio entre la producción de Especies Reactivas del Oxígeno (ERO) y Capacidad Antioxidante Celular (CAC). La producción de ERO mitocondrial es constante. Entre 2% y 5 % del oxígeno para la cadena respiratoria se reduce para generar el anión superóxido, $\cdot O_2^-$; a partir de éste se producen otras moléculas y radicales libres potencialmente dañinos para la célula. El Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) se caracteriza por un estrés oxidativo persistente. El objetivo del estudio fue medir el estado redox en pacientes VIH+ del programa de SIDA de la ESE Salud Pereira y estado redox de personas donantes voluntarios de sangre del programa de medicina de la Universidad Tecnológica de Pereira años 2007-2009 para verificar la condición de estrés oxidativo, mediante su cuantificación espectrofotométrica de marcadores asociados al sistema oxidante-antioxidante celular. **Metodología:** Estudio transversal realizado con un grupo de pacientes VIH-SIDA y otro de donantes voluntarios de sangre, se cuantificó el estado redox y se correlaciona con otros parámetros: edad, género, estado clínico, nivel socioeconómico, tipo de dieta, estado nutricional, consumo de estresantes inmunológicos, antecedentes personales y epidemiológicos. **Resultados:** La Respuesta Antioxidante Total (RAT), Peróxido Plasmático (PP), Índice de estrés oxidativo (IEO), Índice de carbonilo (IC), Malondialdehído (MDA); resultaron significativamente diferentes en los grupos estudiados. **Discusión:** En VIH+ no se presentaron diferencias significativas en las pruebas de estrés oxidativo entre los que consumen y no consumen antiretrovirales. Se requieren estudios poblacionales para obtener valores de referencia de las pruebas de estrés oxidativo aquí ensayadas.

Palabras clave: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida, Estrés Oxidativo, Radicales Libres, malondialdehído, S-nitrosoglutatión.

Oxygen reactive species and anti-oxidant response in HIV positive patients and volunteer blood donors, Pereira, Colombia, 2007-2009

Abstract

Introduction: Oxidative stress is caused by imbalance between the production of Reactive Oxygen Species (ROS) and cellular antioxidant capacity (CAC). Mitochondrial ROS production is constant. Between 2% and 5% of oxygen to the respiratory chain is reduced to generate superoxide anion,

Recibido : 14-04-2012.
Aceptado : 12-07-2012.

• *O₂⁻, from this there are other molecules and free radicals potentially harmful to the cell. Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) is characterized by persistent oxidative stress. The objective of this study was to measure the redox status in HIV + AIDS program of the ESE Salud Pereira and redox status of people volunteer blood donors medicine program of the Technological University of Pereira years 2007 to 2009 to verify the condition of oxidative stress by spectrophotometric quantification of markers associated with oxidant-antioxidant cell system. Materials and methods: Cross-sectional study with a group of HIV-AIDS and other blood donors, the redox state was measured and correlated with other parameters: age, gender, clinical status, socioeconomic status, diet, nutritional status, immunological stressor consumption, personal history and epidemiologists. Results: Total antioxidant response (TAR), peroxide plasma (PP), oxidative stress index (IEO), carbonyl index (CI), malondialdehyde (MDA) were significantly different in the groups studied. Discussion: In HIV+ there were no significant differences in oxidative stress tests among those who consume and consume no antiretrovirals. Population studies are required to obtain reference values of oxidative stress tests tested here.*

Key words: *Acquired Immunodeficiency Syndrome, oxidative stress, free radicals, malondialdehyde, S-nitrosoglutathione.*

Introducción

Durante el proceso evolutivo, cuando las células desarrollaron sistemas antioxidantes, la vida se pudo expandir a una atmósfera oxigenada, en estos sistemas de protección antioxidante participan enzimas especializadas e implican mecanismos a veces complejos o sistemas no enzimáticos en los que participan biomoléculas que tienen la capacidad de neutralizar los radicales libres generados durante la actividad oxidativa de las células.

La producción de Especies Reactivas del Oxígeno ERO, ocurre de manera constante en la mitocondria. Entre un 2 y 5 % del oxígeno disponible para la cadena respiratoria se reduce de forma univalente para generar el anión superóxido $\cdot\text{O}_2^-$, y a partir de éste se producen otras moléculas y radicales libres potencialmente dañinos para la célula. Las sustancias que participan en las reacciones de los sistemas de defensa antioxidante se inactivan o deterioran bajo ciertas condiciones. Este deterioro puede ser causado por alguna enfermedad crónica o transitoria que provoca un aumento en la producción de agentes oxidantes (1).

El SIDA se caracteriza por un desequilibrio oxidativo persistente. La creciente deficiencia de glutatión, uno de los principales antioxidantes celulares, desempeña un papel crucial en la transición del estado pre-SIDA a la manifestación clara de la enfermedad (2). Esta molécula no puede entrar directamente a las células y en consecuencia se debe sintetizar en su interior a partir de sus precursores aminoacídicos: glicina, glutamato y cisteína. Un papel importante del glutatión consiste en disminuir la producción de Óxido Nítrico (NO), el cual es lesivo para las células cuando se genera en exceso.

Ciertos tipos de células del sistema inmune eliminan microorganismos mediante la producción de NO. Debe existir un balance entre las células del sistema inmune productoras de NO y aquellas que no lo producen. Este balance se puede perturbar por ciertos factores infecciosos y de esta manera lleva a una condición de inmunodeficiencia. La estimulación prolongada de la producción de NO por estas células conlleva a una inhibición compensatoria de la producción de NO. Esta situación facilita el ataque a células del cuerpo por microorganismos oportunistas como hongos, parásitos, micobacterias y virus que normalmente serían eliminados a través de un proceso que involucra al NO (3). Durante el proceso de defensa con NO, las células, incluyendo aquellas que producen NO, se deben proteger del daño y muerte acelerada causada por éste; aquí desempeñan un papel clave los antioxidantes.

El aporte nutricional de agentes antioxidantes debe ser suficiente para evitar daños en el interior de la célula durante la defensa con NO y para otros procesos inducidos por esta molécula. Esto incrementa la lisis celular y pueden ocurrir reacciones adversas en diferentes tipos de células, incluidas las del sistema inmune, el resultado final de todo esto es la desconexión de la producción de NO por las células del sistema inmune (4).

Los linfocitos T son muy importantes en la inmunidad celular. De acuerdo con la teoría viral, el SIDA es el resultado de la disminución del subtipo de células T conocidas como CD4, causada por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Hay dos tipos de células CD4 conocidas como Th1 y Th2. Las células Th1 estimulan la inmunidad celular y producen NO, estas células son propensas a sufrir daño con su propia producción de NO cuando el nivel de glutatión es insuficiente. Producen los mensajeros químicos que actúan como mediadores inmunológicos de la inflamación, llamados citoquinas, que estimulan macrófagos. Los macrófagos fagocitan los microorganismos invasores y los matan usando varios mecanismos que incluyen el NO. Otro papel importante de los macrófagos es la remoción de células dañadas, células muertas y detritos celulares. Cuando la función de Th1 está deteriorada o suprimida también se inhiben estas funciones de los macrófagos. Las células Th2 estimulan la producción de anticuerpos, estas no producen NO y por lo tanto no están propensas a sufrir daño por esta molécula (5).

Bajo condiciones de estrés oxidativo y nutricional, persiste la sobreproducción de NO, necesario para la defensa inmune celular y no se puede contrarrestar con un aporte adecuado de antioxidantes, particularmente glutatión. El organismo responde a esta condición con la liberación de cortisol (una hormona antiinflamatoria), disminuyendo el número de células T que maduran a Th1 y en lugar de ello lo hacen a Th2. Cuando el nivel de glutatión es bajo en un tipo de células llamadas células presentadoras de antígenos (este es otro papel de los macrófagos) éstas dirigen la maduración de las células CD4 hacia células Th2 en lugar de células Th1 (6); por lo tanto, este papel de los macrófagos está estimulado. Las células Th2 migran hacia la médula ósea

donde estimulan la producción de anticuerpos. Una vez la producción de anticuerpos, resultante del incremento de Th2, excede un nivel umbral arbitrario, puede presentarse un ensayo VIH positivo. Si el estrés oxidativo continúa, el sistema responde efectivamente apagando la producción de NO por las células del sistema inmune.

El organismo humano responde a estresantes psicológicos, tóxicos, infecciosos, traumáticos o nutricionales con la activación del eje de estrés neuroendocrino hipotálamo-hipófisis-adrenal. Este es valioso para la supervivencia en situaciones de “lucha y huida” debido a que inicia reacciones catabólicas orientadas a liberar energía rápidamente. Las glándulas adrenales liberan hormonas conocidas como glucocorticoides y cortisol para contener el daño inflamatorio causado por este proceso, estas hormonas suprimen la respuesta inmune celular de tipo inflamatorio (7). Un nivel de cortisol sanguíneo persistentemente elevado empeora esta respuesta asociada con las células Th1. Un alto nivel de cortisol causa la migración de las células Th2 a la médula ósea donde activan las células productoras de anticuerpos, los linfocitos B. La activación de células B y la subsecuente producción de anticuerpos, también aumenta por efecto del cortisol (8).

En consecuencia, el SIDA está relacionado con estrés oxidativo persistente el cual se hace manifiesto por un bajo nivel de antioxidantes en general y en particular de un grupo químico protector, el grupo tiol (-SH). Los grupos -SH desaparecen como resultado de su oxidación. La oxidación de los grupos -SH de actina, una proteína del citoesqueleto, conduce al debilitamiento de la membrana celular, hecho que eventualmente causa la muerte de la célula. También se activan nucleasas y proteasas que aumentan la muerte celular. En consecuencia, grandes cantidades de fragmentos de ARN, ADN y proteínas alcanzan el espacio extracelular. El sistema inmunológico responde generando anticuerpos contra estos fragmentos celulares, lo cual puede ser la causa de los resultados considerados como positivos en la prueba de VIH (9).

Las mitocondrias son las organelas generadoras de energía para la célula, contienen ADN que codifica para muchas de sus proteínas utilizadas en la función de generación de ATP. El ADN mitocondrial a diferencia del nuclear no está protegido por proteínas y carece de mecanismos de reparación frente a eventuales daños. La exposición a la potencia oxidante de los radicales libres puede dañar las células y el ADN mitocondrial. El daño al ADN mitocondrial es acumulativo. Hay toxinas medioambientales que pueden dañar enzimas mitocondriales y con ello se incrementa aún más la producción de radicales libres.

Hay una larga lista de agentes inmunosupresores reportados como “cofactores” del VIH entre los que tenemos: alcohol, cocaína, heroína, marihuana, cigarrillo, anfetaminas, nitritos volátiles como los denominados “poppers”, contaminantes químicos del medio ambiente, alérgenos, citomegalovirus, virus del herpes tipos 1, 2 y

6, herpes zoster, virus de Epstein Barr, adenovirus, otros retrovirus, virus de las hepatitis A, B y C, papovavirus, micoplasmas y otros superantígenos, tuberculosis, lepra, malaria, tripanosomiasis, filariasis y otras enfermedades tropicales, enfermedades de transmisión sexual, semen, sangre, factor VIII de la coagulación, ansiedad, depresión, pánico, insomnio, falta de reposo, ejercicio extenuante, malas condiciones sanitarias, pobreza, malnutrición y varias deficiencias vitamínicas (10-24).

La circunstancia realmente nueva que rodea a todos los grupos de personas que con mayor frecuencia desarrollan el SIDA, es su exposición exagerada a una variedad de agentes estresantes inmunológicos, situación que se agudizó desde la década del setenta (10). Lo nuevo en algunos sectores de la comunidad homosexual de los países industrializados es el uso de afrodisíacos y drogas psicoactivas (25). En África, Asia y el Caribe las circunstancias nuevas son los niveles insoportables de pobreza a que han llegado sus habitantes. Nunca antes se había profundizado tanto la brecha entre ricos y pobres (25,26).

El SIDA aparece en distintos y distantes grupos de personas en la segunda mitad del siglo veinte, en un momento en el cual el sistema inmune de los humanos está deteriorado por las exposiciones a agentes estresantes. En las últimas décadas, estos agentes estresantes están aumentando en todo el planeta, tanto en cantidad como en variedad. Las posibilidades del sistema inmune para contrarrestar estos agentes estresantes no son ilimitadas. El SIDA es la expresión del peor estado de deterioro al que puede llegar un organismo. En el SIDA otros sistemas corporales se encuentran también seriamente deteriorados. Con el SIDA se inaugura por lo tanto, una nueva época en la historia de las enfermedades del hombre (10).

Los agentes estresantes actúan por sí mismos o estimulan la producción de radicales libres y especies de oxígeno reactivas, los cuales causan daño entre otras, a las células con funciones inmunológicas (27). Esta es la razón por la cual los agentes antioxidantes tienen un papel crucial en el tratamiento y en la prevención del SIDA (28).

Es posible que las personas seropositivas en las pruebas para VIH, probablemente lo sean por haber estado expuestas a muchos retos antigénicos y tóxicos y muy probablemente sus sistemas inmunes están oxidados y debilitados y ésta sería la razón por la cual estas personas tienen un mayor riesgo de desarrollar el SIDA. Lo que conocemos como VIH sería entonces un marcador de inmunodeficiencia (29).

Producción de ERO y sistemas antioxidantes en SIDA

El estrés oxidativo tiene lugar al comienzo de la enfermedad y se ha evidenciado por una superproducción de H_2O_2 por los leucocitos polimorfonucleares, una elevada concentración de Malondialdehído MDA y una disminución en los sistemas antioxidantes (30). Los sistemas antioxidantes encargados del control fisiológico de la producción de ERO se encuentran localizados tanto en el interior de las células

como en el líquido extracelular y son esencialmente enzimas y otros compuestos que neutralizan radicales libres (31).

En los pacientes con SIDA los sistemas de protección antioxidante son defectuosos, en ellos se ha demostrado que la actividad de las enzimas citosólicas superóxidodismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa está disminuida; hay déficit de glutatión reducido asociado a una disminución de los nucleótidos de adenina NAD⁺ y NADP⁺ que ocasionan una reducción de la producción de ATP y/o un déficit de NADPH (32). En los pacientes con SIDA la síntesis disminuida de glutatión reducido GSH se debe a la deficiencia de tioredoxina, enzima que participa en la reducción de los tioles intracelulares (31); la disminución de cisteína debido al síndrome de mala absorción; disminución de ATP y carencia de oligoelementos, vitaminas y aminoácidos sulfurados (31,32). Esto es por causa del síndrome de mala absorción intestinal y la diarrea causada por diversos agentes patógenos. Se ha observado un déficit de zinc, selenio, vitaminas A, C y E, cisteína, cistina y metionina. La disminución de la concentración plasmática del ión Zn⁺² provoca a su vez pérdida de actividad en la enzima superóxidodismutasa, por cuanto este oligoelemento es necesario para su estabilidad. La presencia de Zn⁺² también se requiere para la acción de la timulina, una hormona que participa en la diferenciación de las células NK (del inglés *natural killer*) (33).

El selenio sérico es indispensable para la activación de las células NK y protege indirectamente de la peroxidación lipídica porque forma parte de la estructura de la enzima glutatión peroxidasa. La disminución de la concentración de selenio puede ser causada por el síndrome de mala absorción. La deficiencia de este oligoelemento se ha asociado con una disminución en la supervivencia de los pacientes con SIDA (34). Por otra parte, el ión Cu⁺², se encuentra aumentado en estos pacientes, lo cual es característico de los procesos inflamatorios (31).

La vitamina A es un antioxidante cuya deficiencia al inicio de la enfermedad se correlaciona con un incremento de la mortalidad. Esto se debe a que esta vitamina desactiva al oxígeno singulete, considerado como una de las ERO. Una disminución del contenido de esta vitamina se asocia también con la atrofia de algunos tejidos linfoides, con una disminución de leucocitos en sangre y con una disminución en la respuesta relacionada con la producción de anticuerpos (35).

El α -tocoferol, la forma activa de la vitamina E, tiene entre sus funciones, inhibir la propagación de la peroxidación lipídica de las membranas biológicas, lo cual disminuye la lisis celular (31). La vitamina C reduce al radical tocoferilo y lo convierte en α -tocoferol. En consecuencia su déficit provoca el deterioro de esta función.

Los aminoácidos sulfurados también desempeñan un papel importante en la actividad antioxidante. La cisteína, la cistina y la metionina son ejemplos de ello. La caída de

su concentración trae como consecuencia la disminución en la capacidad de síntesis del glutatión reducido (GSH). La síntesis de este compuesto se lleva a cabo a partir de glutamato, glicina y cisteína en presencia de ATP y Mg⁺². La cisteína que es el aminoácido limitante no puede ser sustituida por su forma oxidada, la cistina (31).

SIDA y terapia antirretroviral

El tratamiento con análogos de nucleósidos (AZT, ddI, 3TC etc.) tiene efectos adversos sobre la mitocondria. Estas drogas reducen el transporte de oxígeno a la mitocondria, el oxígeno es indispensable para la producción de ATP vía fosforilación oxidativa. De otra parte inhiben la síntesis de ADN mitocondrial, con lo cual el número de mitocondrias se reduce y por ende la producción de ATP. La reducción de ATP conduce a un incremento en la producción de radicales libres que tienen una elevada capacidad oxidante (36). Junto con el declive en la producción de ATP se presenta una disfunción de las moléculas encargadas de la remoción de radicales libres, este exceso de radicales libres causa más daño en el ADN mitocondrial y por lo tanto una mayor disminución en la producción de ATP. La célula entra en apoptosis. Este efecto es particularmente severo en células que maduran y tienen una alta tasa de recambio como las células CD4.

Enfoque terapéutico para el manejo del SIDA

De acuerdo con las consideraciones planteadas el tratamiento de la enfermedad debe considerar el estrés oxidativo como uno de los factores implicados; su definición correcta partiría de una caracterización completa del paciente, que recoja información concerniente a su condición socioeconómica, hábitos nutricionales, identificación de los agentes medioambientales estresantes del sistema inmunológico que pueden estar afectando su respuesta inmune y pruebas de laboratorio que cuantifiquen con la mayor precisión posible la magnitud del daño oxidativo.

Existen varias pruebas de laboratorio para marcadores de estrés oxidativo, algunas son muy costosas, otras tienen grados variables de sofisticación técnica para ser utilizadas en la rutina del laboratorio clínico. Sin embargo, recientemente Erel desarrolló un procedimiento para medir la respuesta antioxidante total del plasma (RAT) (37). Este método se fundamenta en la producción del radical libre hidroxilo por la reacción de Fenton, este radical reacciona luego con el sustrato incoloro o-dianisidina para producir el radical dianisilo que tiene un color café amarillento brillante. Si la reacción se verifica en presencia de una muestra de plasma, sus componentes antioxidantes suprimen las reacciones oxidativas iniciadas por los radicales hidroxilos con lo cual se previene el cambio de color. Este es el fundamento para el diseño de un procedimiento espectrofotométrico relativamente sencillo y confiable que puede ser utilizado como marcador de estrés oxidativo.

Este método se ensayó en suero de pacientes con falla renal crónica en donde los niveles de peroxidación lipídica, metilación de proteínas y oxidación de ADN

están aumentados por el efecto de reacciones iniciadas por potentes radicales libres que actúan como oxidantes. Los resultados muestran que la respuesta antioxidante total del plasma es más baja cuando se le compara con la obtenida de personas sanas (37). También se utilizó para medir el efecto protector del té, frutas y vegetales ricos en polifenoles que actúan como antioxidantes. El incremento en la respuesta antioxidante en estas condiciones se pudo demostrar mediante esta técnica (37).

En el presente estudio se propone implementar este procedimiento en plasma sanguíneo obtenido de pacientes con SIDA. Medir la concentración total de peróxidos en plasma (CTPP) para establecer luego el índice de estrés oxidativo (IEO).

El IEO se obtiene mediante la siguiente relación simple: $IEO = (CTPP/RAT) 100$. De otra parte, determinamos la concentración plasmática de MDA como marcador específico de peroxidación lipídica, carbonilación de proteínas como un marcador del grado de oxidación de proteínas séricas y niveles de nitritos en plasma como un indicador de la producción de NO, con el propósito de alcanzar una mejor caracterización del estado redox del grupo de pacientes con SIDA.

Materiales y métodos

Se realizó un estudio transversal (*cross-sectional*) en un grupo de pacientes VIH-SIDA y un grupo de personas donantes. En el que se cuantificarán estado redox, edad, sexo, estado clínico, nivel socioeconómico, tipo de dieta, estado nutricional, consumo de estresantes inmunológicos, antecedentes personales y epidemiológicos; se exploró su probable relación con el nivel de estrés oxidativo.

La población la constituyeron pacientes que voluntariamente decidieron participar del programa de SIDA de la ESE Salud de Pereira (total 45 pacientes), y un grupo de donantes (total 40 participantes) que se reclutaron entre los donantes de sangre en la campaña que adelanta el programa de Medicina de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, Colombia, quienes fueron encuestados y posteriormente se les tomó una muestra de sangre en la cual se realizaron las pruebas de laboratorio.

Se realizó distribución de frecuencias de las variables de persona tiempo y lugar y medidas de tendencia central para las variables continuas, se definió el nivel redox como la variable dependiente y se cruzó con el resto de las variables, se realizaron correlaciones entre las variables de interés y la significancia estadística se valoró mediante análisis ANOVA con un nivel de confianza de 95% ($p < 0,05$).

Toma de la muestra

Después de la explicación sobre los objetivos del estudio, la información sobre los riesgos y beneficios al participar en la investigación y la obtención del consentimiento informado, se procedió a la toma de muestra. Las muestras

fueron procesadas en el laboratorio de biología molecular de la Facultad de Ciencias de la Salud en el cual se dispone de cabinas de seguridad, baños termoregulados, centrifuga refrigerada, espectrofotómetro de UV/Vis, pipetas automáticas y congeladores REVCO de -80°C . Las muestras de sangre se tomaron en estado de ayuno de la vena cubital en tubos heparinizados e inmediatamente se colocaron sobre hielo. El plasma se separó de las células por centrifugación a 3000 rpm por 10 minutos. Las muestras de plasma se almacenaron a -80°C .

Medida de la respuesta antioxidante total

El potencial antioxidante total del plasma se midió usando el método colorimétrico desarrollado por Erel (37). En este método, el radical hidroxilo, el más potente radical biológico, se produce mediante la reacción de Fenton y reacciona con el sustrato incoloro o-dianisidina para producir el radical dianisilo, este tiene un color café amarillento brillante. Con la adición de una muestra de plasma, sus componentes antioxidantes suprimen las reacciones oxidativas iniciadas por los radicales hidroxilos presentes en la mezcla de reacción, de esta manera se previene el cambio de color y por lo tanto tendremos un procedimiento efectivo para medir la capacidad antioxidante del plasma. Los resultados se expresan como mmol de Trolox /L.

Reactivo 1: Solución Clark y Lubs (75 mM, pH 1,8) se preparó así: 5,591 g de KCl se disuelven en 1000 mL de agua desionizada (concentración final, 75 mM). Se diluyeron 6,41 mL de HCl grado reactivo (36,5%) hasta 1000 mL con agua desionizada (concentración final 75 mM). La solución de KCl preparada (800 ml) se mezclan con 200 mL de solución de HCl hasta un pH final de 1,8. Se disolvieron 3,17 g de dihidrocloruro de o-dianisidina en esta solución hasta una concentración final de 10,0 mM, y luego se disolvieron 0,01764 gramos de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en esta solución (concentración final, 45 μM). El reactivo así preparado se usó como reactivo 1 en este ensayo.

Reactivo 2: Solución 7,5 mM de peróxido de hidrógeno que se preparó así: Se diluyeron 0,641 mL de peróxido de hidrógeno comercial (35%, Merck) hasta 1000 mL con solución Clark y Lubs. La concentración del peróxido de hidrógeno se confirmó por espectrofotometría midiendo su absorción a 240 nm.

Para el ensayo se mezclaron 400 μL de reactivo 1 con 10 μL de plasma. Se toma el primer valor de absorbancia a 444 nm, este valor se asume como blanco y luego se añaden 20 μL del reactivo 2, se mezclan y se toma el segundo valor de absorbancia cuando se alcance el *plateau*, 3 o 4 minutos después de mezclar. De la misma manera se procede para realizar la curva de calibración con Trolox.

Medida de la concentración total de peróxido plasmático.

La concentración de peróxido plasmático se determinó usando el método FOX₂. Este ensayo se basa en la oxidación de Fe^{+2} a Fe^{+3} , por los diferentes tipos de peróxidos que contiene la muestra de plasma, en presencia de anaranjado

de xilenol el cual produce un complejo coloreado anaranjado de xilenol-Fe³⁺ cuya absorbancia se puede determinar. El reactivo FOX₂ se prepara disolviendo 9,8 mg de sulfato de amonio ferroso en 10 mL de H₂SO₄ 250 mM para dar una concentración final de Fe³⁺ 250 mM en medio ácido. Esta solución se adiciona a 90 mL de metanol grado-HPLC que contiene 79,2 mg de BHT. Finalmente, se añaden agitando 7,6 mg de anaranjado de xilenol para hacer el reactivo de trabajo (sulfato de amonio ferroso 250 mM, anaranjado de xilenol 100 mM, H₂SO₄ 25 mM, BHT 4 nM en metanol al 90% (v/v) para un volumen final de 100 mL). El reactivo blanco contiene todos los componentes de la solución excepto sulfato ferroso. Alícuotas de 200 µL de plasma se mezclaron con 1,8 mL de reactivo FOX₂. Después de incubar a temperatura ambiente por 30 min los viales fueron centrifugados a 12.000 g por 10 min. La absorbancia del sobrenadante se determina a 560 nm. El contenido total de peróxido de las muestras de plasma se determinará como una función de la diferencia de absorbancia entre las muestras ensayo y blanco usando una solución de H₂O₂ como estándar (38).

Índice de estrés oxidativo

La razón porcentual entre peróxidos totales y potencial antioxidante total se toma como el índice de estrés oxidativo, un indicador del grado de estrés oxidativo.

Determinación de malondialdehído

La determinación de MDA se realiza a través de la formación de derivados del ácido tiobarbitúrico (39) utilizando el procedimiento que se resume a continuación: A un volumen de 0,2 mL de plasma se le añade 0,2 ml de H₃PO₄ (0,2 M) y el color de la reacción se inicia por la adición de 0,025 mL de una disolución 0,11 M de ácido tiobarbitúrico. Entonces las muestras se colocan a 90°C durante 45 min. El complejo rosa se extrae con 0,4 ml de n-butanol, durante 30 min. Las fases acuosa y butanólica se separan por centrifugación a 6.000 g, durante 10 min. Se determina la absorbancia de las alícuotas de la fase butanólica a 535 nm. Para la preparación de la curva de calibración se utiliza la cantidad estándar de MDA requerida para preparar soluciones con una concentración entre 0 y 20 µM.

Determinación del contenido de carbonilo en proteínas

Se utilizó el método de Levine et al (40). Se toman dos tubos con 1,0 mL de muestra de plasma, uno se marca como "ensayo" y el otro como "control". Se adicionan 4,0 mL de DNFH 10mM preparada en HCl 2,5M a la muestra "ensayo" y 4,0 mL de HCl 2,5M a la muestra "control". Se mezcla muy bien el contenido y se incuba en la oscuridad, a temperatura ambiente, por una hora. Los tubos se deben agitar cada 15 minutos. Luego se adicionan 5 mL de TCA al 20% a cada tubo y la mezcla se deja en hielo por diez minutos. Luego se centrifuga a 3.500 rpm durante 20 minutos para obtener el precipitado de proteína. Seguidamente se aspira cuidadosamente el sobrenadante y se descarta. Se hace un segundo lavado con TCA al 10%. Finalmente el precipitado se lava tres veces con 4 mL de etanol:acetato de etilo (1:1, v/v) para remover el DNFH que no ha reaccionado y el remanente de lípidos. El precipitado

final de proteínas se disuelve en 2 mL de clorhidrato de guanidina 6M y se incuba a 37°C por 10 minutos. Los materiales insolubles se remueven por centrifugación. El contenido de carbonilo se determina tomando el espectro de una muestra representativa en la región de 355-390 nm. Cada muestra se lee contra la muestra control. El contenido de carbonilo se calcula a partir del pico de absorción (370 nm) usando como coeficiente de absorción 22,000 M⁻¹cm⁻¹. El contenido de carbonilo se expresa como nmoles/mg de proteína. Ésta se determina por el método de Lowry usando BSA como estándar (39-41).

Resultados

Datos generales de los grupos estudiados

Edad: El grupo de donantes (donantes de sangre) oscila entre 16 y 58 años, con una media de 22 años y el grupo de los pacientes VIH+ entre 19 y 67 años con una media de 36 años. No se hallaron correlaciones entre la edad y los parámetros estudiados.

Distribución por género: En el grupo de pacientes VIH+, el 72 % correspondió al género masculino, mientras que el 28% restante al género femenino; en el grupo de donantes la distribución fue del 67,5% y 32,5% respectivamente. Es decir, que en el grupo de pacientes con VIH+ que consultan la ESE Salud Pereira, 7 de cada 10 consultantes son hombres.

Escolaridad: En el grupo de los VIH+, el 32 % alcanzó educación básica primaria, el 53,5% alcanzó formación a nivel medio, y solo el 14% reportó estudios de educación superior. En el grupo de los donantes la gran mayoría, 90%, reportó estar en el nivel de educación superior y el resto de los donantes habían realizado el nivel básico secundario.

Clasificación SISBEN: En el grupo de VIH +, el 95% se encuentra clasificado por debajo del nivel 2 y en el grupo de los donantes el 95% se encuentra entre el nivel 2 y 5, con predominio del nivel 3 con un 47,5%.

Estado clínico: Del total de pacientes el 76,7% se encontró en estado asintomático A= (33/43), llama la atención que de los 32 casos con reporte de CD4 hay un 12,5% (4/32) con CD4 por debajo de 200 u/L. Las infecciones oportunistas más frecuentes encontradas en el grupo de sujetos VIH+ en el último año, correspondieron a la candidiasis oral y pulmonar, tuberculosis tanto pulmonar como extra pulmonar y neumonía recurrente.

Hábito de fumar: En el grupo de VIH+ el 30,2% respondieron afirmativamente tener el hábito, mientras que en el grupo de donantes lo tienen el 22,5%.

Consumo de alcohol: Es interesante anotar que con respecto a este hábito, el grupo de los donantes duplica al grupo de los VIH+, con valores del 65% y 32,6% respectivamente.

Consumo de sustancias psicoactivas: Obsérvese el mayor consumo en el grupo de los VIH+ en comparación con los

donantes, especialmente las sustancias marihuana, bazuco y cocaína (Cuadro 1).

Cuadro 1. Consumo de sustancias psicoactivas entre pacientes VIH+ y donantes de sangre.

Sustancia psicoactiva	VIH-positivos %	Donantes %
Bazuco	9,3	0,0
Marihuana	18,6	2,5
Cocaína	11,6	0,0
Pega-inhalada	2,3	0,0
Poppers	7,0	0,0
Éxtasis	0,0	0,0
Heroína	0,0	0,0

Consumo de antirretrovirales: En el grupo de pacientes VIH+ el 70% (30/43) consume antirretrovirales, de estos la mayoría consume zidovudina-AZT (25/30), combinado con lamivudina - 3TC (28/30), combinado con efavirenz (13/30) y en menor proporción los demás antirretrovirales.

Consumo de antioxidantes: El 14% (6/43), de los pacientes VIH+ consumen antioxidantes y el 20% (8/40) de los donantes generalmente consumen antioxidantes en forma de multi-vitaminas o vitaminas C, E y A.

Tendencia sexual: En el grupo VIH+ se encontró que el 44,2% (19/43) se define como homosexual, 48,8% como heterosexual y el 7% restante se define como bisexual. En este grupo de VIH+, el 44,2% refiere tener relaciones con personas VIH+. En el grupo de los donantes, el 85% (34/40) se clasifica como heterosexual, 5% como bisexual y el 10% restante no se clasificó.

IMC: En el grupo de pacientes VIH+ solo el 16% (4/40), tenían un IMC por debajo de 18,5, observando en ellos una

delgadez aceptable, el 62,5% (25/40) con un IMC normal (18,5 y 24,99) y el 27,5% (11/40) con sobrepeso.

Dieta: En el grupo de los VIH+ el consumo de antioxidantes en la dieta, tipo frutas y verduras es alto, ya que 24 de 43 (55,8%) respondieron afirmativamente y consumen al menos tres nutrientes al día clasificados como antioxidantes; de otra parte, en el grupo de donantes solo el 32,5% (13/40) manifestaron su consumo. No consumen alimentos o suplementos antioxidantes en el grupo de VIH+ el 18,6%, mientras que en el grupo de donantes es el 10%.

Pruebas de estrés oxidativo entre VIH+ y donantes

Respuesta antioxidante total: Para el grupo de donantes la respuesta antioxidante es más alta y homogénea con una media de 0,0426 mM y una desviación típica de 0,00847; mientras que para el grupo de VIH+ la respuesta es de 0,0372 mM con una desviación de 0,01275 ($p < 0,05$) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Respuesta promedio de las pruebas serológicas entre VIH+ y donantes de sangre y prueba de significancia

estadística para la diferencia de medias entre los VIH+ y los donantes con respecto a las pruebas serológicas que miden estrés oxidativo.

		Respuesta Antioxidante Total	Peróxido Plasmático	Índice de Estrés Oxidativo	Índice de Carbonilo	Malondialdehído
Donantes	Media	0,0426	0,2258	570,0911	831,322	0,3338
	DE	0,00847	0,0934	294,872	102,538	0,1031
	N	40	40	40	40	40
VIH+	Media	0,0372	0,2724	894,4052	951,815	0,6038
	DE	0,0127	0,08	598,34605	251,876	0,1616
	N	45	45	45	45	45
	F	5	6,14	9,65	7,97	
	P*	0,028	0,015	0,003	0,006	

*ANOVA. DE=Desviación estándar.

Peróxido plasmático: El peróxido plasmático de donantes obtuvo un valor promedio de 0,2258 mM con una desviación de 0,09348; mientras que para el grupo de VIH+ la media fue de 0,2724 mM con una desviación de 0,08. Este resultado presenta una menor diferencia, pero significativa como se muestra en la tabla de resultados ($p < 0,05$) (Cuadro 2).

Índice de estrés oxidativo: en el grupo de donantes este índice se presenta menor y más homogéneo 570,091 con una desviación de 294,87; en el grupo de VIH+ la media es de 894,41 con una desviación de 598,3. La diferencia intergrupar es significativa (Cuadro 2).

Índice de carbonilo: Para el grupo de donantes la media es de 831,32 nM/mg de proteína sérica con una desviación de 102,5; para el grupo de VIH+ la media es de 951,8 nM/mg de proteína sérica con una desviación de 251,9 ($p < 0,05$) (Cuadro 2).

Malondialdehído: Para el grupo de donantes la media es de 0,3338 μM con una desviación de 0,103; para el grupo de pacientes VIH+, la media es de 0,6038 μM con una desviación de 0,1616. Este parámetro resultó presentar la mayor diferencia intergrupar, convirtiéndose en una diferencia altamente significativa (Cuadro 2).

En el cuadro 3 se muestran las correlaciones entre edad y RAT, a pesar de que la población participante en el presente estudio no se seleccionó para este fin, se pueden ver algunas tendencias, en la población de donantes se observa una

correlación negativa con un coeficiente de Pearson de -0,241, mientras que en la muestra de pacientes con VIH+ el coeficiente de Pearson es de 0,01; es evidente que la Respuesta Antioxidante Total (RAT) en estos pacientes no se afecta con la edad, pero en la población donante va disminuyendo. Esta disminución se prueba con la correlación positiva que se da en este mismo grupo de donantes de sangre entre edad y el índice de estrés oxidativo (Cuadro 3).

Pruebas de estrés oxidativo y otras variables de interés VIH+ y donantes

CD4 Vs Indicadores de estrés oxidativo: no se encontró diferencia significativa en las pruebas de estrés oxidativo y tener los niveles de CD4 mayores de 500 o menores de 200. Excepto la prueba correspondiente al peróxido plasmático con diferencia significativa ($p=0,004$), diferencia que permitirá clarificar el estado clínico del paciente asintomático, no solo con el recuento de CD4, sino con el nivel de este parámetro de estrés oxidativo.

RAT Vs. IMC: La Respuesta Antioxidante Total para el grupo de donantes va disminuyendo con el aumento del IMC, en el grupo de pacientes con VIH+ no hay variación significativa en este parámetro (Cuadro 3).

Cuadro 3. Correlación Edad vs. Respuesta Antioxidante Total (RAT), Edad vs. Peróxido Plasmático y entre IMC vs Rat entre los VIH+ y los donantes.

	Edad-Rat		Edad-PP		IMC-Rat	
	VIH+	Donantes	VIH+	Donantes	VIH+	Donantes
Correlación de Pearson	0,01	-0,241	0,301'	0,258	0,108	-0,335'
P	0,949	0,134	0,045	0,109	0,479	0,035
N	45	40	45	40	45	40

Pacientes VIH+ que Consumen Anti-Retrovirales Versus Pacientes VIH+ que No Consumen Antiretrovirales: Con respecto a las pruebas realizadas para medir el estrés oxidativo, no se encontraron diferencias significativas entre los pacientes VIH+ que tomaron anti-retrovirales y los que no tomaron anti-retrovirales (Cuadro 4).

Cuadro 4. Respuesta promedio de las pruebas serológicas en pacientes VIH+ que reciben o no antirretrovirales (ARV) y prueba de significancia estadística para los sujetos VIH+ que consumen antirretrovirales y las pruebas serológicas que miden estrés oxidativo.

		RAT	Peróxido Plasmático	IEO	Índice de Carbonilo	Malondialdehído
Recibe ARV	Media	0.0388	0.2728	833.07	981.25	0.6094
	N	32	32	32	32	32
	DE	0.0128	0.07956	490.97	267.71	0.17492
No recibe ARV	Media	0.0334	0.2714	1045.36	879.35	0.5899
	N	13	13	13	13	13
	DE	0.0123	0.08447	809.49	198.66	0.12831
Total	Media	0.0372	0.2724	894.4	951.81	0.6038
	N	45	45	45	45	45
	DE	0.01275	0.08004	598.34	251.87	0.16164
F		1,66	0,003	1,16	1,53	0,131
P*		0,204	0,958	0,286	0,223	0,719

*ANOVA. DE=Desviación estándar.

Consumo de Antioxidantes Versus Parámetros: En este grupo de personas participantes en el estudio el consumo de antioxidantes fue muy bajo, por lo cual no se realizaron análisis estadísticos de relación.

Discusión

En recientes estudios se encontró que el estrés oxidativo inducido por la generación de especies reactivas del oxígeno pueden jugar un papel crítico en la estimulación de la replicación del VIH-1 y el desarrollo de la inmunodeficiencia al encontrarse altos niveles de MDA en sangre y una baja repuesta antioxidante total; el incremento de la replicación viral la suponen al observar aumento de la presencia de especies reactivas y disminución de respuesta antioxidante, no presentan pruebas de dicho incremento en la replicación (42); nosotros encontramos similares resultados, altos niveles de marcadores del estrés oxidativo: MDA, PP, IC y baja respuesta antioxidante total (RAT), pero nos abstenemos de afirmar que esto implique aumento en partículas virales circulantes. El aumento del estrés oxidativo se presenta en otras patologías más comunes como la diabetes mellitus tipo-2, especialmente en aquellos pacientes poco controlados, la capacidad antioxidante total se ve disminuida y hay una disminución de antioxidantes de bajo peso molecular (43).

Desde que en 1954 Rebeca Geishman, investigadora argentina, sugirió por primera vez que los radicales libres realizan un papel tóxico en el organismo, que incluso pueden ser generadoras de enfermedad (44), se ha venido investigando la correlación de estos radicales libres con algunas patologías. Con la aparición del Síndrome de Inmunodeficiencia adquirida en la década del 80, se intensificaron los estudios y se mejoraron las técnicas para la medición de radicales libres y de sus productos (45,46). Incluso en la década del 90 se intensifican los estudios que relacionan los efectos de los oxidantes, la respuesta anti-oxidante y varias patologías, incluyendo el Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida (47-49), algunos estudios se realizaron y correlacionaron positivamente el estrés oxidativo y la edad, en el envejecimiento se presenta un incremento en la presencia de radicales libres y una disminución en la Respuesta Antioxidante Total (50,51).

A pesar de ser el primer estudio en Pereira que correlaciona el estrés oxidativo con una patología que genera inmunodeficiencia y de contar con una población restringida a aquellos asociados al programa de SIDA de la ESE salud Pereira, obtuvimos resultados que nos permite aproximarnos a conclusiones similares referenciados en otros estudios (52).

La respuesta antioxidante total (RAT), prueba que mide la capacidad antioxidante del plasma nos permitió diferenciar los dos grupos participantes en el estudio. El grupo de donantes, como se esperaba, presentó una respuesta media mayor que el grupo de VIH+ y su diferencia fue significativa (P menor que 0,05); en el 2009 se publicó un estudio que

medía la capacidad antioxidante total de 64 pacientes VIH + y se comparó con la capacidad antioxidante de personas aparentemente normales, se encontró entre estas dos poblaciones diferencias altamente significativas (0,269 +/- 0,081 vs 0,151 +/- 0,097; normal / VIH+), estas diferencias también se presentaron en nuestro estudio representados en la respuesta antioxidante total.

Los niveles de peróxido plasmático, índice de carbonilo y niveles de malondialdehído, son pruebas que miden el estado de oxidación del plasma y reflejan la respuesta del organismo frente a la agresión oxidativa; permitieron por tanto diferenciar el grupo de pacientes VIH+ de los donantes, los primeros presentaron una mayor capacidad oxidante que los donantes, siendo esta diferencia significativa.

El índice de estrés oxidativo, relación porcentual entre peróxido plasmático y la respuesta antioxidante total, es un buen marcador para definir el grado de estrés oxidativo que presenta un organismo; una baja respuesta antioxidante y niveles elevados de peróxido plasmático nos dan como resultado un alto índice de estrés oxidativo, mientras que el valor bajo de este índice, da cuenta de una respuesta alta antioxidante y bajos niveles de peróxido plasmático, esto es, lo que se presenta en personas sanas.

Llama la atención que en el presente estudio exploratorio no se encontraron diferencias en las pruebas realizadas – Índice de Estrés Oxidativo, Respuesta Antioxidante Total y niveles de malondialdehído- entre los pacientes VIH+ que siguen un tratamiento anti-retroviral y los que no lo siguen, de estos resultados podría sospecharse que el efecto de los antirretrovirales no se da a través del aumento de la respuesta antioxidante, ni de la disminución en plasma de peróxido plasmático o malondialdehído.

Los anteriores resultados nos dan algún sustento para recomendar a la comunidad científica de Pereira, ampliar el uso de las determinaciones de RAT, peróxidos plasmáticos y MDA en estudios poblacionales, a efecto de contar con valores de referencia de las pruebas redox y en investigaciones posteriores ofrecer un alto grado de confiabilidad. De igual forma se debe continuar el estudio vinculando pacientes VIH+ de otras instituciones para validar los resultados de la presente investigación.

Extender el estudio de los agentes oxidantes y de la respuesta antioxidante total a otras patologías, especialmente a aquellas que más afectan a nuestra población, por ejemplo la diabetes mellitus tipo 2, la aterosclerosis o incluso la desnutrición. Desarrollar con el personal vinculado a la salud foros o simposios sobre el tema del estrés oxidativo para socializar este conocimiento e ir generando interés sobre la importancia que tiene la valoración del estado redox durante el manejo de algunas patologías.

Por último, ¿es el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) el responsable de disminuir la respuesta antioxidante total (RAT) e incrementar la concentración plasmática

de las especies reactivas de oxígeno (ERO)? ó ¿son el VIH y la respuesta antioxidante total RAT disminuida una consecuencia de la disminución en la respuesta inmunológica del ser humano afectado?

Agradecimientos

A las instituciones que colaboraron desinteresadamente en la realización de esta investigación, a todos los participantes, colaboradores, al Dr William Martínez por su apoyo en el análisis estadístico, al Dpto. de Medicina Comunitaria de la Universidad Tecnológica de Pereira. In Memoriam: Al profesor: Jorge Rodríguez Rueda (Que fácil hubiese sido terminar este artículo con tu presencia... ¡Haces mucha falta!!!).

Conflicto de intereses:

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

Referencias

- Young IS and Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol* 2001; 54:176-186.
- Droge W, and Holm E. Role of cysteine and glutathione in HIV infection and other diseases associated with muscle wasting and immunological dysfunction. *FASEB J* 1997; 11:1077-1089.
- Nathan C and Shiloh MU. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97:8841-8848.
- Huang FP, Niedbala W, Wei XQ, Xu D et al. Nitric oxide regulates Th1 cell development through the inhibition of IL-12 synthesis by macrophages. *Eur J Immunol* 1998; 28(12):4062-70.
- Mosmann TR and Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989; 7:145-173.
- Peterson JD, Herzenberg LA, Vasquez K and Waltenbaugh C. Glutathione levels in antigen-presenting cells modulate Th1 versus Th2 response patterns. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95(6):3071-3076.
- Fauci AS, Dale DC and Balow JE. Glucocorticosteroid therapy: mechanisms of action and clinical considerations. *Ann Intern Med* 1976; 84(3):304-315.
- Fauci AS, Pratt KR, and Whalen G. Activation of human B lymphocytes. IV. Regulatory effects of corticosteroids on the triggering signal in the plaque-forming cell response of human peripheral blood B lymphocytes to polyclonal activation. *J Immunol* 1977; 119:598-603.
- Papadopoulos-Eleopoulos E, Turner VF and Papadimitriou JM. Is a Positive Western Blot Proof of HIV Infection? *Bio/Technology* 1993; 11:696-707.
- Giraldo RA. SIDA y agentes estresantes. Ed Universidad de Antioquia. 2002; 19-44.
- Bryant HU, Cunningham KA and Jerrells TR. Effects of cocaine and other drugs of abuse on immune responses. En: Lakoski JM, Galloway MP, Whithe FJ. Cocaine: Pharmacology, physiology, and clinical strategies. Boca Raton: CRC Press; 1992: 353-369.
- Goedert JJ. Decreased helper T lymphocytes in homosexual men: II. Sexual practices. *Amer J Epidemiol* 1985; 121:637-644.
- Friedman H, Bendinelli M and Specter S. Drugs of abuse, immunity and infection. New York: Plenum Press; 1995:350.
- Friedman H, Klein TW and Specter S. Immunosuppression by marijuana and its components. En: Ader R, Felten DL, Cohen N. Psychoneuroimmunology. San Diego: Academic Press; 1991; 931-953.
- Gold JM. The enemy within. The high cost of living near nuclear reactors. Breast cancer, AIDS, low birthweights, and other radiation-induced immune deficiency defects. New York: Four Walls Eight Windows; 1996; 346.
- Haverkos HW and Drotman DP. Measuring inhalant nitrite exposure in gay men: Implications for elucidating the etiology of AIDS-related Kaposi's sarcoma. *Genetica* 1995; 95:157-164.
- Holsapple MP, Munson AE and Amos H. Immunotoxicology of abused drugs. En: Dean JH, Luster MI, Munson AE and Amos H. Immunotoxicology and immunopharmacology. New York: Raven Press; 1986; 381.
- James K and Hargreave E. Immunosuppression by seminal plasma and its possible clinical significance. *Immunol today* 1984; 5:357-359.
- Kaminski NE. Mechanism of immune modulation by cannabinoids. En: Dean JH, Luster MI, Munson AE and Kimber I. Immunotoxicology and immunopharmacology. New York: Raven Press; 1994; 349-362.
- Kiecolt-Glaser JK and Glaser R. Psychological influences on immunity. Implications for AIDS. *Amer J Psychol* 1988; 43:892-899.
- Lamoureaux G. Is prior mycobacterial infection a common predisposing factor to AIDS in Haitians and Africans? *Ann Inst Pasteur/Immunol* 1987; 138:521-529.
- Melbye M, Grossman RJ, Goedert JJ, Eyster ME et al. Risk of AIDS after herpes zoster. *Lancet* 1987; 1(8535):728-31.
- Nussenzweig RS. Parasitic disease as a cause of immunosuppression. *N Engl J Med* 1982; 306:423-424.
- Quinn TC, Mann JM, Curran JW and Piot P. AIDS in Africa: An Epidemiologic Paradigm. *Science* 1986; 234:955-963.
- Duesberg PH. AIDS acquired by drug consumption and other noncontagious risk factors. *Pharmac Ther* 1992; 55:201-277.
- World Health. Reaching out to the poorest. *World Health* 1994; 47(6):1-31.

27. Greenspan HC. The role of oxidative oxygen species, antioxidants and phytopharmaceuticals in human immunodeficiency virus activity. *Med Hypothesis* 1993; 40:85-89.
28. Javier JJ. Antioxidant micronutrients and immune function in HIV-1 infection. *FASEB Proc* 1990; 4A: 940-945.
29. Papadopulos-Eleopulos E. Reappraisal of AIDS - Is the Oxidation Induced by the Risk Factors the Primary Cause? *Med Hypothesis* 1988; 25:151-162.
30. Revillard JP, Vincent CM, Favier AC, Richard MJ et al. Lipid peroxidation in human immunodeficiency virus infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1992; 5:637-638.
31. Rabaud CH, Tronel H, Fremont S, May T et al. Radicaux libres et infection par le VIH. *Ann Biol Clin* 1997; 55:565-571.
32. Rabaud CH, Maignan M, Amiel C, Alfandari S et al. Dénutrition et infection par le VIH. *Rev Med Intern* 1996; 17:992-1002.
33. Tang AM, Graham NM, Kirby AJ, McCall LD et al. Dietary micronutrient intake and risk of progression of AIDS in HIV1 infected homosexual men. *Am J Epidemiol* 1993; 138:937-951.
34. Dreyfuss ML and Fawzi WW. Micronutrients and vertical transmission of HIV-1. *Am J Clin Nutrition* 2002; 75:959-970.
35. Jaruga P, Jaruga B, Gackowski D, et al. Supplementation with antioxidant vitamins prevents oxidative modification of DNA in lymphocytes of HIV infected patients. *Free Radic Biol Med* 2002; 32:414-420.
36. García J, del Olmo ML, Gómez-Cambronero LG, Sastre J et al. AZT induces oxidative damage to cardiac mitochondria: Protective effect of vitamins C and E. *Science* 2004; 76(1):47-56.
37. Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clinical Biochemistry* 2004; 37(2):112-119.
38. Benzie IF, Strain JJ. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Meth Enzymol* 1999; 299:15-27.
39. Draper HH, Squires EJ, Mahmoodi H, Wu J et al. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. *Free Radic Biol Med* 1993; 15:353-363.
40. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Meth Enzymol* 1990; 186:464-478.
41. Lowry OH, Roseberg NJ, Farr AL and Randell RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-275.
42. Suresh DR, Annam V, Pratibha K, Prasad BV. Total antioxidant capacity--a novel early bio-chemical marker of oxidative stress in HIV infected individuals. *J Biomed Sci* 2009; 16:61.
43. Błaszczyk R, Kujawski K, Kedziora-Kornatowska K, Kornatowski T, Kedziora J, Szadujkis-Szadurski L, Markuszewski L, Rysz J, Ertel D, Olszewski R. *Pol Merk Lekarski* 2005; 18(103):29-32.
44. Gerschman R. Oxygen poisoning and X-Irradiation. A mechanism in common. *Science* 1954; 119:623-626.
45. Market M, Andrew PC, Babiar BM. Measurement of superoxide production by human neutrophils. *Methods Enzymol* 1984;105:358-65; Freeman BA, Crapo JD. Free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982; 47:412-415.
46. Basaga HS. Biochemical aspects of free radicals. *Biochem Cell Biol* 1989; 68:989-998.
47. Turrens J. Fuentes intracelulares de especies oxidantes en condiciones normales y patológicas. *Antioxidante y Calidad de Vida* 1994;1:16-9.
48. Witztum JL. Role of oxidised low density lipoprotein in atherogenesis. *Br Heart J*. 1993; 69(1 Suppl):S12-S18.
49. Folsom AR, Prineas RJ, Mink PJ, Wu Y, Bostick R. Dietary antioxidant vitamins and death from coronary heart disease in postmenopausal women. *N Engl J Med* 1996; 334:1156-62.
50. Wei YH, Kad SH, Lee HC. Simultaneous increase of mitochondrial DNA deletion and lipid peroxidation in human aging. *Ann NY Acad Sci* 1996; 786:23-34.
51. Sohal RS, Sohal BH, Orr WC. Mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide generation, protein oxidative damage, and longevity in different species of flies. *Free Radic Biol Med* 1995; 19:499-504.
52. Chanarat NN, Chanarat PP, Suttajit MM, Chiewsilp DD. Total antioxidant capacity in plasma of HIV-infected patients. *J Med Assoc Thai* 1997; 80 Suppl 1:S116-S120.