



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
LICENCIATURA EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO
DEPARTAMENTO DE FARMACIA

Tesis presentada como requisito para obtener el título de
Licenciatura en Químico Farmacobiólogo:

**“Establecimiento de límites biológicos de referencia para
marcadores séricos de estrés oxidativo en la Comunidad
Universitaria de la Benemérita Universidad Autónoma de
Puebla”**

QUE PRESENTA

pQ.F.B. DAVID ALEJANDRO CRUZ CRUZ

LUGAR DE REALIZACIÓN

LABORATORIO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO CLÍNICAS

DIRECTOR

D.C. SAMUEL TREVIÑO MORA

CO-DIRECTOR

M.C. HUGO HERNÁNDEZ FRAGOSO

Enero 2025

AGRADECIMIENTOS

A **Dios**, por darme la vida, llenarme de bendiciones y darme la fuerza necesaria para culminar esta etapa tan importante de mi vida.

A **mis padres**, por su amor y su apoyo incondicional además de eterno. Gracias por darme mucho más de lo que merezco siempre, y por inculcarme los valores y la disciplina que me han llevado hasta aquí además de ser mi mayor fuente de inspiración. Todo lo que soy y he logrado es gracias a ustedes y para ustedes. Los amo profundamente.

A **mi hermana**, quien han sido mi red de apoyo emocional y mi inspiración en los momentos más difíciles. Gracias por ser parte fundamental de mi vida.

A **mis tíos**, por ser mis segundos padres en esta vida, por todo su apoyo y cariño incondicional. Muchas gracias tío Chava y tía Eva, por toda la confianza depositada en mí, espero poder un día expresarles todo mi agradecimiento, sin ustedes no hubiera sido posible. Gracias de corazón.

A **mis primos**, Chito y Gaby por su apoyo y compañía a lo largo de toda la vida, especialmente durante estos años, sin ustedes a esta aventura le hubiera hecho falta mucho sabor. Los adoro como a hermanos.

A **Adriana Gutiérrez Estrada**, por estar en esta larga travesía universitaria. Gracias por cuidarme, por quererme, alegrar mi vida foránea y hacerla más ligera, por celebrar conmigo cada triunfo como si fuera tuyo, sin duda eres mi persona y siempre tendrás un lugar más que especial en mi vida.

Al **M.C. Hugo Hernández Fragoso**, jefecito, sensey, maestro Jedi, Dr. Hugo; amigo. Infinitas gracias por todo. Las palabras faltan para agradecerle por todo jefecito, gracias por las risas, los regaños, las desveladas, los enojos, las maldiciones cuando se acababa el papel de la impresora del lector de ELISA, las alegrías cuando obteníamos resultados y por todas esas experiencias inolvidables en el laboratorio. Gracias por aceptarme como esclavo, como Padawan y como tesista. Gracias por toda la dedicación, el tiempo y la confianza en mí, no solo para mi formación profesional si no también personal. Gracias por enseñarme todo lo que sé del laboratorio clínico e investigación, desde una glucosa, ¿recuerda? También por compartir conmigo todo su conocimiento sin escatimar, por fomentar en mí las dudas y la

curiosidad. Gracias por ser una fuente de inspiración y admiración en todo sentido, espero ser como usted cuando sea grande. Gracias por tu amistad, tus consejos y todas las enseñanzas jefecito, sin su apoyo, dedicación, tiempo y esfuerzo esto no hubiera sido posible. Muchas gracias por enseñarme y dejarme ver más allá, muchas gracias por dejarme subir a tus hombros, los hombros de un gigante. ¡Se logró jefe!

Al Dr. Samuel Treviño Mora, por su guía, todo su conocimiento compartido durante este proyecto y en mi formación, además de ser una fuente de admiración y motivación para mí. Por el apoyo y confianza depositada en mí, por exigirme, prepararme y motivarme a lo largo de toda mi formación y en este proyecto, ha sido clave para poder llegar aquí. Gracias por todo siempre, Dr.

Al M.C. José Ángel Francisco Flores Hernández por todo su apoyo, por ser una inspiración para mí, gracias por todas las risas, las bromas, las tasas de café y los vasos de pulque en el laboratorio, por todo el conocimiento académico y la sabiduría para la vida que ha compartido conmigo. Muchas gracias por compartir su curiosidad, inquietud y pasión por el laboratorio clínico, así como por formarme a través de toda su experiencia. Gracias por siempre llegar con una sonrisa con el M.C. Hugo y conmigo. Mil gracias por siempre enseñarme que se puede ser un gran químico y disfrutar de la vida al mismo tiempo.

A mis sinodales D.C Alfonso, D.C. Guadalupe Muñoz y D.C. Rubén, gracias por brindarme sus conocimientos y tiempo para la culminación de este proyecto. A mis profesores, la M.C. Sandra Cuellar, el Dr. Eduardo Brambila, y a todos quienes me acompañaron a lo largo de esta aventura de formación universitaria.

A mis amigos, que sin ustedes este viaje no se hubiera disfrutado tanto. A Sandra Bazán por acogerme como parte de su familia desde el día 1 de la universidad, por enseñarme todo lo que se de Puebla, por su amistad, motivación y apoyo incondicional, sabes que te adoro poblana. A Ana Benítez por siempre estar, por todas las aventuras, locuras, clases y diversión, por todo el cariño y por formar parte del *dream team* universitario, sabes que cuentas conmigo para lo que sea. A Haisha Cortes, la otra parte del equipo oaxaqueño en el labo, por todas las enseñanzas y experiencias inolvidables en el laboratorio, por todo el apoyo y el cariño, eres grande morrita y llegaras lejos. Nos vemos en Oaxaca. A la M.C. Getsemaní

González por siempre motivarme, enseñarme, apoyarme y acogerme como parte del laboratorio desde el primer día que nos conocimos, muchas gracias chica cerebro.

A *todos* aquellos que de alguna forma contribuyeron a este logro, directa o indirectamente, les agradezco de todo corazón. A Fátima, Aldo, Nancy, Francisco, Alejandro, Vicky, Cuyo, Mau, Vaquita y todos aquellos que me acompañaron y ayudaron a lo largo de este maravilloso viaje. A toda mi familia que me adora y los adoro, mis tíos, primos y abuelo que siempre han estado y estarán ahí este logro no es solo mío, sino también de ustedes.

Gracias a todos por ser parte de este viaje inolvidable.

Índice

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUCCIÓN | 7 |
| Un entorno necesariamente letal | 7 |
| Sistema proestrés | 9 |
| Sistema antiestrés | 11 |
| Impacto del estrés en condiciones patológicas | 19 |
| Metodologías de cuantificación | 21 |
| Límites biológicos de referencia | 30 |
| Selección de la muestra | 32 |
| Distribución de los datos | 34 |
| Pruebas de bondad | 35 |
| Transformación de los datos: Normalización | 38 |
| Transformaciones: Escala de Tukey y BOX-COX | 39 |
| 2. JUSTIFICACIÓN | 43 |
| 3. HIPÓTESIS | 44 |
| 4. OBJETIVOS | 44 |
| 4.1 Objetivo general | 44 |
| 6. METODOLOGÍA | 46 |
| 6.1 Selección de la población | 46 |
| Criterios de inclusión | 46 |
| Criterios de exclusión | 46 |
| 6.2 Análisis bioquímico | 47 |
| 6.3 Análisis enzimático | 49 |
| 7. RESULTADOS | 51 |
| 7.2 Parámetros con distribución inicial de tipo normal | 53 |

| | |
|--|-----|
| 7.2 Parámetros con distribución inicial de tipo no normal | 57 |
| 8.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS | 66 |
| 9. CONCLUSIONES | 82 |
| 10.- PERSPECTIVAS | 83 |
| 11. REFERENCIAS | 84 |
| 12. ANEXOS | 95 |
| I. Consentimiento informado | 95 |
| II. Encuesta para la evaluación de la población | 97 |
| III. Resultados de la encuesta para la evaluación de la población | 102 |
| IV. Gráficos Q-Q de cada analito | 111 |
| V. Prueba de χ^2 | 118 |
| VI. Prueba de Kolmogórov-Smirnov | 130 |
| VII. Prueba de Anderson-Darling | 131 |
| VIII Intervalos de confianza | 133 |
| IX. Curvas de calibración | 137 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|-----|
| Tabla 1. Metodologías empleadas para la cuantificación de marcadores de estrés oxidante en suero..... | 23 |
| Tabla 2.- Transformaciones Box-Cox en el intervalo de -2 a 2. De la Guía Gonzalez, s.f. . | 41 |
| Tabla 3. Resultados de los marcadores del estado redox a nivel sérico del género masculino | 51 |
| Tabla 4. Resultados de los marcadores del estado redox a nivel sérico del género femenino | 51 |
| Tabla 5. Docimasia de hipótesis para diferencias estadísticamente significativas atribuibles al género para cada uno de los analitos. | 52 |
| Tabla 6. Condensado de resultados de pruebas de bondad de ajuste KS y AD..... | 56 |
| Tabla 7. Transformación para la corrección de la prueba AD..... | 56 |
| Tabla 8. LBR para cada analito. | 57 |
| Tabla 9. Condensado de resultados de pruebas de bondad de ajuste KS y AD..... | 63 |
| Tabla 10. Transformación para la corrección de la prueba AD..... | 64 |
| Tabla 11. LBR para cada analito. | 64 |
| Tabla 12. LBR por el método no paramétrico para los datos con valor de $p \leq 0.05$ para la prueba de AD..... | 65 |
| Tabla 13. Promedio de edad, talla, peso e índice de masa corporal de la población encuestada..... | 102 |
| Tabla 15. Condensado de resultados con los grupos colapsados (Hombres más mujeres). | 110 |
| Tabla 16. Prueba de χ^2 para la muestra de LT..... | 120 |
| Tabla 17. Prueba de χ^2 para la concentración de 4-HNE | 121 |
| Tabla 18. Prueba de χ^2 para la concentración de MDA | 122 |
| Tabla 19. Prueba de χ^2 para la concentración de nitritos | 122 |
| Tabla 20. Prueba de χ^2 para la actividad de SOD | 123 |
| Tabla 21. Prueba de χ^2 para la concentración de CAT..... | 123 |
| Tabla 22. Prueba de χ^2 para CRFP..... | 124 |

| | |
|---|-----|
| Tabla 23. Prueba de χ^2 para la concentración de ERO's..... | 125 |
| Tabla 24. Prueba de χ^2 para la concentración de glutatión total. | 125 |
| Tabla 25. Prueba de para la concentración de GSH. | 126 |
| Tabla 26. Prueba de χ^2 para la concentración de GSSG..... | 126 |
| Tabla 27. Prueba de χ^2 para la actividad de GRx. | 127 |
| Tabla 28. Prueba de χ^2 para la actividad de GSTx. | 128 |
| Tabla 29. Prueba de χ^2 para la actividad de GPx. | 128 |
| Tabla 30. Valores obtenidos de la prueba de χ^2 | 129 |
| Tabla 31. Resultados de media +/- 1.96*s de cLT, cERO's, CRFP y cMDA..... | 133 |
| Tabla 32. Límites del 95% de los datos transformados con $p > 0.05$ para las pruebas χ^2 y KS con $p \leq 0.05$ para AD. | 133 |
| Tabla 33. Límites del 95% de los datos transformados con $p > 0.05$ para la prueba de AD. | 134 |
| Tabla 34. Intervalos de confianza para los límites del 95 % de los datos. | 134 |
| Tabla 35. Promedio de los intervalos de confianza para los límites del 95 % de los datos. | 135 |

DEFINICIONES.

Las definiciones son retomadas de Mishra et al (2019), Llinás S. (2017), Martínez E. (2020), Díaz Rodríguez M. (2019) y de Tenny S. et al (2023). A partir de estas publicaciones se define:

Población: Conjunto de todos los elementos de interés de un estudio en particular.

Muestra: Subconjunto de la población.

Parámetro: Caracterización numérica de la distribución de la población de forma que describe parcial o totalmente la función de probabilidad (o densidad) de la variable aleatoria de interés.

Media (\bar{x}): Valor promedio matemático de un conjunto de datos. Se calcula sumando las observaciones y esta, dividiéndola por el número de observaciones. Cuando se hace referencia a la media de la población se emplea μ mientras que cuando se habla de la media de una muestra se emplea \bar{x} .

Desviación estándar (s): Parámetro estadístico que permite identificar que tan separados están los valores externos con respecto de su valor medio. Su símbolo poblacional es σ y para el muestral s .

Hipótesis estadística: Afirmación cuantitativa acerca de una o más poblaciones o, lo que es más frecuente, un conjunto de afirmaciones sobre uno o más parámetros de una o más poblaciones.

Grado de confianza ($1 - \alpha$): Indica la probabilidad con la que la estimación de un parámetro estadístico por una muestra también es cierta para la población.

Nivel de significancia (α): Se especifica como la probabilidad de que el investigador esté dispuesto a equivocarse. También puede entenderse como el nivel de incertidumbre que el investigador está dispuesto a aceptar o como la probabilidad que está dispuesto a equivocarse sobre el resultado del estudio.

Valor P (P): Es una probabilidad, según un modelo estadístico específico, de que un resumen estadístico de los datos sea igual o más extremo que su valor observado. El valor P no es la

probabilidad de la hipótesis nula en sí. Es la probabilidad de que, si el estudio se repitiera un número infinito de veces, se esperaría que los hallazgos fueran tan o más extremos que los calculados en esta prueba. También se puede interpretar de manera práctica como el nivel de significancia mínimo en el cual la hipótesis nula sería rechazada.

Errores de tipo I: Rechazar la hipótesis nula cuando en realidad es verdadera.

Errores de tipo II: Aceptar la hipótesis nula cuando es falsa.

Potencia estadística: La potencia de una prueba es la probabilidad de que rechace la hipótesis nula si la hipótesis alternativa es verdadera (por lo tanto, la potencia es el complemento de la probabilidad de un error tipo II) (Wang et al, 2024).

Intervalo de confianza: Es un estadístico para determinar un rango o intervalo, en el cual posiblemente se encuentre un parámetro específico a nivel poblacional a partir de la información obtenida de la muestra.

ABREVIACIONES.

ERO 's. Especies reactivas de oxígeno

ERN 's. Especies reactivas de nitrógeno

SOD. Superóxido dismutasa

CAT. Catalasa

GPx. Glutación peroxidasa

GRx. Glutación reductasa

GSTx. Glutación transferasa

GSH. Glutación reducido

GSSG. Glutación oxidado

ONOO·. Peroxinitrito

PRX. Peroxiredoxinas

MDA. Malondialdehído

4-HNE. 4-Hidroxinonal

LBR. Límites biológicos de referencia

EPTVR. Panel de Expertos en Teoría de Valores de Referencia

IFCC. Federación Internacional de Química Clínica

CLSI. Instituto de estándares clínicos y de laboratorio

IR. Intervalo de referencia.

χ^2 . Prueba de Chi cuadrada

SW. Prueba de Shapiro-Wilk

KS. Prueba de Kolmogórov-Smirnov

AD. Prueba de Anderson-Darling

AUDIT. Prueba para la Identificación de Transtornos debido al consumo de alcohol.

cLT. Concentración de lipoperoxidación total

c4-HNE. Concentración de 4-hidroxinonal

cMDA. Concentración de malondialdehído

cNitritos. Concentración de nitritos

aCAT. Actividad de catalasa

CRFP. Capacidad de reducción férrica del plasma

cERO's. Concentración de especies reactivas de oxígeno

cGT. Concentración de glutatión total

cGSH. Concentración de glutatión reducido

cGSSG. Concentración de glutatión oxidado

aGRx. Actividad de glutatión reductasa

aGSTx. Actividad de glutatión transferasa

aGPx. Actividad de glutatión peroxidasa

aSOD. Actividad de superóxido dismutasa

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Un entorno necesariamente letal

El oxígeno ha sido señalado como un mal necesario, un veneno vital, entre muchas otras formas que hacen referencia a sus atributos paradójicos en torno a su función en la naturaleza humana. El oxígeno en su disposición molecular cuenta con atributos que le permiten ser un excelente mediador de procesos óxido-reducción de vital importancia para el desarrollo celular. Sin embargo, en su misma facilidad de reacción con electrones, puede desencadenar en estados de estrés celular, y pese a que son moléculas necesarias e importantes para una variedad amplia de funciones, también se relacionan con el desarrollo y el estado patológico de diversas enfermedades (Moisés E. et al, 2020).

El estrés celular es generado por el metabolismo para la obtención de energía. De manera puntual, es asociado a la concentración de especies reactivas, así como de la capacidad que tenga el ambiente celular para la eliminación o modulación de éstas. El nombre de cualquier especie reactiva está en función de la naturaleza del átomo reactivo que la compone (Sies et al, 2020), de forma que las especies reactivas de oxígeno (ERO's) son en esencia un grupo de subproductos del metabolismo aeróbico que incluyen al peróxido de hidrógeno (H_2O_2), anión superóxido ($\bullet O_2^-$) y el radical hidroxilo ($\bullet OH$), cuyo átomo central es el oxígeno.

Por su parte, las especies reactivas de nitrógeno (ERN's) son otro grupo muy importante de especies reactivas que en los últimos años se comenzaron a analizar como mediadores de procesos de transducción de señales en lugar de oxidantes inespecíficos de macromoléculas. Las ERN's comparten de manera general a un progenitor común, el óxido nítrico ($\bullet NO$) y es a partir de este progenitor común que se generan las diversas reacciones como la nitrosilación o la formación de derivados dentro de las ERN's como el peroxinitrito. El $\bullet NO$ es un mensajero intercelular omnipresente en todos los vertebrados, con una amplia participación en la modulación del flujo sanguíneo, los procesos trombóticos y la actividad neuronal. Las ERN's son moléculas activas dentro del sistema nervioso central, los procesos apoptóticos celulares, la eliminación de bacterias por parte del sistema inmunológico a través del estallido respiratorio, entre muchos otros procesos celulares (Adams L. et al, 2015).

Sin embargo, y aún con toda la participación de las ERN's en los procesos de regulación y adaptación celular, la sobreproducción o la desregulación de éstas y/o sus derivados son

perjudiciales generando respuestas inflamatorias crónicas, daño tisular por oxidación de proteínas, afecciones al metabolismo celular por peroxidación lipídica, daño mitocondrial e incluso daño a nivel de DNA, siendo todos estos procesos fisiopatológicos que se han descrito en enfermedades cardiovasculares, neurodegeneración, diabetes y varias patologías más (Pacher P. et al, 2007).

Es importante destacar que el término ERO's o cualquier grupo de especies reactivas, incluye a un grupo de moléculas que son formadas por óxido-reducción (reacciones redox) o reacciones por excitación de electrones (Schieber et al, 2014).

Las especies reactivas presentan una función de hormesis en cada tejido, este término engloba el hecho que, a concentraciones bajas, las especies reactivas de oxígeno o nitrógeno inducen efectos favorables y necesarios, en muchos casos, para la señalización, adaptación y desarrollo celular. No obstante, a concentraciones altas estos mismos productos pueden generar efectos nocivos o tóxicos dentro del mismo entorno celular. Esta respuesta bifásica o de dualidad es catalogada por muchos autores, por ejemplo, Schieber y Chandel (2014), como un rasgo evolutivo, puesto que se han descrito mecanismos de activación de factores de transcripción que inducen estados de estrés controlados al interior de seres procariontes, donde se presume que estos mecanismos tienen el objetivo de adaptarse a situaciones de cambios en su entorno.

En un consenso, para poder diferenciar cuando se hace referencia a uno u otro momento de las actividades duales del estrés celular se han acuñado dos términos. Uno de ellos es el estrés oxidativo, donde se engloban todos los procesos de óxido-reducción y de señalización redox que se dan de manera fisiológica y se encuentran dentro de la misma homeostasis celular. Por otra parte, se tiene al estrés oxidante o diestrés, término bajo el cual se engloban las situaciones donde el balance estrés-antiestrés se ha perdido, y se comienzan a generar estados de disfunción celular e incluso se ha asociado a estados patológicos puntuales como lo son enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson, Huntington, etc.), trastornos hepáticos y renales, fibrosis quística, diabetes, enfermedades cardiovasculares, enfermedades virales por ejemplo la COVID-19 y cáncer (Vázquez-Meza et al, 2023).

Cuando se habla de la producción de estrés, se debe considerar que tanto los procesos de generación de este, así como sus concentraciones, se encuentran regidos por mecanismos muy bien regulados. Estos mecanismos, concentraciones y las acciones llevadas a cabo por

estas moléculas se estudian en el marco de lo que ahora se conoce como señalización o biología redox (Schieber et al, 2014).

El sistema redox se puede dividir en dos grandes rubros, donde uno estaría conformado por todas las moléculas prooxidantes y su contraparte para generar el balance conocido como sistema antioxidante, conformado por moléculas ya sea de carácter enzimático o no enzimático que se encargan de mantener en concentraciones adecuadas a los agentes estresores.

1.2 Sistema proestrés

Dentro de los prooxidantes se contemplan tanto a las ERO's, como a las ERN's. Las ERO's principales son el $\bullet\text{O}_2^-$, H_2O_2 y $\bullet\text{OH}$, mientras que la principal ERN es el óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$) (Indo et al, 2017).

La formación de estas biomoléculas sigue rutas diferentes, las cuales están bien reguladas y compartimentadas, de tal forma que las interacciones generadas a raíz de estas moléculas se ven determinadas tanto por la concentración como por la ubicación en los diferentes compartimentos celulares. De manera cuantitativa, las mitocondrias y los complejos enzimáticos como la familia de oxidorreductasas de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH) conocidas como la familia NOX se consideran los contribuyentes celulares más importantes a la generación de anión $\bullet\text{O}_2^-$ y H_2O_2 , sin embargo, existen otros mecanismos que también colaboran a la concentración de ERO's a nivel celular como: los peroxisomas, en el proceso de beta-oxidación de ácidos grasos; los procesos de metabolismo de xenobióticos como el complejo P450; la estimulación de procesos fagocíticos; así como la actividad de diversas enzimas a nivel de citoplasma como las ciclooxigenasas (Kamiński et al, 2013).

De manera prácticamente consensuada para los investigadores, entre ellos Mohinder Bansal y Naveen Kaushal, se considera que la mitocondria es la principal fuente de especies reactivas y en consecuencia uno de los grandes generadores de estrés oxidante a nivel celular. Este atributo es a consecuencia que inherentemente durante la síntesis de ATP se generan ERO's. Al llevar a cabo todas las reacciones oxido-reducción necesarias, principalmente por la cadena respiratoria, un porcentaje de alrededor del 2 o 3% del total de electrones, se fugan para reaccionar con el oxígeno en estado molecular y activarlo, generando así al anión

superóxido. Este anión es el principal subproducto del metabolismo aeróbico. Este se forma a partir de la reducción de un electrón hacia un oxígeno en estado molecular, obteniéndose así $\bullet\text{O}_2^-$. De acuerdo con varios protocolos experimentales desarrollados, los electrones para formar el anión superóxido se liberan predominantemente en dos sitios de la cadena de transporte de electrones: el complejo I (conocido también como NADH: ubiquinona oxidoreductasa) y el complejo III (ubiquinona-citocromo c reductasa) (Drose et al, 2012; Lambert et al, 2009; Kamiński et al., 2013; Indo et al, 2017).

A pesar de que la mitocondria es considerada el contribuyente principal en la formación de $\bullet\text{O}_2^-$ se debe de puntualizar que no es el único sitio donde se puede llevar a cabo su formación, otras localidades de formación son las diferentes enzimas oxidasas presentes en la célula. Estas enzimas incluyen a la familia NOX y a la familia de la xantina oxidasa (XO).

Las enzimas de la familia NOX están presentes en células como: linfocitos, fibroblastos, células endoteliales, miocitos y condrocitos donde tienen funciones vitales en cuanto a la regulación de la respuesta celular. Un estímulo clásico es la infección por invasión microbiana donde se activa la familia NOX seguida del estallido respiratorio para contrarrestar la infección. En esta reacción, las moléculas de NADPH sirven como donador de electrones para la activación de NOX en la membrana plasmática para producir algunos productos tales como, radicales superóxido de una molécula de oxígeno molecular (Kohen et al (2002), citados en Mohinder B. et al, 2014).

La familia de las XO, por su parte, son enzimas no hémicas que se encuentran en el citosol, estas enzimas también son una fuente importante de anión superóxido y peróxido de hidrógeno principalmente en condiciones de hipoxia, donde su función de xantina oxidoreductasa (XOR) permite el paso de su forma de deshidrogenasa a oxidasa al usar oxígeno molecular como aceptor de electrones y generar como subproductos $\bullet\text{O}_2^-$ y H_2O_2 (Mohinder B. et al, 2014).

Por otro lado, la biosíntesis del H_2O_2 , es considerado como una segunda parte, siendo un producto secundario a la acción catalítica enzimática. El primer paso para la generación de H_2O_2 es la formación del $\bullet\text{O}_2^-$, el cual entra en contacto y reacciona con los protones del agua intracelular, generando como producto al H_2O_2 . Esta reacción de biotransformación también

es facilitada y catalizada por la superóxido dismutasa (SOD), en cualquiera de sus tres isoformas: mitocondrial, citoplasmática o extracelular (Kamiński et al, 2013).

La concentración de peróxido en la célula tiene efectos benéficos a concentraciones controladas, sin embargo, la vida media del mismo estará en función del estado redox citoplasmático, ya que su descomposición espontánea se ve acelerada en situaciones donde hay una fuerte capacidad reductora. Para su degradación se cuenta con un sistema enzimático, donde enzimas como la catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) o las peroxiredoxinas regulan de manera activa su concentración, evitando cambios oxidativos irreversibles que puedan desencadenar alteraciones no favorables para el desarrollo o supervivencia celular (Kamiński et al, 2013).

En presencia citoplasmática de metales de transición en estado reducido (p. ej., Fe^{2+} o Cu^{2+}), el H_2O_2 puede ser biotransformado mediante la reacción de Fenton en $\bullet\text{OH}^-$, los cuales son altamente agresivos y tóxicos (Kamiński et al., 2013). En la reacción de Fenton el $\bullet\text{O}_2^-$ dona un electrón a un ion férrico (Fe^{3+}) para formar ion ferroso (Fe^{2+}), que a su vez reduce el peróxido de hidrógeno y provoca una fisión homolítica del enlace oxígeno-oxígeno para formar un oxidante muy potente como lo es el $\bullet\text{OH}^-$ (Day y Suzuki, 2005). Es por este motivo que la concentración y accesibilidad de los metales de transición están estrictamente controladas por metaloproteínas como la ferritina, la transferrina o la ceruloplasmina al interior de la célula.

Por otro lado, el óxido nítrico se produce a través de la acción de la óxido nítrico sintasa (NOS), en cualquiera de sus tres isoformas: neuronal (nNOS), inducible (iNOS) y endotelial (eNOS). De estas tres isoformas, las isoformas nNOS y eNOS se expresan constitutivamente, y su actividad se encuentra regulada por la concentración de Ca^{2+} intracelular. No obstante, la isoforma iNOS debe su expresión y por lo tanto su activación a estímulos, como lo pueden ser citocinas o lipopolisacáridos (Kamiński et al, 2013).

Las principales defensas de las células eucariotas contra la oxidación incluyen las enzimas antioxidantes SOD, CAT y el sistema glutatión (Day et al, 2005). Todas estas defensas celulares componen lo que se conoce como el sistema antioxidante o antiestrés.

1.3 Sistema antiestrés

El sistema antiestrés a través de sus diversos mecanismos da paso a la contraparte necesaria para mantener regulados los mecanismos proestrés. Este sistema está compuesto

por enzimas como SOD, CAT, peroxiredoxinas, GPx, glutatión reductasa (GRx), glutatión transferasa (GSTx) y componentes no enzimáticos en donde se contempla el glutatión, ya sea en su estado reducido u oxidado (GSH o GSSG, respectivamente), así como a la vitamina A, vitamina C, vitamina E, bilirrubinas, uratos, carotenoides y polifenoles (Indo et al, 2017).

El sistema antioxidante se puede dividir por su composición y/o mecanismo de acción biológico en: enzimático y no enzimático, así como también de acuerdo con su ubicación con respecto al ambiente celular, de forma que se tiene un sistema antioxidante a nivel intracelular, a nivel de intersticio y a un nivel extracelular o en circulación.

En el ambiente intracelular el sistema antioxidante estará compuesto principalmente por la SOD, CAT y el sistema glutatión.

1.3.1 Sistema intracelular

El término de SOD, incluye una familia de metaloenzimas que tienen un papel primordial en la defensa antioxidante contra el estrés oxidativo. Esta familia enzimática se ha detectado en eucariotas y algunas especies procariotas. Además, se ha compartimentado partiendo de la distribución y los metales que emplea cada una de las isoformas. Hasta la fecha se han establecido 3 principales isoformas de SOD (Fig. 1). La SOD1 es un homodímero de 88 kDa codificado por un gen en el cromosoma 21q22, que emplea metales de transición como el cobre o zinc (en adelante se hará referencia a esta isoforma como Zn-SOD) y su ubicación es en el citosol y la intermembrana mitocondrial. La SOD2 por su parte, es una proteína homotetrámera menor, de aproximadamente 32 kDa, la cual es codificada por un gen en el cromosoma 6q25.3, esta enzima se distribuye en la matriz mitocondrial y la membrana interna mitocondrial y para catalizar su reacción emplea el manganeso. Finalmente, la SOD3 es una glicoproteína en forma de homotetrámero que para su reacción emplea también a el cobre y zinc, con la diferencia que esta isoforma se va a encontrar en el compartimento extracelular y es codificada por un gen en el cromosoma 4 (Rosa et al, 2021).

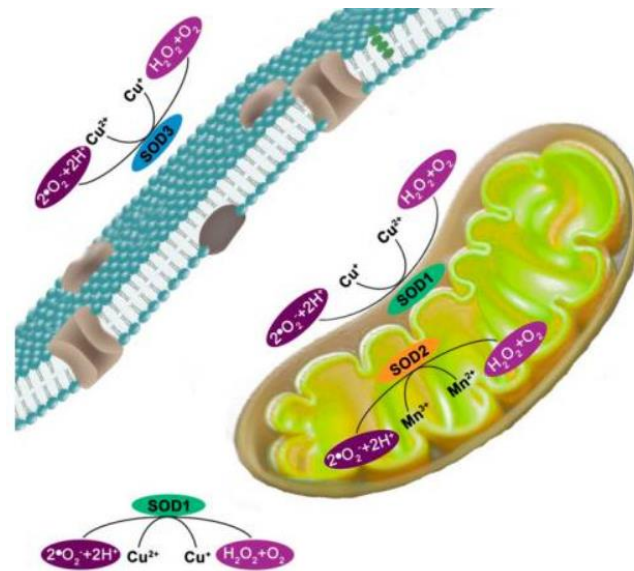
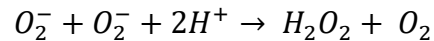


Figura 1: Isoformas de SOD y su distribución. Adaptado de Rosa et al (2021)

El mecanismo de acción de la familia de SOD emplea las concentraciones de anión superóxido producido a través de los mecanismos antes descritos y los protones disponibles en el medio, para generar como productos peróxido de hidrógeno y oxígeno en estado molecular. La reacción se condensa a continuación:



Esta reacción es sumamente eficaz, Thannickal et al (2000) señalan que la velocidad de la reacción de dismutación es $1.6 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

La actividad de la familia SOD se ha señalado como divalente, esto a consecuencia de que el producto final de su acción es el H_2O_2 , en un ambiente redox adecuado, la actividad enzimática se dará de forma regulada, en consecuencia se van a obtener concentraciones de peróxido de igual manera reguladas y con ello, se favorece que la actividad de la SOD se acople a la actividad de otras enzimas como CAT y GPx evitando así concentraciones tóxicas de H_2O_2 , no obstante SOD podría actuar como prooxidante ya que el H_2O_2 puede aumentar de forma intracelular y con ello genera una acumulación tóxica dentro de la misma célula.

A través de varios ensayos, como el realizado por Nelson y colaboradores (1994) en células aisladas de corazón, se ha demostrado que a dosis bajas la SOD muestra acción protectora mientras que a dosis altas puede exacerbar las concentraciones de ERO's intracelulares. No

obstante, junto con el aumento de la actividad de SOD, y en consecuencia la elevación de las concentraciones de H_2O_2 , se induce una regulación positiva de CAT y/o GPx, lo que al final genera un equilibrio antioxidante como una respuesta de defensa compensatoria.

Sumado a la actividad de SOD sobre el anión superóxido, esta enzima también participa, al menos parcialmente, en la eliminación de peroxinitrito (ONOO^-), que se forma a partir de la reacción entre $\bullet\text{NO}$ y $\bullet\text{O}_2^-$. Una vez que se genera el ONOO^- puede formar rápidamente radicales libres reactivos al reaccionar con CO_2 , es ahí donde SOD también previene este evento y con ellos las consecuencias perjudiciales que pudiesen generar estos radicales libres (Rosa et al, 2021)

Como ya se ha mencionado, la reacción catalizada por la SOD debe acoplarse a otros complejos enzimáticos para llevar a cabo la degradación completa del $\bullet\text{O}_2^-$, una de las más importantes para este mecanismo es la CAT. La catalasa es sin duda una de las enzimas que contribuye de manera sustancial a la regulación y control de las condiciones de estrés oxidativo de manera intracelular. El H_2O_2 , cuenta con una vida media relativamente larga con respecto de las demás especies radicalarias, la vida media del peróxido de hidrógeno a partir de linfocitos se establece en aproximadamente 1 ms, mientras que la del superóxido es de 1 μs (Bienert et al., 2006).

La CAT logra catalizar la reacción de descomposición de dos moléculas de peróxido de hidrógeno en una molécula de oxígeno y dos moléculas de agua a través de una reacción de dos pasos. De acuerdo con Nandi et al., (2019), que cita a Ivancich et al., y Lardinois, el primer paso del mecanismo de la reacción se logra cuando se forma un compuesto intermedio I el cual es una especie de oxiferril covalente ($\text{Fe}^{\text{IV}}\text{O}$) como producto de la reducción de una molécula de peróxido de hidrógeno, de manera inmediata en la reacción de segundo paso el compuesto I se reduce mediante reacciones redox a través de una transferencia de dos electrones desde la segunda molécula de peróxido de hidrógeno que actúa como un donante de electrones para producir la enzima libre, oxígeno y agua como productos finales. En las células eucariotas la CAT elimina principalmente el H_2O_2 generado por las oxidasas peroxisomales, aunque también puede descomponer moléculas de peróxido que difunden a los peroxisomas desde el citosol.

La catalasa es la única enzima que puede metabolizar el H_2O_2 sin necesidad de cofactores, no obstante, también existen otras enzimas como los son: la glutatión peroxidasa (GPx),

citocromo c peroxidasa y las peroxiredoxinas (PRX) que pueden metabolizar al H_2O_2 (Nandi et al, 2019). Como se ha explicado la catalasa emplea su grupo hemo para la degradación del peróxido de hidrógeno, mientras que por su parte la GPx y la PRX actúan a través de sus residuos de selenocisteína o cisteína y necesitan acción conjunta de glutatión y tiorredoxina para poder completar el ciclo catalítico, además de cofactores como NADPH para poder regresar a su estado reducido los factores que fueron oxidados (Gebicka et al, 2019).

El sistema glutatión se compone de GSH, GSSG, GPx, GRx y GSTx. La acción en conjunto de estas moléculas permite la regulación de manera fina del ambiente redox celular. El glutatión (L-gamma-glutamil-L-cisteinil-glicina) abreviado GSH, muchas veces denominado glutatión reducido o simplemente glutatión; es un tripéptido formado por una serie de reacciones enzimáticas que se compone por glicina, cisteína y glutamato. Esta molécula es el tiol no protéico más abundante en las células de mamíferos, alcanzando concentraciones mM, y cuya función es la de actuar como un agente reductor e importante antioxidante intracelular, siendo uno de los principales responsables en llevar a cabo un estricto control del estado redox intracelular (Franco et al, 2009).

Por sus concentraciones, como por sus funciones antes mencionadas el GSH es considerado la principal defensa antioxidante intracelular. Su distribución se ha estimado alrededor del 85-90% en el citosol, aunque también se ha señalado su compartimentación posterior a su síntesis citosólica hacia diversos organelos como las mitocondrias, los peroxisomas y la matriz del retículo endoplásmico. Se ha demostrado la participación del sistema glutatión, en la eliminación de moléculas como el anión superóxido, el radical hidroxilo y el oxígeno singlete, además de participar en la desintoxicación catalítica de peróxido de hidrógeno, peroxinitritos y peróxidos lipídicos, éstas últimas reacciones llevadas a cabo a través de las GPx (Franco et al, 2009).

Los procesos de eliminación vinculados de manera directa con el sistema glutatión se llevan a cabo gracias a la oxidación de la molécula de glutatión a su radical tiol (GS^{\cdot}), esto a través de la donación de electrones, y es a partir de estos radicales donde se favorece la formación de enlaces disulfuro entre dos moléculas lo que genera como producto la formación de GSSG, que se denomina la forma de glutatión oxidada (Franco et al, 2009).

En condiciones fisiológicas, el GSSG se mantiene alrededor del 1% con respecto a las concentraciones celulares totales de glutatión, esto se le atribuye en gran medida a que esta

molécula se reduce de nuevo a la forma reducida de GSH por la acción de la GRx (Franco et al, 2009).

La GRx es la enzima encargada de mantener las concentraciones de GSH a nivel celular casi a un nivel constante dentro del sistema. Una vez que se lleva a cabo la oxidación del glutatión a su forma oxidada por el ataque de las ERO's o bien por los mecanismos de las GPx y/o las GSTx. La GRx cataliza la reducción del GSSG a GSH empleando la molécula de NADPH como cofactor reductor de manera que es la actividad de la GRx junto con las concentraciones de GSH y GSSG los principales factores que van a determinar las condiciones redox y el control del estado redox de la célula en forma general (Pannala et al, 2013).

Por su parte las GPx, que también forman parte de todo el sistema de glutatión celular, son, una familia de selenoproteínas, que son encargadas de la reducción de los peróxidos, sin embargo, cada una de las isoformas varía de acuerdo con su ubicación y/o especificidad de sustrato. La isoforma que se encuentra prácticamente en el citoplasma de todos los tejidos de mamífero es la isoforma GPx1, la cual presenta una gran afinidad hacia el peróxido de hidrógeno como sustrato. En paralelo con esta isoforma podemos encontrar algunas como la GPx2 que es una enzima intersticial y extracelular, y a la GPx4 que también es conocida como fosfolípido hidroperóxido glutatión peroxidasa (PHGPx) (Franco et al, 2009).

El sistema glutatión y en específico la acción de GSTx con las concentraciones presentes de GSH participan, además, en la detoxificación celular de moléculas más complejas como los xenobióticos. Esto a través de la conjugación de compuestos con centros electrófilos hacia las moléculas de glutatión con lo que se logra el generar compuestos de mayor facilidad para su eliminación, al aumentar su solubilidad (Galleguillos et al, 2012). Las enzimas GSTx se han clasificado en tres familias, las GSTx citosólicas, las GSTx mitocondriales y las GSTx microsomales, estas últimas son proteínas asociadas a la membrana que participan en el metabolismo de los eicosanoides y el glutatión.

De manera clásica la acción de la GSTx se veía desde la perspectiva de la detoxificación de diversos compuestos que, al conjugarse con el glutatión, se aumentaba su eliminación ya sea por su aumento en la solubilidad o bien por mecanismos mediados a través de las proteínas como la familia de caseteras ABC. No obstante, hoy se ha establecido que la acción de las GSTx también participa de manera activa en procesos como la eliminación de peróxidos y la síntesis de moléculas incluido la síntesis de esteroides y leucotrienos (Oakley, 2011).

Dado que muchas de las moléculas prooxidantes tienen movimiento desde la parte citoplasmática hacia la parte extracelular, por ejemplo, el H_2O_2 a través de las acuaporinas, o se pueden generar directamente en el espacio extracelular, necesario mantener un sistema antioxidante a nivel extracelular.

1.3.2 Sistema extracelular

El sistema antioxidante a nivel extracelular está compuesto por vitaminas, A, C, E, carotenos, polifenoles, bilirrubina y la actividad de algunas enzimas de expresión extracelular como la SOD3. Dentro de los principales componentes de este sistema tenemos a las vitaminas y los betacarotenos. La vitamina E es una vitamina liposoluble que presenta un alto poder antioxidante. De los ocho estereoisómeros posibles, solo el alfa-tocoferol es la forma más bioactiva en humanos. Gracias a su carácter liposoluble el alfa-tocoferol protege a las membranas celulares del daño causado por los radicales libres, sobre todo frente a procesos como la peroxidación lipídica. A tal grado que, el alfa tocoferol y el ascorbato son considerados como los antioxidantes de bajo peso molecular más importantes en el plasma humano (Stocker et al, 1991).

Por su parte el betacaroteno, es un miembro de los carotenoides que es soluble en grasa y es considerado dentro de los compuestos como provitaminas dado que puede convertirse en vitamina A activa. El betacaroteno que se convierte en retinol es un fuerte antioxidante y se ha propuesto como el mejor extintor del oxígeno singlete y una gran cantidad de especies radicales. Ensayos como los de Jialal y colaboradores (1991) dejaron en evidencia que los carotenos disminuyen de manera notable los procesos de lipoperoxidación lipídica a través de la medición de estos productos lipídicos por la técnica de TBARS. Además de los ya mencionados, a nivel de circulación se ha identificado la acción antioxidante de moléculas presentes de manera notable como es el caso del ácido úrico y la bilirrubina.

Los uratos, muchas veces conocidos como “ácido úrico”, debido a su alta concentración puede considerarse como el antioxidante hidrofílico mayor en el plasma humano. Se ha mencionado que el urato puede formar complejos con metales divalentes como el hierro y cobre con lo cual tendría de igual forma participación en los mecanismos antioxidantes (Karten et al, 1997).

Otro componente del cual también se han señalado acciones antioxidantes es la bilirrubina. La bilirrubina forma parte de moléculas antioxidantes no proteicas presentes en el plasma

humano. Uno de los principales mecanismos propuestos fue la de participar como un antioxidante que interrumpe la reacción en cadena de los radicales libres y con ello proteger a través de su forma de “extintor” de radicales libres y/o especies reactivas. No obstante, el grupo de Neuzil y colaboradores (1994), señalaron que otra vía de participación de la bilirrubina en el sistema redox sería por su acción como “co-antioxidante”, este mecanismo de acción se propuso dado que se había descrito que el radical alfa tocoferilo (resultante de la interacción del alfa tocoferol con radicales libres) propagaba el proceso de lipoperoxidación lipídica sin embargo, la bilirrubina libre o unida a la albúmina disminuía de manera notable esta efecto adverso, de manera que actuaría de manera sinérgica con antioxidantes no proteicos como las vitaminas protegiendo principalmente los procesos de lipoperoxidación lipídica.

También dentro de los compuestos polifenólicos podemos encontrar a los flavonoides, los cuales se encuentran presentes en la mayoría de las plantas. De acuerdo con su estructura química se han identificado más de 400 flavonoides, sin embargo, de manera general los beneficios y su mayor colaboración hacia el estado fisiológico se da por su potente actividad antioxidante.

Finalmente, a nivel de circulación también se cuenta con moléculas que si bien no participan de manera directa en la eliminación de ERO's, se ven fuertemente involucradas en el control del sistema redox sistémico, entre estas moléculas podemos encontrar al selenio y la albúmina.

El selenio es un oligoelemento presente en una gran y amplia variedad de lugares como lo son: el agua, las verduras como ajo, cebollas, cereales, nueces y sojas, así también como otras fuentes como mariscos, carne, hígado y levadura. Su importancia dentro de todo el balance redox está en que participa y forma el sitio activo de varias enzimas antioxidantes como lo son las GPx.

Por su parte la albúmina se ha propuesto como uno de los principales factores que participan en la regulación y mantenimiento redox del espacio intravascular. De acuerdo con Turell y sus colaboradores (2009), la albúmina representa alrededor del 80% de los tioles reducidos presentes en circulación, esto a consecuencia de su alta concentración a nivel plasmático y la presencia de un residuo tiol reducido Cys34 en su estructura. El principal mecanismo que se ha propuesto para la participación de la albúmina en el estado redox es la formación de ácido

sulfénico gracias a la reacción del tiol y diversas ERO's como H₂O₂ y peroxinitritos, donde este estado puede dar paso a la formación de ácido sulfónico y sulfínico en respuesta al ambiente redox. Su impacto en el control del estado redox se da no solo a nivel plasmático sino también a nivel extravascular, esto gracias a que, a lo largo de sus 27 días de vida media, puede tener ciclos de salida al espacio extravascular y retornos al espacio plasmático de alrededor de 23 horas de duración, lo cual, lo coloca como un participante crítico en los procesos de regulación redox a nivel sistémico. Debe denotarse que, aunque en perspectiva con otras velocidades de reacción y especificidad, las de albúmina no sea tan alta, ejemplo contra la velocidad y afinidad del glutatión, la gran concentración sérica de esta proteína lo coloca como una vía importante de eliminación de agentes prooxidantes a nivel plasmático. Como se ha podido denotar, el plasma humano contiene varias líneas de antioxidantes y co-antioxidantes no proteicos, que en conjunto con la acción antioxidante de algunas proteínas como la albúmina y las moléculas antioxidantes endógenas del sistema como el glutatión junto con los antioxidantes captados de la dieta van a controlar el fino equilibrio dinámico necesario en el ambiente intravascular y extracelular a nivel somático.

No obstante, bajo ciertas condiciones se ha demostrado un aumento de ERO's, lo que lleva a una ineficiencia del sistema antioxidante. Estas condiciones se han descrito y relacionado con diversas patologías.

1.4 Impacto del estrés en condiciones patológicas

El aumento del estrés oxidante generalmente describe una condición en la que las defensas antioxidantes celulares son inadecuadas para inactivar completamente las ERO's y ERN. Esto puede darse a consecuencia del incremento súbito o crónico de sus concentraciones, o bien debido al declive o pérdida de la defensa antioxidante (Dalle-Donne et al, 2006).

La interrupción del equilibrio dinámico entre moléculas proestrés y antioxidantes puede verse a través de alteraciones en diversos productos de las ERO's o alteraciones en la actividad de diversas enzimas del sistema redox.

Un ejemplo de ello es cuando la concentración de malondialdehído (MDA) se encuentran en exceso, pueden combinarse con grupos amino libres de proteínas, principalmente con residuos de lisina mediante la adición de Michael, produciendo aductos proteicos

modificados con MDA. Se ha demostrado que las proteínas modificadas con MDA son inmunogénicas y se han detectado autoanticuerpos contra éstas en el suero de conejos y humanos. También se ha informado que el título de estos autoanticuerpos se asocia con la carga de la aterosclerosis y el infarto de miocardio, prediciendo su progresión. Los títulos más altos de autoanticuerpos también se han asociado con la enfermedad de las arterias coronarias. También se han puntualizado condiciones donde la concentración plasmática de MDA aumenta, como sucede en diabetes, preeclampsia, en plasma y condensados del aliento de asmáticos, en pacientes que padecen la enfermedad de Parkinson (EP), esclerosis lateral amiotrófica (ELA), así como en el cerebro de personas que padecen la enfermedad de Alzheimer (EA) (Dalle-Donne et al, 2006).

Una gran cantidad de ensayos ha abordado estas alteraciones en los niveles de MDA en el entorno de enfermedades específicas. Uno de ellos es el de Bhutia y sus colaboradores (2011), donde a partir de un grupo control se analizó la asociación de los niveles de MDA y las complicaciones de un grupo de pacientes con diabetes tipo 2, este ensayo mostró diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, siendo la media del grupo de estudio $2.65 \pm 1.33 \mu\text{mol/L}$ contra $0.93 \pm 0.39 \mu\text{mol/L}$ que fue la concentración media del grupo control. Dentro de este mismo artículo los autores concluyen que los pacientes diabéticos aumentan sus niveles de MDA dado que se encuentran expuestos a mecanismos de estrés oxidativo y procesos de lipoperoxidación asociados a los altos niveles de glucosa sérica.

De forma análoga en condiciones de estrés oxidante, la concentración de 4-hidroxi-nonenal (4-HNE) aumenta significativamente en plasma y tejidos. Durante un estrés oxidante intenso, por ejemplo, en pacientes con enfermedades reumatológicas graves como artritis reumatoide, esclerosis sistémica, lupus eritematoso, linfedema o insuficiencia renal crónica, la concentración de 4-HNE sérica aumenta entre 3 a 10 veces con relación a la concentración fisiológica (Uchida, 2003; Esterbauer et al, 1991).

En el mismo sentido, ha sido bien establecido que una disminución en la concentración de GSH puede estar asociada con el envejecimiento, así como en la patogénesis de muchas enfermedades, entre ellas artritis reumatoide, ELA, SIDA, EA, enfermedad hepática alcohólica, cataratas, síndrome de dificultad respiratoria, enfermedades cardiovasculares y síndrome de Werner.

Una relación GSH/GSSG disminuida son indicadores de estrés oxidativo/nitrosativo en la enfermedad cerebral isquémica, enfermedades cardiovasculares y cáncer. También se observan consistentemente concentraciones reducidas de GSH en ambos tipos de diabetes. Asimismo, se han reportado concentraciones bajas de GSH y una relación GSSG/GSH elevada en sangre de pacientes con cáncer de mama y de pulmón, cirugía coronaria y preeclampsia. El sistema GSH también se altera en condiciones inflamatorias pulmonares. En su publicación de 2020, Pérez y colaboradores mostraron una asociación entre una concentración menor de GSH total a nivel plasmático y una mayor tasa de desarrollo de multimorbilidad a lo largo de 6 años en una muestra de adultos mayores. Estos hallazgos sugirieron que la disminución del GSH podría usarse para monitorear la gravedad y el progreso de las enfermedades. Por el contrario, la concentración sanguínea de GSH se incrementa en personas mayores que gozan de excelente salud física y mental (Uchida, 2003). Para poder establecer la estrecha relación entre diversas patologías y el desbalance redox ya revisadas, en la actualidad se emplean diversas técnicas para la cuantificación de los componentes del sistema redox.

1.5 Metodologías de cuantificación

El conocer la fuente de producción, así como las características específicas de las diversas moléculas del sistema redox ha permitido, a lo largo de los años, el desarrollo y refinamiento de metodologías para su cuantificación.

Para una evaluación integral del estado redox, es imperante el cuantificar tanto las moléculas prooxidantes y antioxidantes, es por ello, que se han desarrollado técnicas que evalúan elementos puntuales como la actividad enzimática, los productos de las ERO's y su interacción con estructuras celulares, así como la concentración específica de moléculas antioxidantes, como lo son el GSH y GSSG.

Como ya se ha revisado, las enzimas antioxidantes son una parte crítica del sistema antioxidante celular, éstas se consideran un pilar en la evaluación del estado redox. Actualmente, la mayoría de las revisiones dan paso a la cuantificación de la actividad enzimática de forma aislada a través de técnicas que emulan su actividad *in vivo* y al mismo tiempo permiten la cuantificación de su actividad.

Una de las enzimas protagonistas en los análisis del estado redox es la CAT, esta enzima cuenta con cualidades que permiten la cuantificación de su actividad de manera eficaz en el laboratorio clínico de rutina. El método más frecuente empleado en la medición de su actividad es el descrito por Aebi Hugo en 1984; el cuál se fundamenta en el monitoreo de la descomposición del H_2O_2 mediante una reacción de primer orden, donde la velocidad de degradación es proporcional a la concentración de peróxido presente, este proceso es monitoreado a 240 nm, de forma que la diferencia en la absorbancia por unidad de tiempo es una medida de su actividad. Este método presenta una sensibilidad de 0.3-0.5 U/mL de CAT, con una linealidad hasta las 150 U/mL, así como una desviación estándar menor a 1.6% y un coeficiente de variación de 7% (Beers et al, 1952).

En la actualidad se han descrito diversos métodos para la medición de la actividad de la CAT con diversos fundamentos, como son: la yodometría, quimioluminiscencia, polarimetría, así como el monitoreo de la producción de oxígeno a través de un electrodo de oxígeno o un medidor de gas de bajo flujo, sin embargo, todos estos métodos requieren de tiempo e infraestructura especializada lo que los hace inadecuados para su aplicación clínica (Hadwan, 2018).

Otra de las enzimas consideradas en el panel de evaluación del estado redox es la SOD. En este caso también se cuenta con una gran variedad de metodologías, no obstante, uno de los más empleados dado su practicidad y factibilidad hacia el laboratorio clínico es el método que se fundamenta en la autooxidación del pirrogalol.

En este mismo sentido, hasta la fecha se han implementado diversas metodologías para la cuantificación de la actividad del sistema glutatión y/o sus concentraciones. Las diversas metodologías propuestas se fundamentan en absorbancia ultravioleta, fluorescencia, espectrofotometría, espectrofotometría de masas ya sea electroquímica o en tándem o bien a través de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, por sus siglas en inglés). Sin embargo, muchas de esas metodologías requieren de tratamientos especializados sobre la muestra, como pueden ser la precipitación de proteínas presentes en los especímenes biológicos o una derivatización previa para la formación de un aducto. Estos tratamientos a la muestra dan como resultado una mayor susceptibilidad a la degradación y autooxidación del GSH, así como un gran número de complicaciones técnicas y de costo dada la

complejidad intrínseca de la prueba, por tanto, la búsqueda de un método rápido, sensible y fiable para la cuantificación de GSH sigue en curso (Nuhu et al, 2020).

A continuación, se muestra una tabla que conjunta las metodologías empleadas por diversos grupos de investigación para la cuantificación de moléculas del sistema redox a nivel plasmático; asimismo, se muestran las características de cada una de las poblaciones seleccionadas. Para el caso de la determinación de concentraciones de los analitos, tal como se ha definido en el apartado de abreviaturas se agregará la letra “a” cuando se haga referencia a la determinación de la actividad enzimática y “c” para el caso de la determinación de la concentración de los diversos analitos.

Tabla 1. Metodologías empleadas para la cuantificación de marcadores de estrés oxidante en suero.

| Concentración | Unidad | Técnica | Edad (años) | Condiciones del estudio | Autores y año |
|-------------------------|--------|-------------------------------------|--------------|--|-------------------------|
| cMDA | | | | | |
| 0.85 (0.62 -1.22) * | µmol/L | Ácido tiobarbitúrico (TBA) con HPLC | Adulto joven | Las condiciones de la población y/o criterios de selección del estudio no fueron descritas en la publicación. | Mas-Bargues et al, 2021 |
| 1.15 (1.04 – 1.28) * | µmol/L | Ácido tiobarbitúrico (TBA) con HPLC | 20 - 39 | 80 personas de 480 de Fionia, Dinamarca. Evaluación por cuestionario para evaluar factores de estilo de vida, exposición a sustancias químicas tóxicas, exposición a sustancias químicas tóxicas, uso de medicamentos. No se utilizaron criterios de exclusión. | Nielsen et al, 1997 |
| 0.93 ± 0.39 | µmol/L | Ácido tiobarbitúrico (TBA) | 46 ± 9.61 | 100 individuos aparentemente sanos, sin síntomas sugestivos de Diabetes. Se excluyeron del ensayo a participantes con comorbilidades, trastornos hormonales, trastornos benignos o malignos, cetoacidosis diabética, insuficiencia renal, rechazo de trasplantes, trastornos del sistema nervioso central, enfermedades crónicas, así como | Bhutia et al, 2011 |

| | | | | | |
|-------------------|-------------------|---|--------------------|---|------------------------|
| | | | | pacientes que ingirieran suplementos antioxidantes o fármacos hipolipemiantes. | |
| 0.79 ± 0.2336 | $\mu\text{mol/L}$ | Método de Buege. (Modificación de TBARS) | 47.46 ± 10.074 | 15 individuos sanos que no tuvieran hábitos de consumo de tabaco de entre 30- 60 años, que no tenían una enfermedad sistémica subyacente o que tomaban antioxidantes. | D'souza et al, 2012 |
| c4-HNE | | | | | |
| 0.08 ± 0.01 | μM | Kits de ELISA | 51.05 ± 8.11 | 160 sujetos del segundo Hospital afiliado de la Universidad Médica de Harbin, China. Pacientes control no diabéticos bajo los criterios de exclusión de enfermedad hepática o endocrina, así como cualquier tipo de diabetes, enfermedad cardiovascular, insuficiencia renal, cáncer y dependencia al alcohol o drogas, personas no fumadoras, no embarazadas y libres de enfermedades infecciosas. | Guo et al, 2017 |
| 68.9 ± 15.0 | nmol/L | Metodología descrita por Esterbauer (HPLC) | 18-29 | 194 pacientes (77 mujeres y 117 hombres) provenientes de la universidad Humboldt de Berlín, de este grupo se subdivide en una $n=35$. Libres de cualquier enfermedad aguda o crónica, así como un examen físico y psicológico adecuado. También se excluyeron individuos bajo suplementación o consumo antioxidante. | |
| 0.28 ± 0.34 | nmol/mL | --- | --- | --- | Esterbauer et al, 1991 |
| 0.68 ± 0.41 | nmol/mL | --- | --- | --- | Esterbauer et al, 1991 |

| <i>cNitritos</i> | | | | | |
|---------------------------|--------|--|--------------|---|-------------------------|
| 23.28 ± 1.65 | -- | Método de Griess | 43-60 | 30 sujetos bajo los criterios de exclusión de tabaquismo (últimos 5 años), consumo de alcohol, estupefacientes, hipertensión, diabetes mellitus, hipotiroidismo, hipertiroidismo, y cualquier otra enfermedad. Así como otras líneas de tratamiento. | Veselinovic et al, 2014 |
| 4.56 ± 2.75 | µmol/L | Kit de fluorescencia de 2,3-diaminonaftaleno | 49.26 ± 9.94 | 50 sujetos control sanos. Criterios de exclusión: Enfermedad hepática, trastornos hematológicos, enfermedades pulmonares crónicas, haber recibido radioterapia o quimioterapia y resultados negativos de PCR. | Ahmed et al, 2023 |
| 2.0 | µmol/L | Cromatografía de gases-espectrofotometría de masas (GC-MS) | 50-70 | 19 personas (7 hombres y 12 mujeres) sanos de la población general de Perth con un IMC de 21 a 30 kg/m ² . Los participantes no eran fumadores, diabéticos, no recibían medicación antihipertensiva, no uso de enjuague antibacteriano y sin antecedentes de enfermedades importantes como cáncer o enfermedad cardiovascular. | Bondonno et al, 2015 |
| 0.72 +/- 0.37 (0.06-1.99) | µmol/L | Quimioluminiscencia de ozono de alta sensibilidad | 18-83 | 175 personas (71 hombres y 104 mujeres). Se excluyeron aquellos con hipertensión, diabetes o bajo medicación. | Wang et al, 2021 |
| <i>aCAT</i> | | | | | |
| 20.51 (6.55 – 140.28) * | UI/mL | Método de Aebi | 10.17 ± 3.61 | 30 niños (12 niñas y 18 niños) no expuestos al humo de cigarro durante 6 semanas antes del estudio (cotinina/creatinina) vs grupo experimental. Se incluyó IMC, colesterol total, colesterol LDL, nivel de tiol, CAT y MPO. | Torun et al, 2019 |
| 0.19 ± 0.11 | UI/mL | Método de Aebi | 44.3 ± 12.1 | 30 individuos sanos, examinados para fines de control, sin molestias en región de la cabeza, | Ozbay et al, 2021 |

| | | | | | |
|-------------------|------|--|------------------|--|----------------------------|
| | | | | cuello y sin infecciones ni otras enfermedades sistémicas. | |
| 71.84 ± 30.02 | U/L | Método de Aebi | 32 ± 8 | 24 voluntarios sanos, asintomáticos con un historial médico normal y examen físico normal. Ningún sujeto de control recibía suplementos con vitaminas antioxidantes como E y C. Los sujetos control no recibían ningún medicamento y no fumaban ni consumían alcohol. También se excluyeron a pacientes con infección activa, diabetes mellitus, enfermedad hepática o pulmonar, artritis reumatoide y enfermedad coronaria. | Begenik et al, 2013 |
| aSOD | | | | | |
| 4.05 ± 0.92 | U/mL | Kit comercial basado en el sistema reactivo de xantina/xantina oxidasa | 28 ± 6 | 22 sujetos control (bajo los criterios de exclusión como lo son el embarazo, lactancia y enfermedades cerebrales crónicas. | Płonka-Póltork et al, 2013 |
| 5.53 ± 1.31 | U/mL | Método de reducción de nitroazul de tetrazolio | 29.28 ± 4.25 | 25 sujetos sanos (18 mujeres y 7 hombres). Se excluyeron a fumadores, alcohólicos, embarazadas o madres lactantes, así como los sujetos que tomaban algún otro medicamento o que padecían alguna enfermedad neurológica, crónica o infecciosa, así como deficiencia de hierro. | Keskin Guler et al, 2016 |
| 3.67 ± 0.53 | U/mL | Kit comercial basado en el sistema reactivo de xantina/xantina oxidasa | 28 ± 8 | 21 sujetos control de la clínica ambulatoria de antiepilépticos del Hospital Provincial de Rzeszow (Polonia). Se excluyeron a mujeres embarazadas, en período de lactancia y pacientes con patología cerebral progresiva. | Płonka-Póltork et al, 2011 |

| <i>cGT</i> | | | | | |
|------------------|-------------------|--|----------------|---|------------------------|
| 3.8 ± 1.1 | $\mu\text{mol/L}$ | Espectrofotometría de masas en Tándem | 64.3 ± 6.0 | 91 pacientes sanos derivados del estudio nacional sueco sobre el envejecimiento y cuidados en Kungsholmen (SNAC-K), un estudio prospectivo basado en la población de Estocolmo. El muestreo fue totalmente aleatorio | Pérez et al, 2020 |
| 6.23 ± 1.42 | μM | Cromatografía adaptada a la formación de aductos con NaBH_4 | -- | 18 pacientes saludables; 10 mujeres y 8 hombres, todos aparentemente sanos. | Mansoor et al, 1992 |
| 7.3 ± 1.8 | $\mu\text{mol/L}$ | Derivatización poscolumna específica de tioles mediante HPLC | -- | 10 individuos aparentemente sanos | Anderson et al, 1993 |
| 33.73 ± 2.01 | $\mu\text{mol/L}$ | Método de reciclaje enzimático (Kit comercial) | 30-50 | 15 individuos con normo peso, sin enfermedades dentales o periodontitis. Criterios de inclusión: no ser fumadores, no tener historial de enfermedad, no tener tratamiento o medicación periodontal al menos 6 meses antes del estudio, estar libre de embarazo o periodo de lactancia, no tener diabetes mellitus o enfermedad o condición de inflamación crónica | Öngöz Dede et al, 2016 |
| <i>cGSSG</i> | | | | | |
| 3.4 ± 0.9 | $\mu\text{mol/L}$ | Derivatización poscolumna específica de tioles mediante HPLC | -- | 10 individuos aparentemente sanos | Anderson et al, 1993 |
| 1.48 ± 0.36 | μM | Cromatografía adaptada a la formación de aductos de NaBH_4 | -- | 18 pacientes saludables; 10 mujeres y 8 hombres, todos aparentemente sanos. | Mansoor et al, 1992 |

| aGPx | | | | | |
|----------------------|-------|--|-------------------------|---|-----------------------|
| 187.01 ± 59.62 | IU/mL | Cambios de la absorbancia de NADPH a 340 nm. | 29.28 ± 4.25 | 25 sujetos sanos (18 mujeres y 7 hombres). Se excluyeron a fumadores, alcohólicos, embarazadas o madres lactantes, así como los sujetos que tomaban algún otro medicamento o que padecían alguna enfermedad neurológica, crónica o infecciosa, así como deficiencia de hierro. | Keskin G. et al, 2016 |
| 23.07 (4.85-53.24) * | U/L | Cambios de la absorbancia de NADPH a 340 nm. (Descrito por Pleban et al) | 50.8 ± 9.9 | 50 personas para formar parte de un grupo control con IMC de 23.73 +/- 2.06 kg/m ² , con presión arterial de 116.3 +/- 21.3 y 76.8 +/- 15.5 mmHg | Moraes et al, 2023 |
| 205.08 ± 44.71 | U/mL | Kit comercial de cambios de la absorbancia de NADPH a 340 nm. | 30.33 ± 10.93 (21-57) * | 19 sujetos (11 hombres y 8 mujeres) de Taiwán sin problemas de alcohol. Todos con hepatitis B negativos, y con exámenes físicos no revelaron evidencias clínicas importantes. | Peng et al, 2005 |
| aGRx | | | | | |
| 405.79 ± 150.69 | U/L | Método descrito por Villa-Correa et al (consumo de NADPH a 340 nm) | 29.87 ± 5.02 | 90 pacientes control aparentemente sanos, sin síntomas de inflamación activa y fuera de cualquier régimen terapéutico de agentes inmunomoduladores, multivitamínico, esteroideo u otros suplementos antioxidantes durante los tres meses anteriores. Se excluyeron pacientes con traumatismos, DT2, enfermedades respiratorias, enfermedades hepáticas o renales, trastornos cardiovasculares, artritis reumatoide, enfermedad de Behcet, enfermedades gastrointestinales y pacientes embarazadas, amamantando o consumo crónico de tabaco, | Zhang et al, 2023 |

| | | | | | |
|-----------------|--------|--|-------------------------|--|-------------------------|
| | | | | alcoholismo o uso de drogas intravenosas. | |
| 44.97 ± 24.15 | U/mL | Kit comercial de cambios de la absorbancia a 340 nm. | 30.33 ± 10.93 (21-57) * | 19 sujetos (11 hombres y 8 mujeres) de Taiwán sin problemas de alcohol. Todos con hepatitis B negativos, y con exámenes físicos no revelaron evidencias clínicas importantes. | Peng et al., 2005 |
| cERO's** | | | | | |
| 377.90 ± 222.40 | nM | Kit Amplex Red Hydrogen Peroxide/ Peroxidase de Molecular Probes | 49.26 ± 9.94 | 50 sujetos control sanos. Criterios de exclusión: Enfermedad hepática, trastornos hematológicos, enfermedades pulmonares crónicas, haber recibido radioterapia o quimioterapia y resultados negativos de PCR. | Ahmed et al, 2023 |
| 2.39 ± 0.13 | nmol/L | Colorimétrico por la oxidación de rojo de fenol en presencia de la peroxidasa de rábano picante. | 43-60 | 30 sujetos bajo los criterios de exclusión de tabaquismo (últimos 5 años), consumo de alcohol, estupefacientes, hipertensión, diabetes mellitus, hipotiroidismo, hipertiroidismo, y cualquier otra enfermedad. Así como otras líneas de tratamiento. | Veselinovic et al, 2014 |
| 24 ± 9 | μM | Método descrito por Franz et al 2003 | 70.8 ± 7.7 | 20 individuos que estaban libres de enfermedades oftálmicas, enfermedades sistémicas o problemas ateroscleróticos/artioscleróticos, así como haber recibido medicamentos locales o se habían sometidos a tratamientos previos de cirugía. | Koliakos et al, 2008 |
| CRFP | | | | | |
| 612-1634 | μmol/L | Método de capacidad reductora férrica del plasma (FRAP) | --- | 141 adultos chinos aparentemente sanos. | Benzie I. et al 1996 |
| 514.1 ± 19.1 | μmol/L | Método de capacidad reductora férrica del | 65 ± 13 | 187 pacientes (58 mujeres y 129 hombres) donde todos eran pacientes ambulatorios no | Vassalle et al, 2004 |

| | | plasma (FRAP) | | seleccionados remitidos al Instituto de Fisiología Clínica | |
|---------------|--------------------------|---|----------------|---|--------------------------------|
| 787.1 ± 157.9 | μmol/L | Método de capacidad reductora férrica del plasma (FRAP) | 40.13 ± 12.83 | 49 pacientes sanos control (41 mujeres y 8 hombres) con los criterios de exclusión de diabetes, enfermedades inflamatorias, infecciones activas, historial de cáncer, enfermedades hepáticas y hepatobiliares, falla renal crónica, abuso de alcohol, cigarro o uso crónico de antiinflamatorios no esteroideos, consumo de antioxidantes, anticonceptivos orales, inmunostimulantes y/o inmunosupresores | (Piątek-Guziewicz et al, 2017) |
| 712 ± 126 | μmol Fe ⁺⁺ /L | Método de capacidad reductora férrica del plasma (FRAP) modificada a placas de 48 y 96 pocillos | 28 ± 6 | 22 sujetos control (bajo los criterios de exclusión como lo son el embarazo, lactancia y enfermedades cerebrales crónicas. | Płonka-Półtorak et al, 2013 |
| 720 ± 118.7 | μmol Fe ⁺⁺ /L | Método de capacidad reductora férrica del plasma (FRAP) modificada a placas de 48 y 96 pocillos | 28 ± 8 (19-42) | 21 sujetos control de la clínica ambulatoria de antiepilépticos del Hospital Provincial de Rzeszow (Polonia). Se excluyeron a mujeres embarazadas, en período de lactancia y pacientes con patología cerebral progresiva. | Płonka-Półtorak et al, 2011 |

Los resultados mostrados en la columna de concentraciones se presentan como $\bar{X} \pm s$.

* Media (Mínimo- Máximo)

** Los datos se obtuvieron de ensayos que empleaban la medición de H₂O₂.

1.6 Límites biológicos de referencia

El concepto de límites biológicos de referencia (LBR) fue introducido por Grasbeck y Saris en 1969 para describir fluctuaciones en la concentración de analitos en sangre en grupos bien caracterizados de individuos, este concepto tenía como objetivo el establecer una

nomenclatura definida y los procedimientos recomendados para evitar caer en el concepto ambiguo de “valores normales” (Geffre et al, 2009).

Poco después, en 1970, se creó el Panel de Expertos en Teoría de los Valores de Referencia (EPTVR por sus siglas en inglés) por el comité de estándares de la Federación Internacional de Química Clínica (IFCC), cuya misión era la de crear la nomenclatura, así como los procedimientos recomendados para la producción de valores de referencia. Esta nomenclatura y las recomendaciones para los LBR fueron descritos detalladamente en una serie de artículos originales. Sin embargo, este mismo organismo junto con el Instituto de Estándar y Laboratorio Clínico (CLSI por sus siglas en inglés), realizaron una revisión de estos artículos originales publicados, revisión que fue publicada en el año 2008 en la guía C28-A3.

Dentro de la guía C28-A3 del año 2008, se definen varios conceptos, y es la relación de estos la que da paso a la determinación de los LBR, en este sentido se define a:

-Individuo de referencia: Es una persona seleccionada para las pruebas sobre la base de criterios bien definidos. Por lo general, se supone que los individuos de referencia están “sanos”, sin embargo, al ser la salud un concepto relativo y al carecer de una definición precisa, los individuos de referencia se seleccionan utilizando criterios bien definidos, conocidos como criterios de inclusión y de exclusión que se aproximan a la salud. Estos criterios deben de definirse previo al estudio y se deben adaptar según la naturaleza de este.

- Población de referencia: Es el grupo que consiste en todos los posibles individuos de referencia.

-Grupo muestra de referencia: Es un adecuado número de personas seleccionadas para representar la población de referencia.

-Valor de referencia: Es el valor, o resultado de una prueba obtenido por la observación o la medición de un particular tipo o cantidad en un individuo de referencia. Un valor de referencia, que representa un valor obtenido en un individuo de referencia, no es sinónimo de un límite de referencia, el cuál es un valor derivado de todos los resultados obtenidos en el grupo de muestra de referencia. El término valor de referencia no debe de utilizarse para denotar un límite de intervalo de referencia.

-Distribución de referencia: Es la distribución de los valores de referencia.

-Límites de referencia: Son los valores derivados de una distribución de referencia que delimitan al intervalo de referencia y son usados para propósitos descriptivos.

-Intervalo de referencia (IR): Es el intervalo entre e incluyendo a los 2 límites de referencia, este comprende solo una fracción de los valores medidos en los individuos de referencia, específicamente se habla del 95% central de la distribución localizada entre los fractiles 0.025 y 0.975. Debe denotarse que el 5% de los individuos “sanos” o de referencia presentaran valores por encima o por debajo de los límites de referencia, lo que se traduce en que es perfectamente normal observar resultados anormales en individuos sanos en baja frecuencia.

En este mismo documento, la guía C28-A3 del CLSI y la IFCC, se establece la relación de los conceptos antes mencionados, esta relación ayuda a la conceptualización y mejor entendimiento hacia la obtención de los intervalos de referencia (Fig. 2).

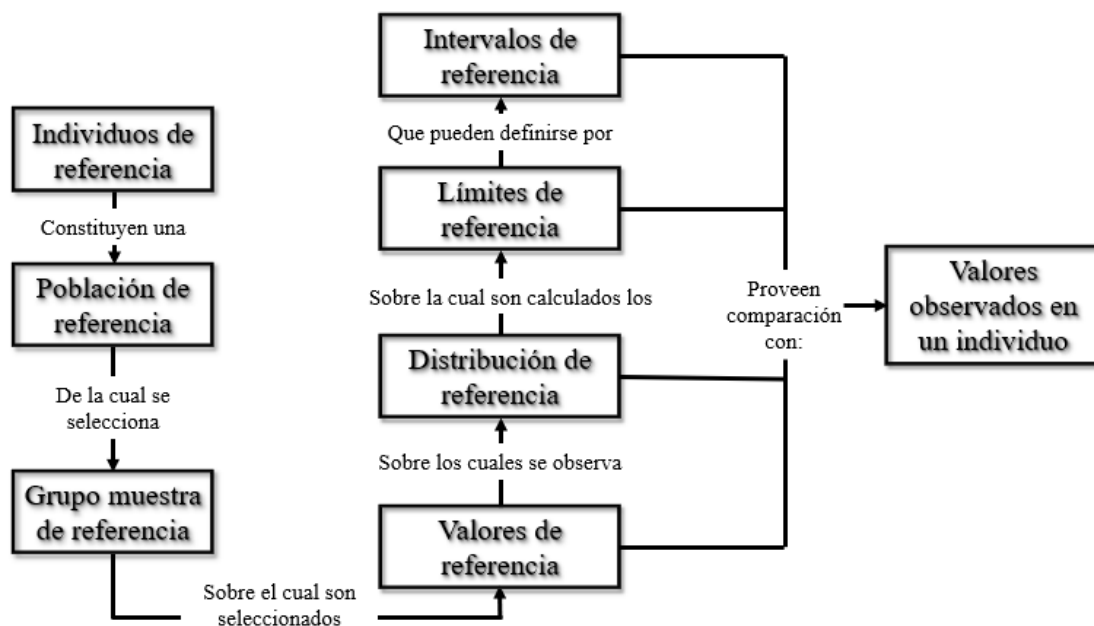


Figura 2: Relación de los conceptos para la obtención de los intervalos de referencia. Adaptado de CLSI y IFCC, 2008

Como puede observarse en la figura 2, un punto crítico importante en la obtención de los intervalos de referencia es la selección de los individuos de referencia.

1.6.1 Selección de la muestra

Para poder llevar a cabo de manera adecuada la selección de los individuos, existen dos tipos de selección de acuerdo con el CLSI y la IFCC, éstas son la selección *a priori* o la

selección *a posteriori*, también conocidas como prospectiva o retrospectiva, respectivamente (Fig. 3).



Figura 3: Métodos de selección de individuos. Adaptado de CLSI y IFCC, 2008

Como puede verse en la figura 3, cada uno de los métodos de selección cuenta con sus particularidades. En el método *a posteriori* se necesita un gran número de muestras, que pueden ser obtenidas al azar o no al azar para posteriormente permitir la exclusión y división de los datos de acuerdo con las características del grupo de muestra o referencia.

Por su parte, la selección *a priori*, parte de una población general y es a través de los criterios de exclusión e inclusión, que se obtiene una muestra relativamente pequeña pero significativa, que permite la obtención de los valores de referencia.

De acuerdo con la guía C28-A3 los criterios de inclusión y exclusión establecen si un sujeto es apto para participar en un estudio para establecer los intervalos de referencia. En el presente trabajo junto con los criterios de inclusión y exclusión se contemplaron criterios de eliminación, en su conjunto estos criterios se eligen de modo que se incluyan individuos sanos y se excluyan los individuos enfermos, o que no pertenecen a la población de referencia para la que se está estableciendo el intervalo de referencia. Los criterios de exclusión deben de contemplar mínimamente a los estados fisiopatológicos, la ingestión de agentes farmacológicamente activos, estados fisiológicos modificados temporales como pueden ser

el embarazo o las condiciones de ayuno, así como factores particulares que sean específicos en el estudio a realizar.

Es a partir de estos criterios que se selecciona a la población, y a partir de esta población se obtienen los valores de referencia de cada uno de los individuos, de manera que en su conjunto se genera la distribución de referencia.

La distribución de referencia se entendería entonces como, la distribución del conjunto de datos obtenidos a partir de la muestra de los individuos de referencia seleccionados bajo los criterios de inclusión y exclusión. Para poder emplear esta distribución de referencia obtenida como un punto de partida en la inferencia hacia la población de análisis, es importante conocer a detalle el comportamiento que presenta, para ello se emplean diversos parámetros estadísticos que se abordan a continuación.

1.6.2 Distribución de los datos.

Una distribución de datos nace a partir de un conjunto de datos, que se entiende como la colección de datos obtenidos de casos o de sujetos individualmente; resultaría poco práctico y bastante ineficiente desde el panorama estadístico que se presentaran el total de los datos obtenidos para cada muestra a analizarse, esto además de ser engorroso para el lector o evaluador, tampoco permitiría llegar a conclusiones importantes (Mishra et al, 2019). Es por estas razones que se acude a herramientas de estadística descriptiva.

Las herramientas de estadística descriptiva permiten el análisis estadístico de manera más eficaz dado que presentan el resumen de un conjunto de observaciones. Estas herramientas tienen la finalidad de proporcionar la mayor cantidad de información con la menor cantidad de palabras y de la manera más simple posible, de forma que, a través de parámetros puntuales como la media (\bar{X}), mediana y desviación estándar (s) se conocen las características básicas de una distribución de datos.

La estadística descriptiva se puede aplicar en tres tipos principales, las cuales son, las medidas de frecuencia (frecuencia y porcentaje), las medidas de tendencia central (media, mediana y moda) y medidas de dispersión o variación (varianza, s , error estándar, rango intercuartil, rango y coeficiente de variación) (Mishra et al, 2019). Estos parámetros sirven para describir de manera específica y con ello conocer de manera eficaz la distribución de los datos con los que se está trabajando; sin embargo, carecen de valor estadístico para realizar inferencias hacia la población u obtener información del comportamiento

poblacional que pueda tener la muestra. Para estas situaciones, se necesita aplicar la estadística inferencial. De acuerdo con Mishra et al (2019) “*la estadística inferencial extrae conclusiones de datos que están sujetos a variación aleatoria, en la cual, la mayoría de las predicciones son generalizaciones sobre una población a partir de una muestra más pequeña*”.

Dentro de la estadística inferencial, el analizar la distribución de los datos es un factor crucial para lograr inferencias estadísticamente válidas a nivel poblacional. El evaluar la distribución de los datos es importante en la determinación de los intervalos de referencia, así como para diversas pruebas como lo son las pruebas de correlación y las pruebas *t*.

Para la determinación de IR uno de los puntos críticos es el comprobar si la distribución sigue o no el comportamiento de una distribución de tipo normal o gaussiana, dado que esto determina si se emplearan técnicas paramétricas o no paramétricas para su estimación. Para verificar la hipótesis de normalidad en la distribución de los datos se emplean pruebas de bondad de ajuste.

En palabras de C. Wang y Zhu, “*la bondad de ajuste se refiere a si un conjunto de datos es consistente con el muestreo de un modelo para una distribución*”. Las pruebas de bondad de ajuste permiten docimar la hipótesis y con ello establecer si una variable aleatoria sigue cierta distribución de probabilidad (Quintero y Duran, 2004). Para evaluar la bondad de ajuste de una distribución se cuenta con diversas pruebas, de manera general estas se pueden dividir en técnicas gráficas o métodos estadísticos y ambas son usadas cuando se desea comparar una distribución observada con una teórica (C. Wang C. et al,2024).

1.6.3 Pruebas de bondad

Generalmente se opta por emplear las técnicas gráficas para ilustrar de manera visual el comportamiento de la distribución de los datos, aunque no es de extrañarse que éstas también se usen como técnicas *screening* para orientarse a cerca de lo que se podría esperar sobre el comportamiento de la distribución. Entre las técnicas más frecuentes en este sentido se puede encontrar al histograma y los gráficos cuartil-cuartil (Q-Q). Por su parte los métodos estadísticos se emplean para probar y con ello, aceptar o rechazar hipótesis con un grado de confianza específico. Esto brinda a los métodos estadísticos un carácter de objetividad, potencia y nivel de significancia con lo cual se permite una inferencia hacia la población respaldada por evidencia estadística. Dentro de los métodos estadísticos, las pruebas de

bondad de ajuste son empleadas para la prueba de hipótesis cuando se contrasta contra una distribución normal. Una de las pruebas más empleadas es la prueba de Chi cuadrada (χ^2), también conocida como chi cuadrada de Person, esto debido a su accesibilidad respecto a su aplicación (Quintero et al, 2004). También existen algunas otras pruebas de bondad de ajuste como lo son la prueba de Shapiro-Wilk, Kolmogórov Smirnov y Anderson-Darling.

La prueba de χ^2 permite comparar la frecuencia observada en los datos experimentales contra la frecuencia esperada de acuerdo con la distribución de probabilidad propuesta para los datos, de forma que al final de la prueba se puede concluir con un nivel de confianza, previamente fijado, que las distribuciones presentan o no diferencias estadísticamente significativas. Es importante destacar que en esta prueba las diferencias de los valores observados y los esperados se encuentran elevados al cuadrado de forma que la prueba es de planteamiento bilateral (también conocida como no dirigida) dado que indica si existe o no relación, pero no en qué sentido se produce tal asociación (Cerdeira L. et al, 2007).

La prueba de χ^2 parte del supuesto que la hipótesis nula es verdadera, de tal forma que, si los resultados obtenidos difieren significativamente de los resultados teóricos, y en consecuencia se alejan de la hipótesis nula, es posible rechazar la hipótesis nula y aceptar la hipótesis alternativa como verdadera (Cerdeira L, et al, 2007).

La prueba de Kolmogórov-Smirnov y la prueba de Shapiro-Wilk por su parte también parten de la premisa, donde se postula como hipótesis nula que los datos siguen una distribución normal, el rechazar o el aceptar esta hipótesis estaría en función de un valor de p previamente asignado que generalmente se toma como 0.05, siendo que si el valor de p obtenido de la prueba es: $p > 0.05$ se considera como verdadera la hipótesis nula, o lo que sería el análogo, si el valor de $p \leq 0.05$ se rechaza la hipótesis nula y se rechaza la hipótesis de normalidad antes planteada. La prueba de Shapiro-Wilk y de Kolmogórov-Smirnov se consideran prácticamente pruebas análogas con la única variación de la n de la muestra. Para el caso de la prueba de Shapiro-Wilk se ha mencionado por diversos autores que el tamaño de muestra más apropiado para aplicar el estadístico es de $n < 50$ muestras mientras que la prueba de Kolmogórov-Smirnov se utiliza cuando $n \geq 50$ (Mishra et al, 2019).

La prueba de Kolmogórov-Smirnov compara la función de distribución acumulativa empírica de los datos experimentales contra la función de distribución acumulativa teórica que los datos deberían de seguir si se encontraran distribuidos de manera normal. Por otra parte, la

prueba de Shapiro-Wilk se basa en la correlación entre los datos y sus puntuaciones normales correspondientes, esta característica se ha mencionado que brinda a la prueba de una alta potencia estadística y varios investigadores la señalan como una de las mejores pruebas de bondad de ajuste para verificar la normalidad de los datos (Ghasemi et al, 2012).

Por otro lado, se tiene a la prueba de AD. Anderson, Theodore W. y Darling DA utilizaron inicialmente la estadística de AD, para probar la conformidad de una distribución con parámetros perfectamente especificados a mediados de los años 50's, y fue en los años 60's-70's, donde autores como Stephens adaptaron la prueba a una gama más amplia de distribuciones donde alguno de los parámetros puede no ser conocidos ("Prueba de Anderson-Darling",2008).

La prueba de AD presenta, de acuerdo con varios autores, una ventaja sobre los demás estadísticos antes mencionados ya que sus valores críticos no se encuentran en una sola tabla, si no que estos se especifican o calculan para cada una de las distribuciones, esto dota a esta prueba de una potencia estadística mucho mayor y la hace más sensible hacia desviaciones más sutiles de la normalidad. Esta prueba es válida únicamente para distribuciones continuas y de igual forma a las pruebas estadísticas anteriores, si el estadístico de prueba es menor que el valor crítico calculado a través de los valores experimentales no se puede rechazar la hipótesis nula, en caso contrario, se rechaza. De igual forma guarda la relación con el valor p antes mencionado, de forma que si el valor P obtenido de la prueba es $p > 0.05$ se considera estadísticamente insignificante, es decir que no se cuenta con evidencia estadística para rechazar la hipótesis nula (Barrón et al, 2020).

Para el proceso de obtención de IR los métodos estadísticos son fundamentales, ya que estos son el punto crítico para discrepar si la metodología a emplear será de carácter paramétrico o no paramétrico. En este sentido se prefieren las primeras metodologías, dado que su potencia estadística es mayor y con ella se logra una inferencia más eficaz de la muestra hacia la población. Como ya se ha mencionado, las pruebas de bondad de ajuste buscan el analizar si el comportamiento de los valores obtenidos se ajusta a la distribución Gaussiana en un primer momento, en la escala "natural" o en la que son obtenidas originalmente los datos, sin embargo, en varias ocasiones en el ámbito clínico, los resultados obtenidos no se ajustan de manera directa a esta distribución, por lo que es necesario el transformar los datos y con ello

obtener una normalización de estos comprobada por las pruebas de bondad de ajuste antes descritas.

1.6.4 Transformación de los datos: Normalización

La normalización de los datos es un procedimiento que se logra a través de diversos operadores matemáticos, los cuales, al transformar los datos originales logran ajustar estos a una distribución de tipo normal o gaussiana.

En los datos clínicos de pacientes, es frecuente que la distribución de los datos siga un patrón que presente diferencias significativas respecto de la normalidad, a pesar de que la muestra sea grande. Con estas desviaciones se puede caer en errores estadísticos graves, y es así como, para evitarlos y eliminar estas desviaciones, se recurre al proceso de transformación mediante diversos operadores matemáticos.

Los operadores pueden ser tanto lineales como no lineales. Los operadores lineales son sumar, restar, multiplicar o dividir los valores obtenidos con una constante, y estas transformaciones rara vez afectan la distribución de datos, si no que ajustan sobre todo a la media geométrica y la s hasta cierto punto. Por el contrario, las transformaciones no lineales, que incluyen a la transformación por elevación al cuadrado, raíz cuadrada, logarítmica natural o logarítmica con base 10, estabilizan la dispersión y permiten la estimación estadística paramétrica, al asegurar el supuesto de normalidad requerido en la distribución (Fig. 4) (Lee, 2020).

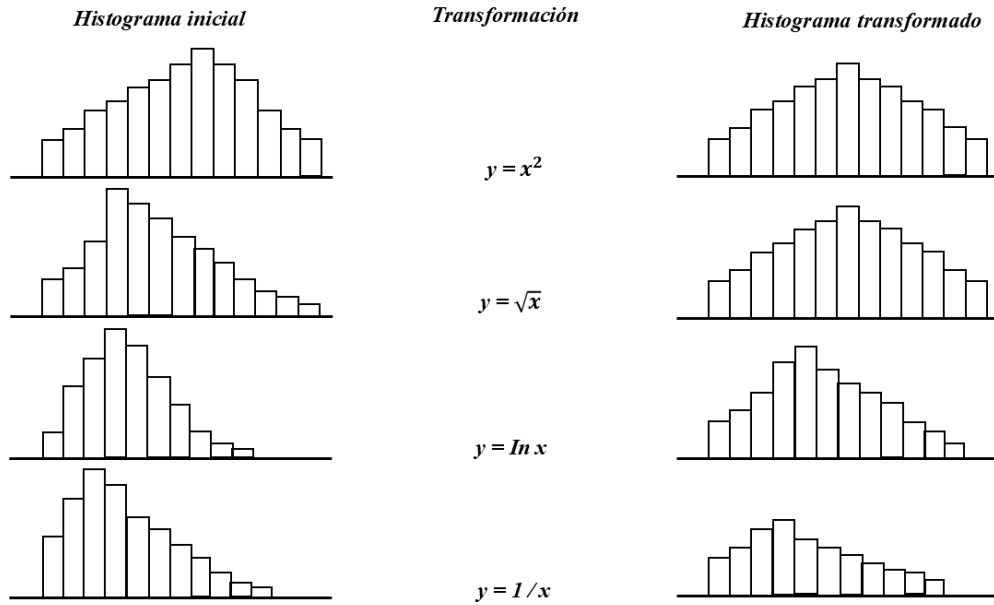


Figura 4.- Ejemplo de histograma inicial contra histograma transformado por diferentes operadores no lineales. Peña (1997) citado en De la Guía Gonzalez (s.f.).

Las transformaciones no lineales por su parte presentan diferente potencia en relación con los cambios que generan en los parámetros con respecto a la variable a transformar, para hablar de estas transformaciones es necesario cubrir las transformaciones de la escala de Tukey y las transformaciones Box-Cox.

1.6.5 Transformaciones: Escala de Tukey y BOX-COX

La escala de Tukey toma en cuenta las características de los datos obtenidos como: la curtosis y la asimetría, esta escala incluye una serie de transformaciones por potencias (Sakia, 1992; citado en De la Guía González, s.f.)

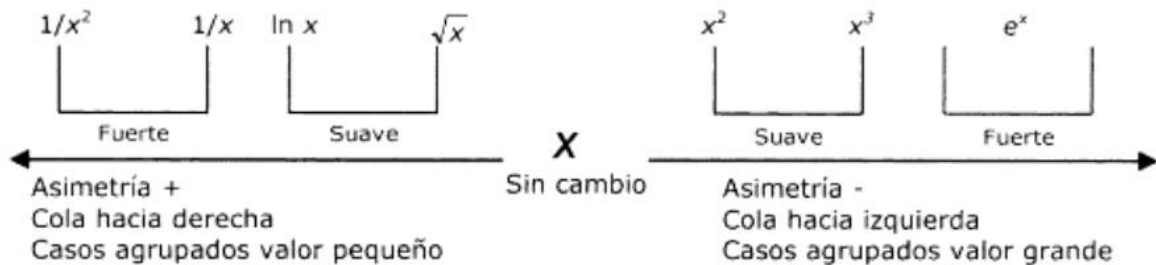


Figura 5. Escala de Tukey (Guisande González, 2006 citado en De la Guía Gonzalez, s.f.)

Esta serie de transformaciones tiende a modificar las distancias o el comportamiento entre los puntos, de forma que ayudan a cumplir con la normalidad (Osborne, 2002 citado en De la Guía González, s.f.). De acuerdo con este mismo autor, las transformaciones recomendadas son la raíz cuadrada, el logaritmo o la inversa.

Si bien la escala de Tukey contiene a las principales transformaciones, los criterios para emplearlas pueden ser poco claros y caer en lo subjetivo, esto a consecuencia que en muchas ocasiones se hace referencia a la potencia de estas transformaciones con adjetivos como “suave” o “fuerte” tal como se muestra en la Fig. 5 o bien con adjetivos como “muchos cambios” o “pocos cambios”. Para eliminar esa ambigüedad y heterogeneidad se ha optado por emplear la familia de transformaciones de Box-Cox que contienen las transformaciones antes mencionadas pero que su implementación está dada por el valor de λ .

Box y Cox en 1964 (citado en De la Guía González, s.f.) propusieron una familia de transformaciones que pueden reducir la curtosis, la asimetría e incluso solucionar las variaciones de la normalidad de la variable a analizar, y con ello lograr el cumplimiento de la hipótesis nula de los modelos de regresión. Esta familia se define como:

$$x(\lambda) = \begin{cases} \frac{x^\lambda - 1}{\lambda} & \text{si } \lambda \neq 0 \\ \log x & \text{si } \lambda = 0 \end{cases}$$

A pesar de que las transformaciones Box-Cox tienen diversas aplicaciones fuera de la normalización, en este documento únicamente se hace énfasis en sus bondades y aplicación para lograr que los datos sigan una distribución lo más parecida a la normalidad o forma gaussiana.

De acuerdo con la definición, los autores plantean que los valores deberían de ir típicamente de -2 a 2, pretendiendo encontrar un valor de λ que minimice las variaciones en los valores. Considerando que, el parámetro de potencia lambda cuando es cercano a 1, indicaría que se realizarían poca o ninguna transformación real (Pavlov et al., 2012). Las transformaciones Box-Cox más típicas son:

| λ | Transformador |
|-----------|----------------------|
| -2 | $\frac{1}{x^2}$ |
| -1 | $\frac{1}{x}$ |
| -0.5 | $\frac{1}{\sqrt{x}}$ |
| 0 | Log (x) |
| 0.5 | \sqrt{x} |
| 1 | x |
| 2 | x^2 |

Tabla 2.- Transformaciones Box-Cox en el intervalo de -2 a 2. De la Guía Gonzalez, s.f.

Si bien, se pueden estimar los valores de λ específicos y diferentes a los números enteros por el método de máxima verosimilitud y por el método bayesiano, estos cálculos se emplean sobre todo en modelos de regresión o modelos estadísticos robustos que emplean las transformaciones de Box-Cox fuera de sus bondades de normalización. En la mayoría de los casos, sobre todo en el área de investigación clínica, se opta por operadores clásicos o ya conocidos, dado que estos facilitan su implementación y el manejo teórico de los datos, así como la interpretación final (De la Guía González, s.f.).

En el área de investigación clínica, una vez que se han normalizado los datos, en muchas de las ocasiones es necesario un proceso adicional conocido como retrotransformación, esto dado que la transformación de los datos modifica tanto la distribución de los datos, como su unidad de medida original, esta retrotransformación ayuda a interpretar los resultados o compararlos con otros, de manera que se vuelve un proceso esencial (Lee, 2020). El proceso de retrotransformación se aplica técnicamente a través del operador matemático recíproco inverso aplicado para la transformación, con lo cual se obtienen los datos en su valor y escala original.

Una pregunta común cuando se aplica la transformación de los datos es si el uso de esta transformación no genera sesgo o podría ser considerada como trampa matemática. Sin embargo, es importante destacar que no hay ninguna razón para que la escala “natural” u original de los datos sea la única, o la mejor forma de representar los datos. Por ejemplo, “el pH, siempre se presenta como una medida logarítmica, al ser definido como: $pH =$

$-\log[H^+]$. Así, la escala “natural” es de 10^{-pH} , siendo esta escala natural muy incómoda de utilizar, y en su lugar, siempre se prefiere utilizar el logaritmo” (Bland et al, 1996).

No obstante, en los casos donde se requiere llevar a cabo el proceso de retrotransformación es importante tener presentes ciertas consideraciones, por ejemplo, de un analito cualquiera que se hayan obtenido los datos en una escala de mmol/L, la transformación logarítmica ajustaría sus datos a una distribución normal, y al mismo tiempo se afectaría las unidades en la que se expresa la concentración de este analito en particular. Sin embargo, a través de la retrotransformación por el operador de antilogaritmo se obtendría de nuevo la concentración expresada en mmol/L. Sin embargo, de estos mismos datos transformados, el antilogaritmo de los parámetros estadísticos descriptivos, como lo es la desviación estándar, no están dados en mmol/L. Para este parámetro se requiere tomar la diferencia entre cada observación, y la media logarítmica. Dado que la diferencia entre el logaritmo de dos números es el logaritmo de su relación, el cociente obtenido es un número puro adimensional, de forma que las unidades en las que se haya medido el analito no influyen, de forma que la desviación estándar en la escala logarítmica no se puede transformar a la escala original. En estos casos, donde sea necesario emplear la desviación o el error estándar, lo más fácil y lo recomendado es hacer todos los cálculos en la escala transformada y realizar la retrotransformación al final, si es necesario (Bland et al, 1996).

De esta manera, los procesos de transformación y retrotransformación se podrían analizar como procesos complementarios entre sí. Al realizar el proceso de transformación de los datos originales se favorece el ajustar la distribución de estos a una distribución de tipo normal o gaussiana, y con ello lograr inferencias estadísticas más poderosas. Por su parte, el realizar el proceso de retrotransformación, una vez realizadas las inferencias estadísticas, permite, en la mayoría de las ocasiones, el interpretar con mayor facilidad y claridad dentro del ámbito clínico los datos extraídos de los resultados antes normalizados. De tal forma que, cuando se habla de la estimación de LBR ambos procedimientos son complementarios y juegan un papel crítico en la obtención idónea de éstos.

2. JUSTIFICACIÓN

La evaluación de los marcadores de estrés celular, en la actualidad se ha propuesto como una herramienta para la evaluación de la función celular, así como predictores o indicadores de seguimiento en el tratamiento de enfermedades de impacto en la población, tales como diabetes tipo 2, hipertensión, Alzheimer, Parkinson, Huntington, entre otras. A pesar de la demostrada utilidad de estos biomarcadores, existe una carencia importante en términos de aplicabilidad y uso dentro del laboratorio clínico. Esta limitación se atribuye a qué, hasta la fecha, la medición de estos biomarcadores se realiza de forma aislada o mediante metodologías laboriosas y costosas, siendo factores que dificultan su integración en los procesos rutinarios del laboratorio clínico.

Dentro de este contexto, el presente proyecto de tesis se enfoca en abordar esta problemática mediante el desarrollo de un panel integral de biomarcadores de estrés celular. Tomando un enfoque integral, dado que la combinación de diferentes marcadores proporciona la oportunidad de superar limitaciones como lo son la incapacidad de los biomarcadores individuales para proporcionar una interpretación completa y precisa del estado de estrés celular en el paciente.

El panel integral propuesto busca ofrecer un conjunto de marcadores prácticos, precisos y fácilmente implementables, mejorando con ello, la eficiencia y accesibilidad en el laboratorio clínico de rutina. Simultáneamente, establece criterios específicos en una población bien delimitada, permitiendo una descripción puntual y precisa de la misma a través de los límites biológicos de referencia. Esta contextualización y especificación poblacional es la que permite proporcionar una base estadística sólida, misma que garantiza la validez y relevancia clínica del perfil para la población en general.

Este proyecto representa un paso crucial hacia una evaluación completa y accesible del estrés celular en los pacientes a través del laboratorio clínico. Busca superar las limitaciones existentes y contribuir a la evaluación de los marcadores de estrés celular dentro de la práctica clínica.

3. HIPÓTESIS

Mediante la cuantificación de marcadores redox en suero de la población universitaria de la Facultad de Ciencias Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla se pueden establecer los límites biológicos de referencia del perfil redox sérico.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Establecer los límites biológicos de referencia de los marcadores séricos de estrés oxidante en la población universitaria de la Facultad de Ciencias Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

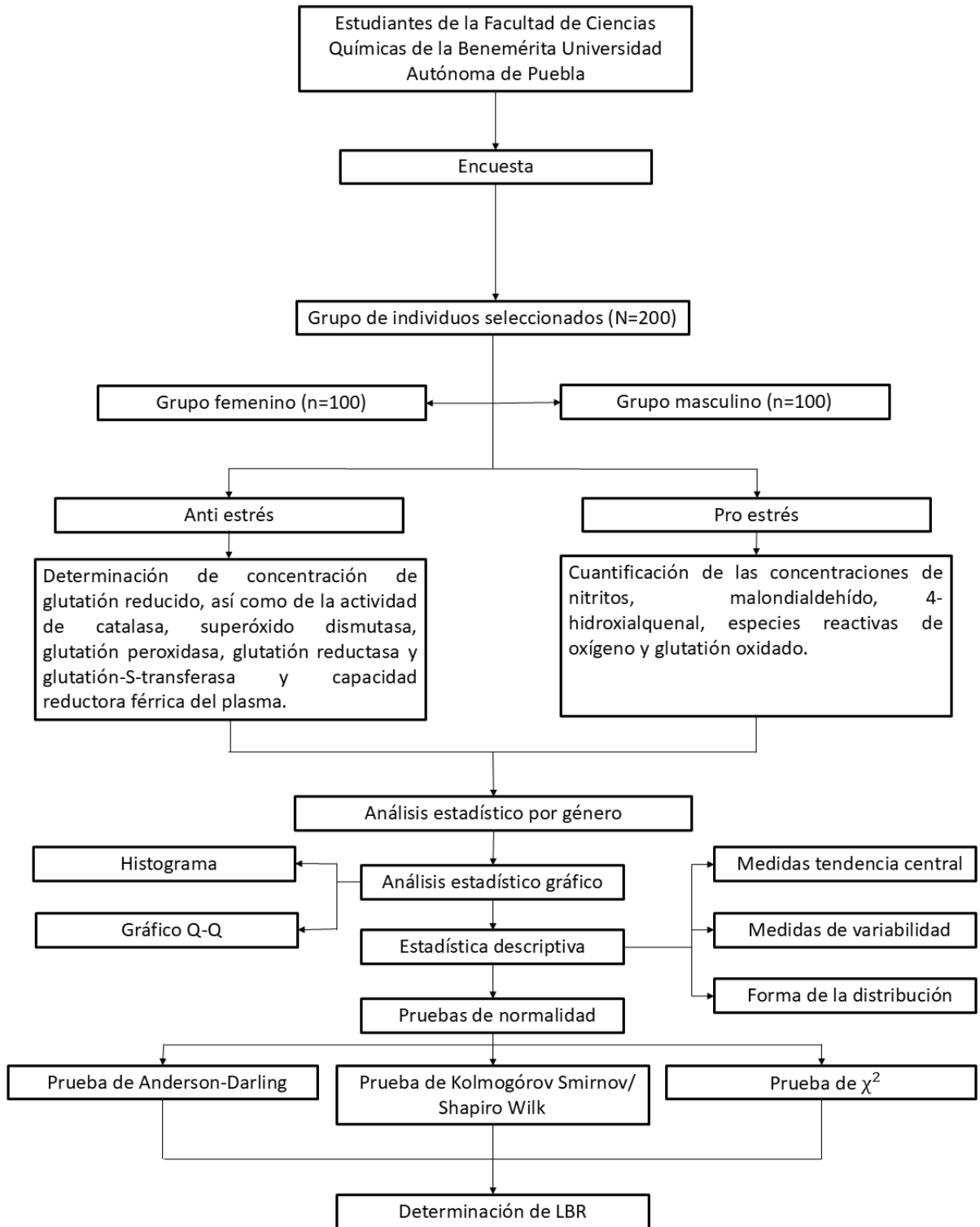
4.2 Objetivos específicos

- Cuantificar marcadores séricos del estado prooxidante en la población universitaria masculina y femenina de la Facultad de Ciencias Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

- Cuantificar marcadores séricos del estado antioxidante en la población universitaria masculina y femenina de la Facultad de Ciencias Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

- Establecer los límites biológicos de referencia de los marcadores del estado redox sérico en dicha población.

5. DIAGRAMA DE TRABAJO



6. METODOLOGÍA

El presente trabajo se realizó partiendo de los protocolos estandarizados de Ozarda et al (2013), que se generan a partir de la directriz internacional “*Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory*” publicada a partir de la colaboración de la IFCC y el CLSI, que en su última versión de 2010 fue designada como CLSI/IFCC EP28-A3c, (anteriormente C28-A3) (Ichihara et al, 2017). Dentro de la guía EP28-A3c se detallan los protocolos tanto a nivel pre y analítico, así como de análisis para la obtención de los IR, mientras que la revisión de Ozarda y sus colaboradores, parte de estos fundamentos pero también busca armonizar los procesos desde la selección de la muestra hasta el reporte y análisis de los datos, para lograr un abordaje multilaboratorios a nivel mundial, de manera que, puede asumirse que los criterios detallados a partir de este protocolo aseguran la alta calidad y confiabilidad en los IR obtenidos en diversas circunstancias.

6.1 Selección de la población

Criterios de inclusión

Pacientes fisiológicamente sanos que pertenezcan a la Facultad de Ciencias Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla entre 19 y 25 años. Estos pacientes estando libres de afecciones metabólicas, inmunológicas, neurológicas o similares ya sea de carácter agudo o crónico, presentando un resultado negativo a la prueba de determinación de proteína C reactiva, así como de cualquier criterio de exclusión que se detalla a continuación.

Criterios de exclusión

Cualquier paciente que se presente con más de 10 horas de ayuno. Pacientes que hayan manifestado o padezcan alguna clase de enfermedad crónica ya sea metabólica, inmunológica, neurológica, o similares, sea de carácter adquirido o hereditario, o que se encuentren bajo tratamiento médico de cualquier clase, ya sea de control hormonal, post infeccioso o que sea suplementado de forma regular con multivitamínicos, antioxidantes y/o similares. Se excluye también aquellos que hayan sufrido de algún proceso de inflamación o infección en los últimos 14 días antes de su participación en el estudio, esto incluye procesos como traumatismos, operaciones, infecciones estacionales virales o bacterianas o cualquier padecimiento que desencadene una respuesta inmune en el paciente. Del mismo modo

pacientes que hayan tenido un cambio de actividad física brusco en los últimos 14 días antes de su participación, en conjunto con aquellos pacientes que presenten una puntuación igual o mayor a 8 en el cuestionario de identificación de los trastornos debidos al consumo de alcohol (AUDIT) de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud.

Para el protocolo de obtención de muestra se estandarizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante y lo más cercano al desarrollo diario dentro del laboratorio clínico, el uso del torniquete se estandarizó a menos de 1 minuto, mientras que para la venopunción se empleó el sistema al vacío de BD. La muestra sanguínea se obtuvo en un tubo con activador de la coagulación, que transcurridos 30 minutos se centrifugó a 1300 g durante 10 minutos. Una vez obtenido el suero, se alicuotó para inmediatamente congelarse a -20 °C hasta el momento de las determinaciones.

6.2 Análisis bioquímico

Cuantificación de nitritos

La cuantificación de nitritos se realizará a partir del método de Griess, este se basa en una reacción de diazotización de dos pasos en la que el agente nitrosante derivado del $\bullet\text{NO}^-$ generado a partir de la formación catalizada por ácido de ácido nitroso a partir de nitrito reacciona con sulfanilamida para producir un ion diazonio que luego se acopla a N(1-naftil)etilindiamina para formar un producto azo cromóforo que se absorbe a 540 nm (Tsikas, 2005). El reactivo de Griess para este método se compone de volúmenes iguales de dihidrocloruro de n-1-naftiletildiamino al 0.1% disuelto en agua destilada y sulfanilamida al 1.32% disuelta en ácido acético al 60%. La reacción colorimétrica es inducida por la adición de 100 μL de reactivo de Griess a 100 μL del sobrenadante del suero. Se ajusta la reacción a 1 mL con agua destilada. El producto de reacción se lee en un espectrofotómetro a 540 nm. La concentración de NO_2 se determina interpolando la densidad óptica de las muestras en una curva estándar de NaNO_2 (0.5 a 10 μM), la cual es determinada paralelamente en cada ensayo (Chao C., 1992).

Cuantificación de productos de lipoperoxidación

La cuantificación de los productos de lipoperoxidación se realizó a partir de la reacción que presentan estas moléculas con el 1-metil-2-fenilindol. En condiciones ácidas el

1- metil-2-fenilindol reacciona con el malondialdehído (MDA) y los 4-hidroxi-alquenos (HNE) para producir un cromóforo estable, el cual presenta su absorbancia máxima a 586 nm. El uso de ácido metanosulfónico da como resultado una conversión adecuada tanto de MDA como de HNE hacia la formación del cromóforo, por otra parte, el emplear ácido clorhídrico en la reacción favorece la formación del cromóforo a partir de MDA y genera una reacción de ciclización irreversible en HNE. Aprovechando estas reacciones cromogénicas se permite realizar la cuantificación de los productos de lipoperoxidación en conjunto al mismo tiempo que cada uno de sus constituyentes (Gérard-Monnier D. et al, 1997).

Capacidad de reducción férrica del plasma

Este ensayo mide la capacidad de reducción férrica del plasma (FRAP). Las condiciones de la prueba, pH bajo, favorecen la reducción del complejo ferri-tripiridil-triazina (Fe^{III} -TPTZ) que se convierte en su forma ferrosa (Fe^{II}), siempre que se encuentre presente un agente reductor. La reducción del complejo desarrolla un color azul intenso con un máximo de absorción a 593 nm. El ensayo presenta un exceso de Fe^{III} , de tal forma que el factor limitante de la tasa de formación del complejo coloreado Fe^{II} -TPTZ, es por tanto la capacidad reductora de la muestra (Benzie et al, 1996).

Cuantificación de especies reactivas de oxígeno (ERO's)

Este ensayo empleará la sonda fluorogénica 2',7'-diclorohidrofluorescina de diacetato (DCFH-DA). El 2',7'-diclorohidrofluorescina de diacetato es desacetilado por esterasas a 2',7'-diclorohidrofluorescina (DCFH) no fluorescente que se oxida rápidamente a 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCF) altamente fluorescente en presencia de ERO's presentes en la muestra. La intensidad de la fluorescencia obtenida es proporcional a los niveles de ERO's en la muestra. Para los cálculos de la actividad de ERO's sobre DCFH-DA se analizan las absorbancias obtenidas frente a la fluorescencia del estándar de DCF.

Cuantificación de glutatión

El contenido de glutatión en muestras biológicas se determinará mediante la técnica de reciclaje enzimático basada en el uso de la enzima glutatión reductasa. El glutatión es oxidado por el ácido 5,5'-2-nitrobenzoico (DTNB) y reducido por NADPH en presencia de

glutación reductasa. La formación del ácido 2-nitro-5-tiobenzoico fue monitoreada a 412 nm y el glutación presente fue evaluado por comparación del resultado con la curva estándar. El método detecta al glutación total y GSSG. El procedimiento es específico para GSSG cuando se usa 2-vinilpiridina o 4-vinilpiridina para formar enlaces covalentes y así enmascarar al GSH, que no inhiben a glutación reductasa (Griffith, 1980). Para el cálculo de la concentración de GSH, se realizará la siguiente operación: $GSH = \text{glutación total} - GSSG$. Para el cálculo del índice redox se utilizará la siguiente operación $\text{índice redox} = 2GSH / GSSG$ (Griffith, 1980).

6.3 Análisis enzimático

Actividad de superóxido dismutasa

La determinación de la actividad de superóxido dismutasa se realizará a través del método que fue establecido por Marklund y Marklund y descrito por Roth y Gilbert (Katerji et al, 2019). A partir de esta técnica se determina la capacidad de la SOD para inhibir la autooxidación del pirogalol en una solución de pH 8.2. El medio básico favorece tanto la autooxidación como la propagación de esta lo que genera la forma oxidada del Pirogallol que se puede medir a una absorbancia de 420 nm (Marklund et al, 1974). La presencia de la SOD inhibe la reacción de autooxidación al evitar las reacciones de propagación. Por convenio se toma como 1 U de superóxido dismutasa la cantidad de enzima que inhibe en un 50% la reacción de autooxidación de pirogallol a 25° y pH = 8.2.

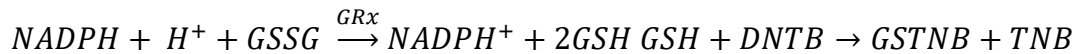
Actividad de catalasa

La catalasa muestra un comportamiento enzimático de la descomposición del H_2O_2 como reacción de primer orden, cuya velocidad es proporcional a la concentración de peróxido presente. La descomposición de H_2O_2 es directamente proporcional a la disminución de la absorbancia a 240 nm. La diferencia en la absorbancia (ΔA_{240}) por unidad de tiempo es una medida de la actividad de la catalasa dado la cinética que presenta la reacción. Para evitar la inactivación de la enzima durante el ensayo o la formación de burbujas en la cubeta debido a la liberación de O_2 , es necesario utilizar una concentración de H_2O_2 relativamente baja (30 mM). La concentración de H_2O_2 es crítico en la medida en que

hay proporcionalidad directa entre la concentración de sustrato y la velocidad de descomposición. Debido a la situación especial en la catalasa, la dependencia de la temperatura en la descomposición del H₂O₂ es despreciable (Q₁₀ = 1,1), de modo que las mediciones pueden llevarse a cabo entre 0 y 37 °C; Sin embargo, se recomiendan 20 °C. La curva de pH con respecto a la actividad V₀ tiene un pH óptimo amplio (pH 6.8 a 7.5), por tanto, la medición se realizará a pH 7,0 (Aebi H., 1984).

Actividad de glutatión reductasa

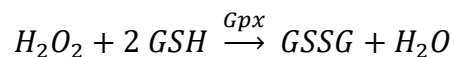
El método por emplear se fundamenta en el incremento de la absorbancia a 412 nm cuando el 5,5'-ditiobis (2-ácido nitrobenzoico) (DNTB) es reducido por el GSH. La reacción condensada sigue de la siguiente manera:



El ensayo es monitoreado durante 5 minutos, para posteriormente calcular la delta de absorbancias, de forma que la intensidad del color es proporcional a la actividad enzimática presente en la muestra (Smith, 1988).

Actividad de glutatión peroxidasa

Este ensayo se fundamenta en la reacción catalizada por la glutatión peroxidasa:



Para poder llevar a cabo esta reacción se empleará como donante de electrones al NADPH, de forma que una vez lograda la reducción del peróxido de hidrógeno se obtiene la formación del GSSG. En el ensayo, las condiciones presentan un exceso de glutatión reductasa de forma que se mantienen casi constantes las concentraciones de GSH, llevando la cinética de la reacción a un pseudo orden de cero, con lo que la degradación de la concentración de NADPH indica la actividad enzimática presente en la muestra. La oxidación del NADPH puede ser monitoreada fotométricamente a 340 nm, de manera que los cálculos de la actividad enzimática se van a llevar a cabo a partir del decremento de la concentración de NADPH usando el coeficiente de extinción y las diferencias de las absorbancias durante los 3 minutos que se monitorea el ensayo (Flohé y Günzler, 1984).

7. RESULTADOS

A continuación, se presentan los resultados de los analitos divididos por género.

Tabla 3. Resultados de los marcadores del estado redox a nivel sérico del género masculino

| Analito | Medidas de tendencia central | | Medidas de variabilidad | | Medidas de forma de la distribución | |
|------------------|------------------------------|---------------|-------------------------|-------|-------------------------------------|-----------|
| | \bar{x} | Mediana | <i>s</i> | C.V. | Curtosis | Asimetría |
| <i>cLT</i> | 1.523 μ M | 1.464 μ M | 0.913 | 0.599 | 4.334 | 1.388 |
| <i>c4-HNE</i> | 1.316 μ M | 1.276 μ M | 0.929 | 0.705 | 2.678 | 1.177 |
| <i>cMDA</i> | 0.306 μ M | 0.241 μ M | 0.248 | 0.809 | 3.149 | 1.470 |
| <i>cNitritos</i> | 0.954 μ M | 0.667 μ M | 0.805 | 0.737 | 7.786 | 2.339 |
| <i>aSOD</i> | 7.741 U/mL | 4.931 U/mL | 4.857 | 0.650 | 2.402 | 1.795 |
| <i>aCAT</i> | 16.161 U/mL | 13.850 U/mL | 13.937 | 0.862 | 10.812 | 2.863 |
| <i>CRFP</i> | 153.401 μ mol/L | 142.750 | 93.604 | 0.610 | 1.343 | 0.968 |
| <i>cERO's</i> | 3.886 nM | 2.846 nM | 6.347 | 0.600 | 47.436 | 6.502 |
| <i>cGT</i> | 6.760 μ M | 7.020 μ M | 1.700 | 0.251 | -0.060 | -0.270 |
| <i>cGSH</i> | 6.860 μ M | 6.970 μ M | 2.240 | 0.327 | 2.060 | 0.640 |
| <i>cGSSG</i> | 0.024 μ M | 0.020 μ M | 0.018 | 0.738 | 3.409 | 1.828 |
| <i>aGRx</i> | 24.500 U/mL | 14.470 U/mL | 24.340 | 0.993 | 4.690 | 2.000 |
| <i>aGSTx</i> | 1804.73 U/mL | 1529.14 | 1226.26 | 0.679 | -0.210 | 0.810 |
| <i>aGPx</i> | 16.430 U/mL | 13.440 | 12.210 | 0.743 | 7.700 | 2.710 |

Tabla 4. Resultados de los marcadores del estado redox a nivel sérico del género femenino

| Analito | Medidas de tendencia central | | Medidas de variabilidad | | Medidas de forma de la distribución | |
|------------------|------------------------------|---------------------|-------------------------|-------|-------------------------------------|-----------|
| | \bar{x} | Mediana | <i>s</i> | C.V. | Curtosis | Asimetría |
| <i>cLT</i> | 1.707 μ M | 1.733 μ M | 0.884 | 0.517 | 3.751 | 1.004 |
| <i>c4-HNE</i> | 1.492 μ M | 1.468 μ M | 0.916 | 0.614 | 1.914 | 0.758 |
| <i>cMDA</i> | 0.290 μ M | 0.215 μ M | 0.237 | 0.846 | 3.144 | 1.668 |
| <i>cNitritos</i> | 0.646 μ M | 0.514 μ M | 0.505 | 0.715 | 2.218 | 1.340 |
| <i>aSOD</i> | 7.256 U/mL | 6.138 U/mL | 3.306 | 0.455 | 0.535 | 1.139 |
| <i>aCAT</i> | 16.950 U/mL | 9.002 U/mL | 29.280 | 0.172 | 45.222 | 6.060 |
| <i>CRFP</i> | 187.086 μ mol/L | 196.500 μ mol/L | 76.096 | 0.406 | -0.181 | -0.129 |

| | | | | | | |
|---------------|---------------|---------------|----------|-------|-------|--------|
| <i>cERO's</i> | 3.153 nM | 2.651 nM | 2.370 | 0.510 | 6.745 | 2.241 |
| <i>cGT</i> | 6.620 μ M | 6.800 μ M | 1.980 | 0.299 | 3.180 | 0.750 |
| <i>cGSH</i> | 6.510 μ M | 6.860 μ M | 1.540 | 0.236 | 0.100 | -0.360 |
| <i>cGSSG</i> | 0.025 μ M | 0.020 μ M | 0.020 | 0.815 | 5.708 | 2.079 |
| <i>aGRx</i> | 22.700 U/mL | 16.080 U/mL | 20.960 | 0.923 | 1.900 | 1.350 |
| <i>aGSTx</i> | 1236.06 U/mL | 881.240 U/mL | 1072.730 | 0.867 | 5.920 | 2.000 |
| <i>aGPx</i> | 13.880 U/mL | 12.560 U/mL | 7.900 | 0.568 | 3.880 | 1.760 |

A partir de estos resultados, se realizó una prueba de docimasia de hipótesis para diferencias de medias de muestras grandes ($n \geq 30$) para comprobar si existía o no diferencias estadísticamente significativas atribuibles al género, los resultados de este análisis estadístico se muestran en la tabla siguiente

Tabla 5. Docimasia de hipótesis para diferencias estadísticamente significativas atribuibles al género para cada uno de los analitos.

| <i>Mesurando</i> | <i>Valor de Z obtenido por docimasia de hipótesis</i> | <i>Decisión respecto a la H_0</i> |
|------------------|---|--|
| <i>cLT</i> | -1.53 | Se acepta |
| <i>cMDA</i> | 0.72 | Se acepta |
| <i>c4-HNE</i> | -1.35 | Se acepta |
| <i>cNitritos</i> | 3.52 | Se rechaza |
| <i>aCAT</i> | -0.25 | Se acepta |
| <i>aSOD</i> | 0.20 | Se acepta |
| <i>cERO's</i> | 0.48 | Se acepta |
| <i>CRFP</i> | -1.94 | Se acepta |
| <i>cGT</i> | 0.37 | Se acepta |
| <i>cGSH</i> | -8.83 | Se rechaza |
| <i>cGSSG</i> | -5.95 | Se rechaza |
| <i>aGRx</i> | 0.56 | Se acepta |
| <i>aGSTx</i> | 2.34 | Se rechaza |
| <i>aGPx</i> | 0.97 | Se acepta |

Resultados de la prueba de docimasia de hipótesis para cada analito. Los analitos dentro del intervalo de +/- 1.96 con respecto al valor de Z no presentan evidencia estadística para rechazar H_0 .

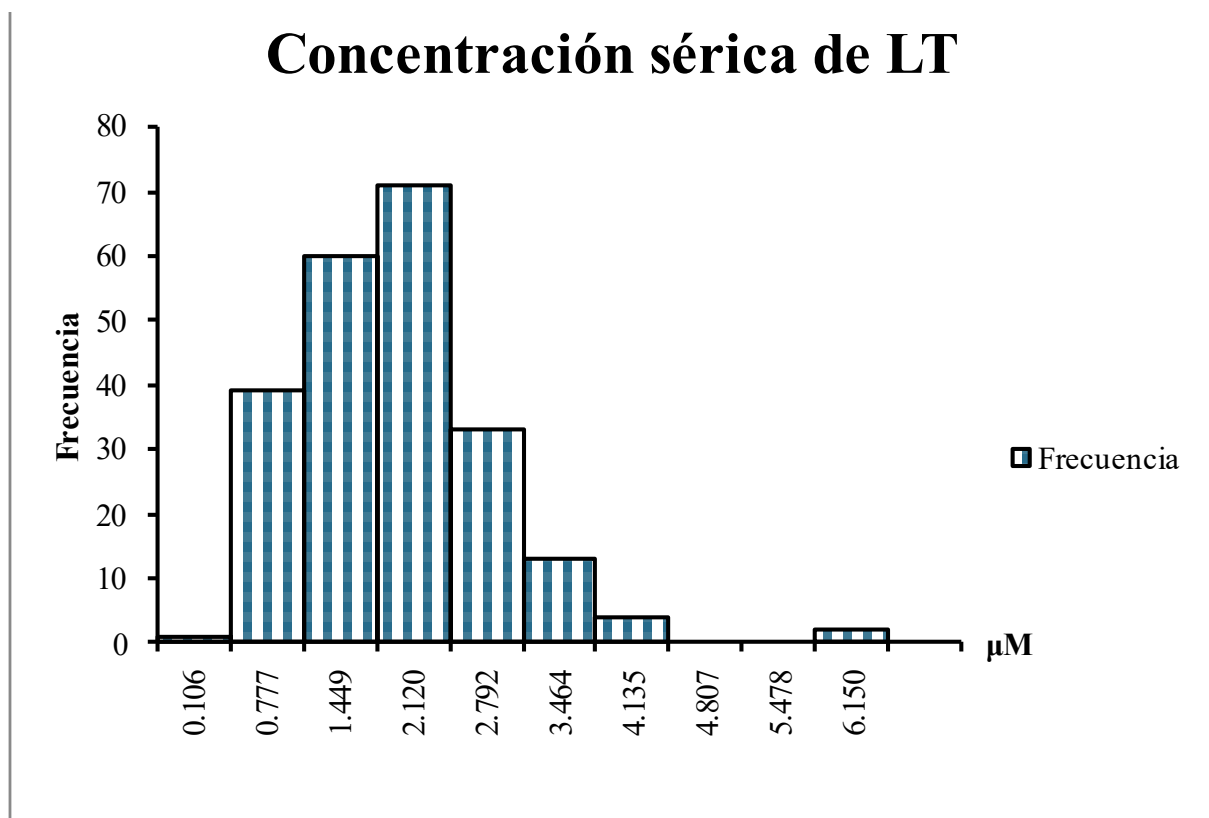
Una vez analizadas los resultados de la docimasia de hipótesis en los diversos analitos se dio paso a condensarlos como una sola población; con ello dando paso a los resultados siguientes.

En un primer momento se presentan y describen los resultados obtenidos para los analitos que inicialmente seguían una distribución de tipo gaussiana (normal), los cuales son cLT, cERO's, CFRP, cGT y cGSH.

7.2 Parámetros con distribución inicial de tipo normal

| <i>Analito</i> | Medidas de tendencia central | | Medidas de variabilidad | | Medidas de forma de la distribución | |
|----------------|------------------------------|---------------|-------------------------|--------|-------------------------------------|-----------|
| | \bar{x} | Mediana | <i>s</i> | C.V. | Curtosis | Asimetría |
| <i>cLT</i> | 1.613 μ M | 1.560 μ M | 0.901 | 55.9 % | 3.773 | 1.173 |

Gráfico 1. Histograma de LT



cERO's

| | |
|-------------------------------------|----------|
| Medidas de tendencia central | |
| \bar{x} | 2.802 nM |
| Mediana | 2.718 nM |
| Medidas de variabilidad | |
| s | 1.592 |
| C.V. | 0.568 |
| Medidas de forma de la distribución | |
| Curtosis | 0.417 |
| Asimetría | 0.594 |

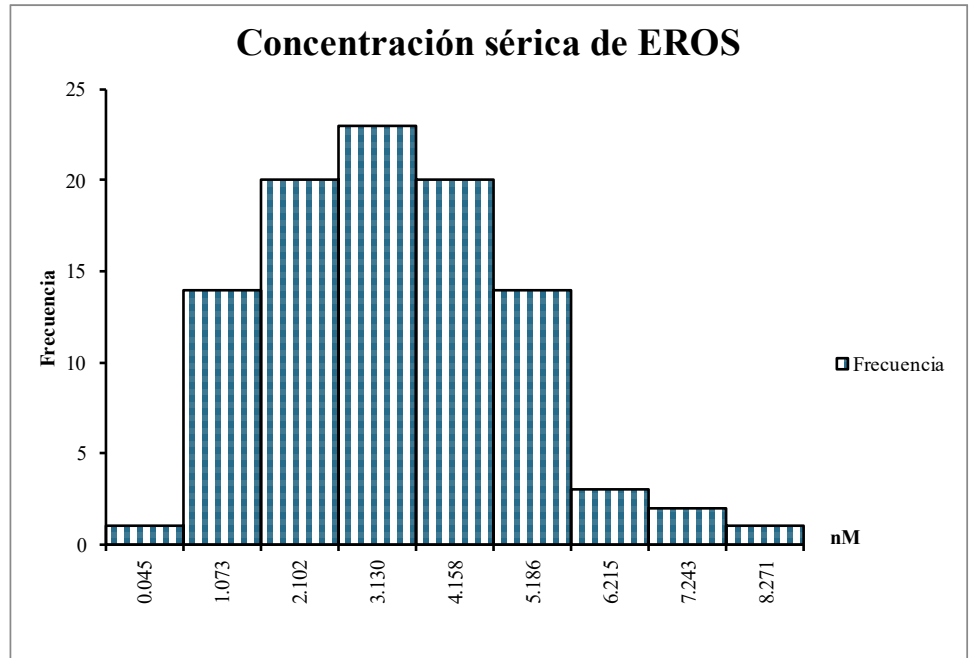


Gráfico 2. Histograma de concentración sérica de ERO's

CRFP

| | |
|-------------------------------------|---------------------------|
| Medidas de tendencia central | |
| \bar{x} | 176.771 $\mu\text{mol/L}$ |
| Mediana | 160.250 $\mu\text{mol/L}$ |
| Medidas de variabilidad | |
| s | 99.267 |
| C.V. | 0.562 |
| Medidas de forma de la distribución | |
| Curtosis | 1.708 |
| Asimetría | 0.963 |

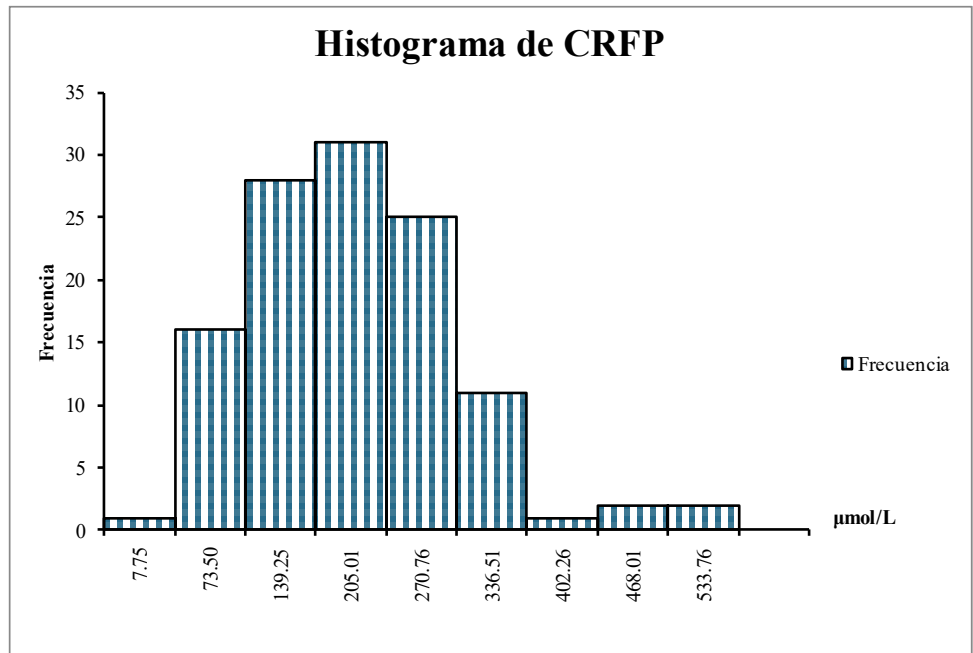


Gráfico 3. Histograma de CRFP

cGT

| Medidas de tendencia central | |
|-------------------------------------|---------------------|
| \bar{x} | 6.600 μM |
| Mediana | 6.890 μM |
| Medidas de variabilidad | |
| s | 1.690 |
| C.V. | 0.279 |
| Medidas de forma de la distribución | |
| Curtosis | -0.180 |
| Asimetría | -0.300 |

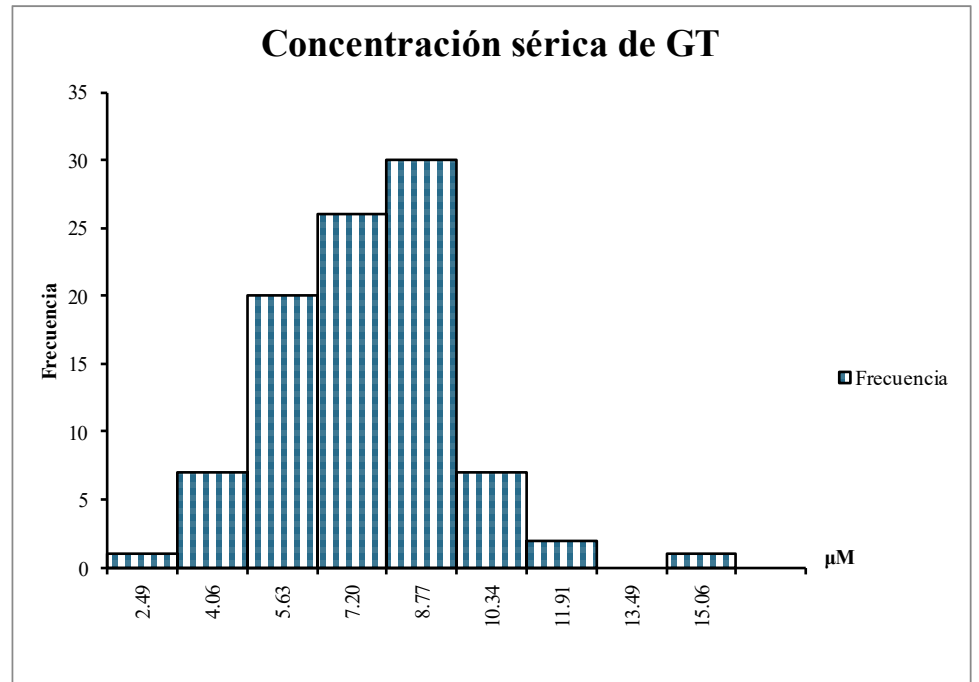


Gráfico 4. Histograma de concentración sérica de GT

cGSH

| Medidas de tendencia central | |
|-------------------------------------|---------------------|
| \bar{x} | 6.656 μM |
| Mediana | 6.878 μM |
| Medidas de variabilidad | |
| s | 1.861 |
| C.V. | 0.280 |
| Medidas de forma de la distribución | |
| Curtosis | 2.236 |
| Asimetría | 0.435 |

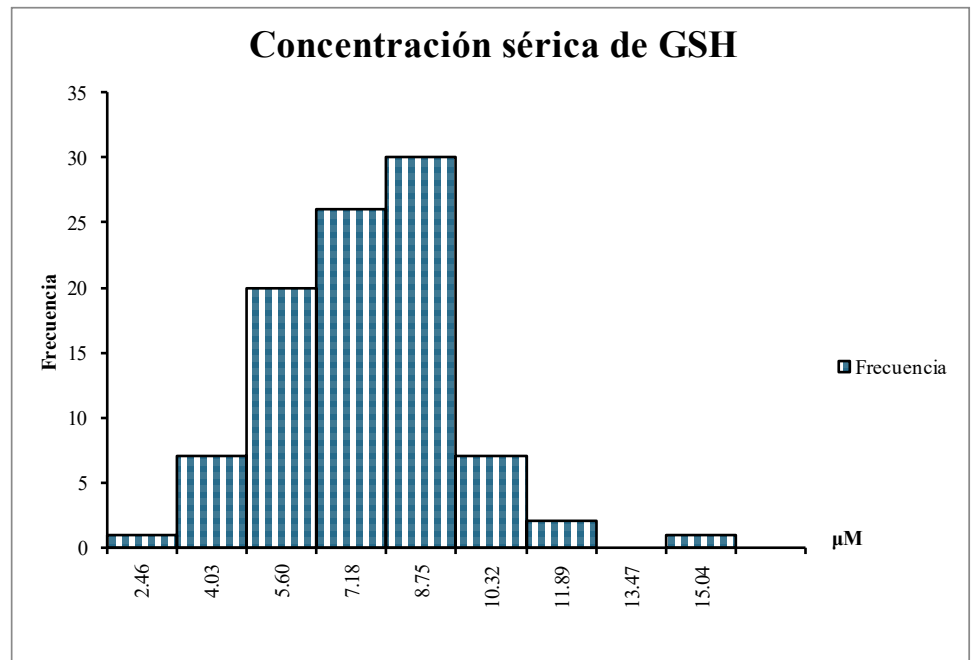


Gráfico 5. Histograma de concentración sérica de GSH.

Posteriormente se realizaron las pruebas de bondad de ajuste: χ^2 , KS y AD (Ver anexos V-VII) para evaluar estadísticamente si el comportamiento de los datos tiende a una distribución normal o no. En la tabla 6 se presentan los valores de p para las pruebas de KS y AD. Se encuentra que el valor p es mayor a 0.05 en: *cLT*, *cERO's*, *CFRP*. Sin embargo, en el caso de *cGT* y *cGSH* los valores de p son menores a 0.05.

Tabla 6. Condensado de resultados de pruebas de bondad de ajuste KS y AD.

| <i>Analito</i> | <i>Kolmogórov-Smirnov</i> | <i>Anderson-Darling</i> |
|----------------|---------------------------|-------------------------|
| <i>cLT</i> | $p= 0.7724$ | $p= 0.1618$ |
| <i>cERO's</i> | $p= 0.6115$ | $p=0.0704$ |
| <i>CFRP</i> | $p= 0.7738$ | $p=0.3134$ |
| <i>cGT</i> | $p= 0.2028$ | $p=0.0251$ |
| <i>cGSH</i> | $p= 0.1933$ | $p=0.0222$ |

Se resaltan los resultados donde se obtuvo un valor de $p \leq 0.05$.

Con el método de transformación matemática de elevar al cuadrado los resultados de *cGT* y *cGSH* se obtuvo un valor de p mayor a 0.05, como se puede apreciar en la tabla 7.

Una vez que se comprobó la normalidad de los datos se realizó la estimación de los intervalos de confianza con un 95% de significancia (Ver anexo VIII).

Tabla 7. Transformación para la corrección de la prueba AD.

| <i>Analito</i> | Transformación | Valor de p |
|----------------|-----------------------|-------------|
| <i>cGT</i> | Elevación al cuadrado | $p= 0.1363$ |
| <i>cGSH</i> | Elevación al cuadrado | $p=0.1185$ |

Finalmente se establecieron los límites biológicos de referencia de cada analito (Ver tabla 8).

Tabla 8. LBR para cada analito.

| <i>Analito</i> | <i>LBR</i> |
|-----------------------|---------------------------------|
| <i>cLT</i> | Menor a 3.15 μM |
| <i>cERO's</i> | Menor a 3.75 nM |
| <i>CFRP</i> | Menor a 344.9 $\mu\text{mol/L}$ |
| <i>cGT</i> | 1.90 – 9.44 μM |
| <i>cGSH</i> | 1.88 – 9.40 μM |

Retomando los analitos que no presentaron una distribución de tipo gaussiana: c4-HNE, aCAT, cGSSG, aGRx, aGPx, aGSTx y aSOD (gráficos 6 al 14). Se analizaron los datos mediante la estadística descriptiva, así como la distribución de estos de manera gráfica y posteriormente se aplicaron las pruebas de bondad de ajuste: χ^2 , KS y AD. (Ver anexos V-VII) (tabla 6).

7.2 Parámetros con distribución inicial de tipo no normal

cMDA

| Medidas de tendencia central | |
|-------------------------------------|---------------------|
| \bar{x} | 0.266 μM |
| Mediana | 0.221 μM |
| Medidas de variabilidad | |
| <i>s</i> | 0.191 |
| C.V. | 0.807 |
| Medidas de forma de la distribución | |
| Curtosis | -0.239 |
| Asimetría | 0.768 |

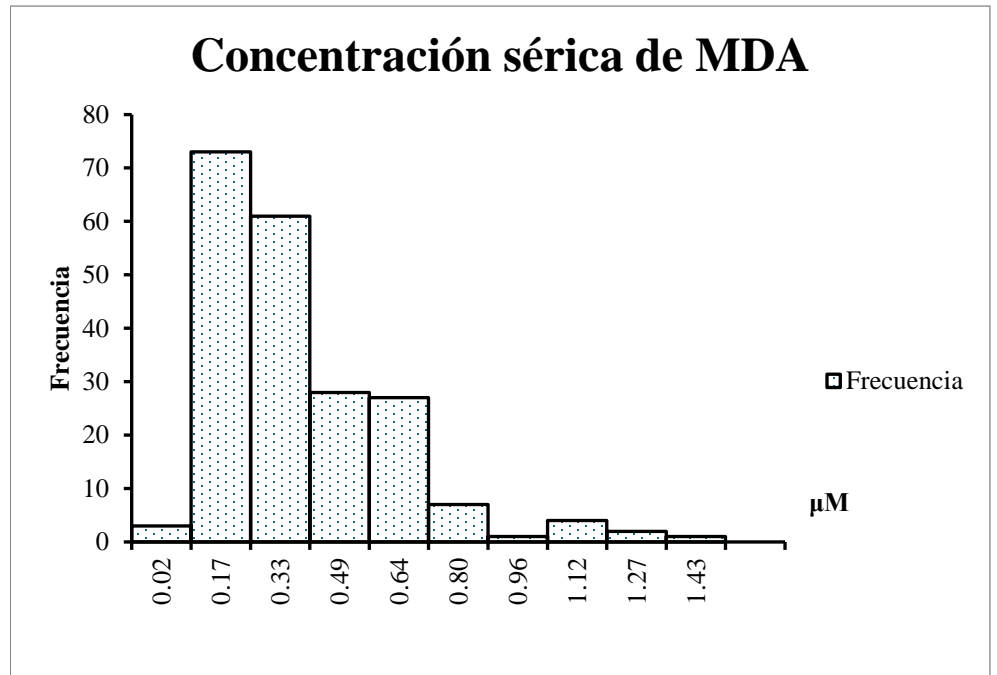


Gráfico 6.- Histograma de concentración sérica de MDA

c4-HNE

| Medidas de tendencia central | |
|-------------------------------------|---------------------|
| \bar{x} | 1.363 μM |
| Mediana | 1.359 μM |
| Medidas de variabilidad | |
| <i>s</i> | 0.837 |
| C.V. | 0.659 |
| Medidas de forma de la distribución | |
| Curtosis | -0.635 |
| Asimetría | 0.334 |

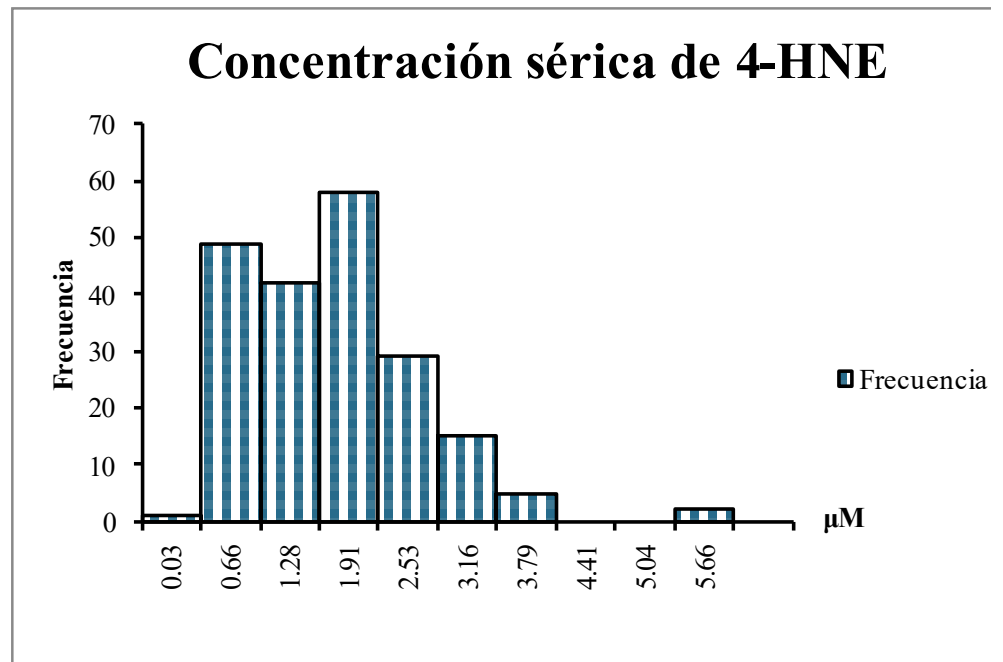


Gráfico 7. Histograma de concentración sérica de 4-HNE

cNitritos

| | |
|-------------------------------------|---------------------|
| Medidas de tendencia central | |
| \bar{x} | 0.807 μM |
| Mediana | 0.591 μM |
| Medidas de variabilidad | |
| s | 0.694 |
| C.V. | 0.861 |
| Medidas de forma de la distribución | |
| Curtosis | 9.294 |
| Asimetría | 2.396 |

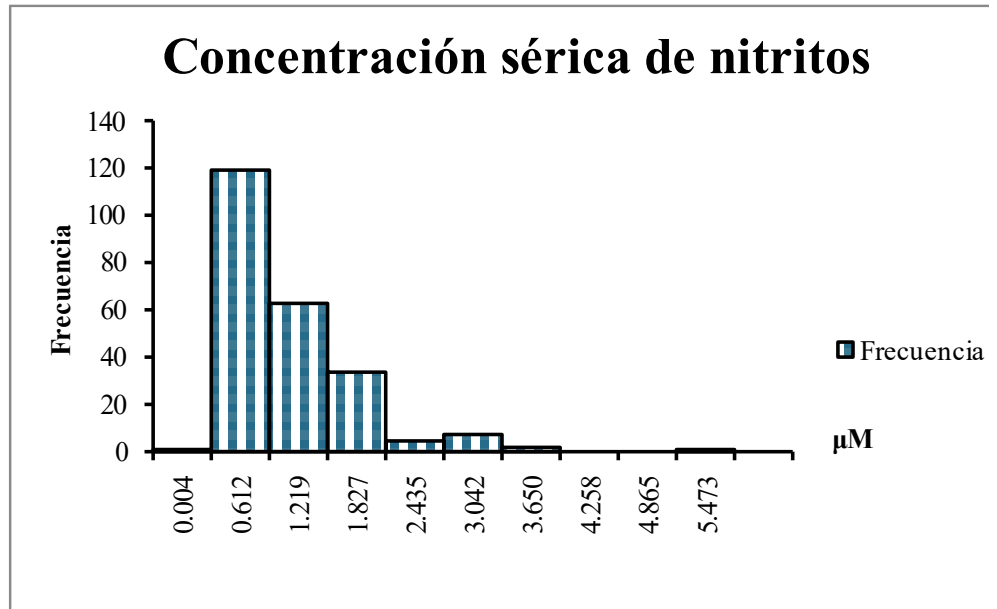


Gráfico 8. Histograma de concentración de nitritos

aCAT

| | |
|-------------------------------------|-------------|
| Medidas de tendencia central | |
| \bar{x} | 12.480 U/mL |
| Mediana | 9.695 U/mL |
| Medidas de variabilidad | |
| s | 8.377 |
| C.V. | 0.951 |
| Medidas de forma de la distribución | |
| Curtosis | 1.104 |
| Asimetría | 1.108 |

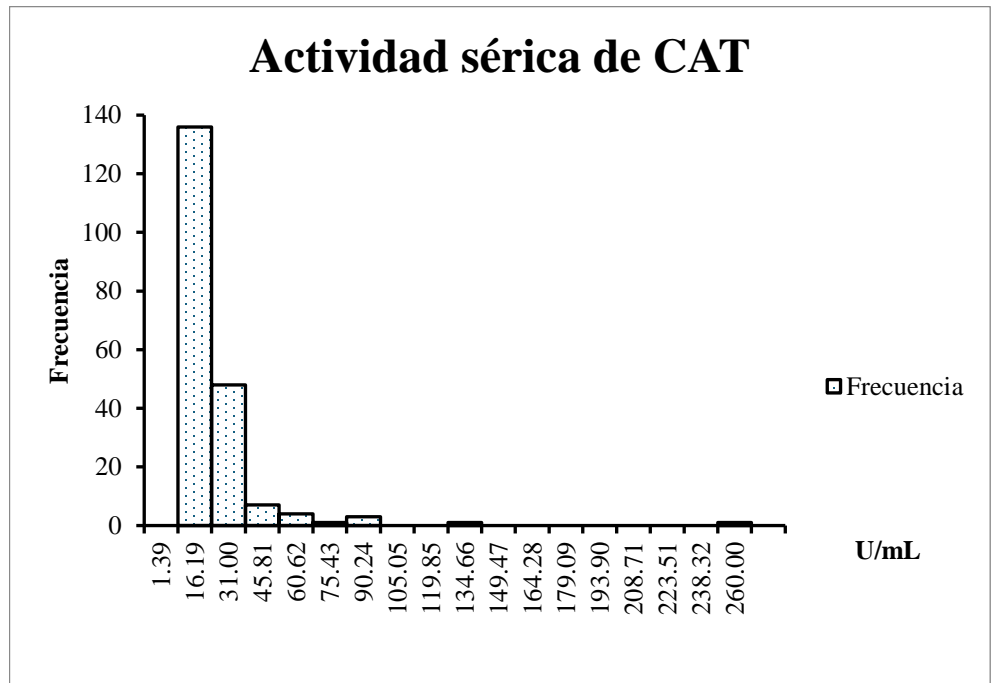


Gráfico 9. Histograma de actividad sérica de CAT

cGSSG

| | |
|-------------------------------------|---------------------|
| Medidas de tendencia central | |
| \bar{x} | 0.025 μM |
| Mediana | 0.020 μM |
| Medidas de variabilidad | |
| s | 0.019 |
| C.V. | 0.782 |
| Medidas de forma de la distribución | |
| Curtosis | 4.869 |
| Asimetría | 1.982 |

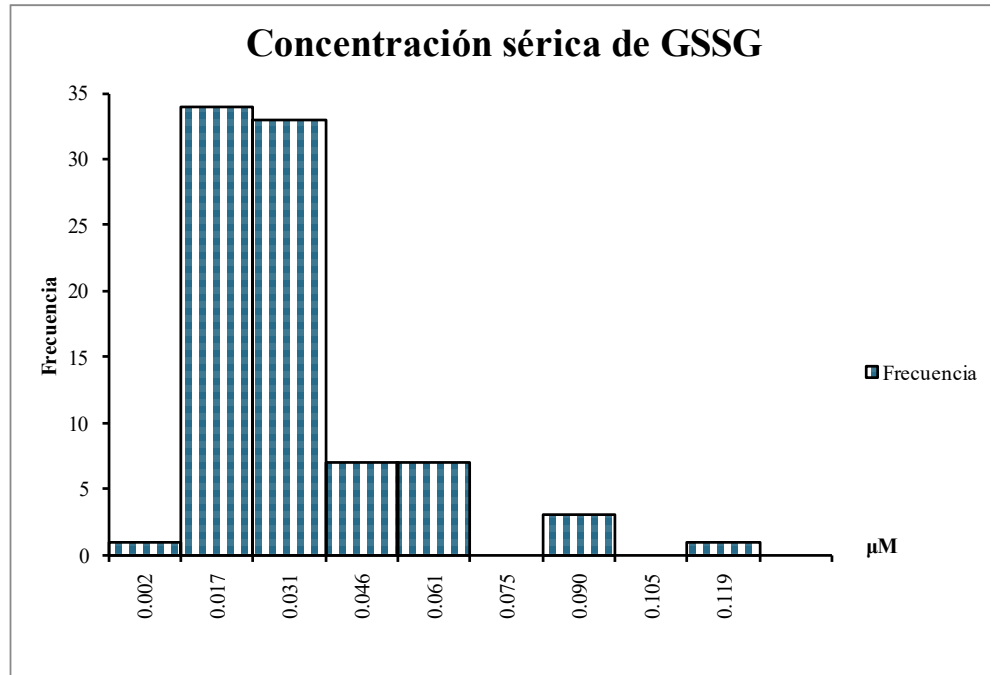


Gráfico 10. Histograma de concentración sérica de GSSG

aGPx

| | |
|-------------------------------------|-------------|
| Medidas de tendencia central | |
| \bar{x} | 14.950 U/mL |
| Mediana | 13.200 U/mL |
| Medidas de variabilidad | |
| s | 9.920 |
| C.V. | 0.664 |
| Medidas de forma de la distribución | |
| Curtosis | 8.630 |
| Asimetría | 2.640 |

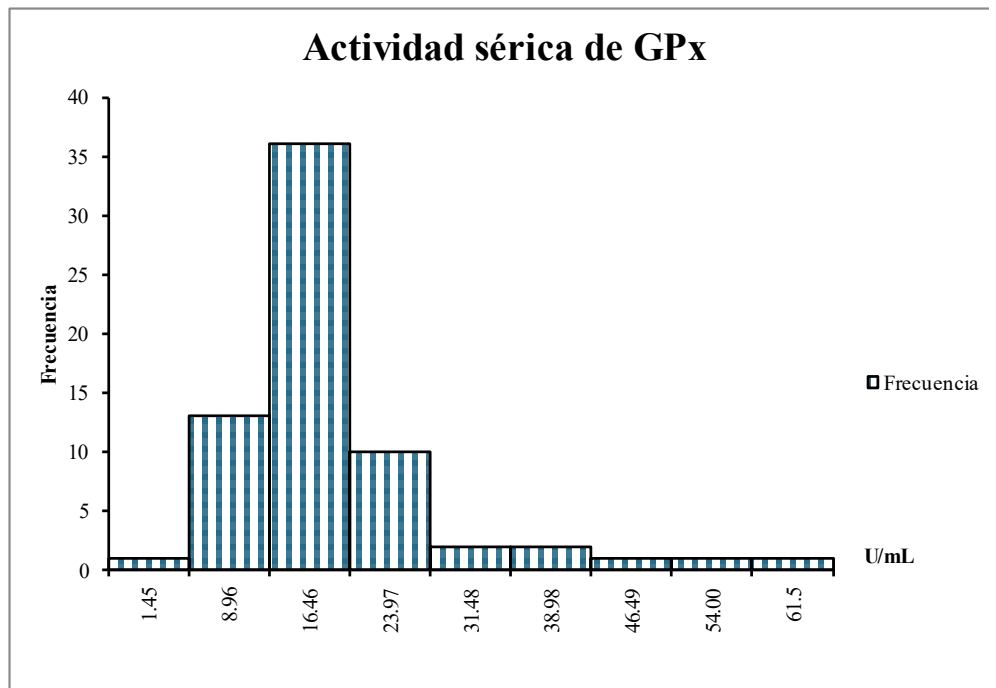


Gráfico 11. Histograma de actividad sérica de GPx

aSOD

| | |
|-------------------------------------|------------|
| Medidas de tendencia central | |
| \bar{x} | 7.273 U/mL |
| Mediana | 5.793 U/mL |
| Medidas de variabilidad | |
| s | 4.051 |
| C.V. | 0.557 |
| Medidas de forma de la distribución | |
| Curtois | 2.723 |
| Asimetría | 1.734 |

Actividad sérica de SOD

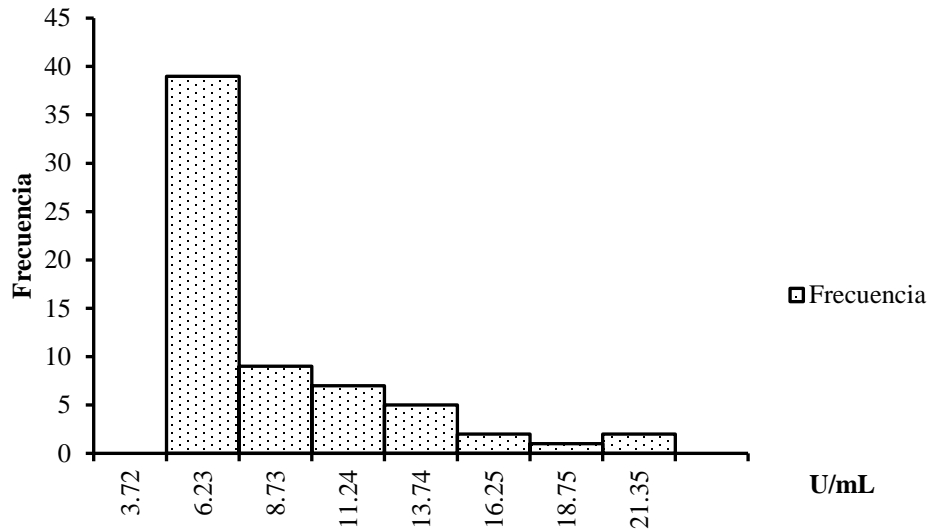


Gráfico 12. Histograma de actividad de SOD

aGRx

| | |
|-------------------------------------|-----------|
| Medidas de tendencia central | |
| \bar{x} | 20.8 U/mL |
| Mediana | 14.4 U/mL |
| Medidas de variabilidad | |
| s | 17.280 |
| C.V. | 0.954 |
| Medidas de forma de la distribución | |
| Curtois | -0.120 |
| Asimetría | 0.910 |

Actividad serica de GRx

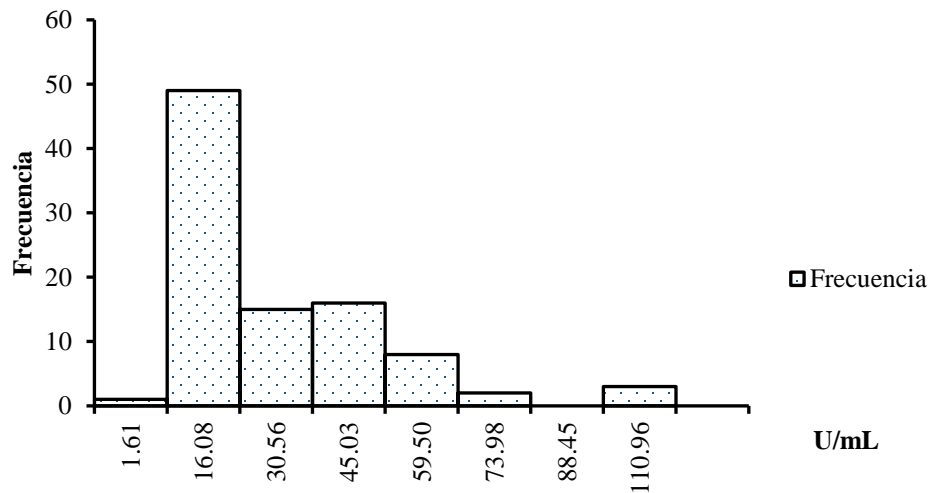


Gráfico 13. Histograma de actividad de GRx

aGSTx

| | |
|-------------------------------------|---------------|
| Medidas de tendencia central | |
| \bar{x} | 7.273 U/mL |
| Mediana | 5.793 U/mL |
| Medidas de variabilidad | |
| s | 4.051 |
| C.V. | 0.557 |
| Medidas de forma de la distribución | |
| Curtosis | 2.723 |
| Asimetría | 1.734 |

Actividad sérica de GSTx

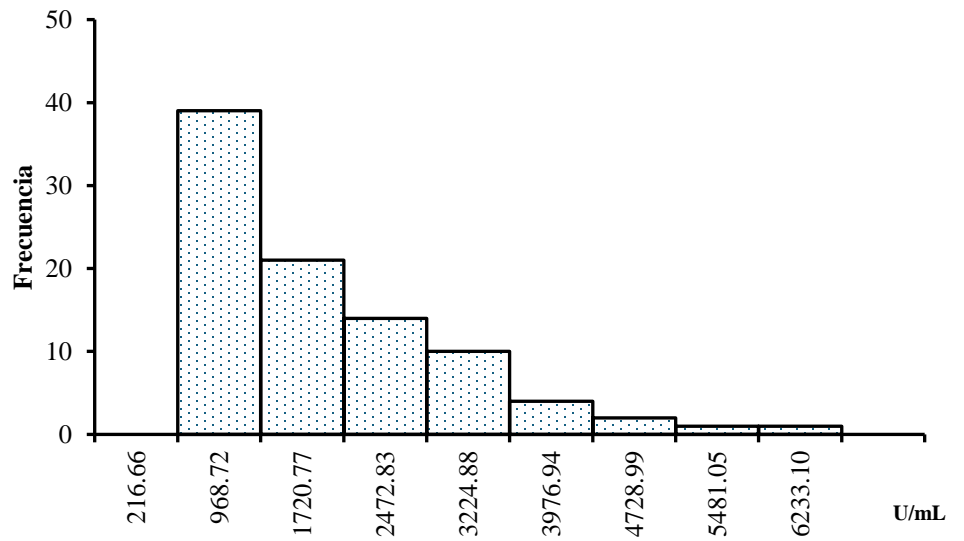


Gráfico 14. Histograma de actividad de GSTx

Tabla 9. Condensado de resultados de pruebas de bondad de ajuste KS y AD.

| <i>Analito</i> | <i>Kolmogórov-Smirnov</i> | <i>Anderson-Darling</i> |
|----------------------------|---------------------------|-------------------------|
| <i>cMDA (raíz)</i> | $p= 0.4468$ | $p= 0.0599$ |
| <i>c4-HNE (raíz)</i> | $p= 0.1149$ | $p=0.0005$ |
| <i>Nitritos (M) (raíz)</i> | $p= 0.4843$ | $p= 0.0792$ |
| <i>aCAT (raíz)</i> | $p= 0.0612$ | $p= 0.0010$ |
| <i>cGSSG (raíz)</i> | $p=0.3272$ | $p=0.0127$ |
| <i>aGPx (raíz)</i> | $p= 0.5561$ | $p=0.0135$ |
| <i>aSOD (inverso raíz)</i> | $p= 0.1769$ | $p=0.00029$ |
| <i>aGRx (raíz)</i> | $p= 0.3078$ | $p= 0.0093$ |
| <i>aGSTx (LN)</i> | $p= 0.647$ | $p= 0.0255$ |

Se resaltan los resultados donde se obtuvo un valor de $p \leq 0.05$.

A partir de los resultados obtenidos en el análisis de bondad de ajuste, se identificó la necesidad de realizar un proceso de transformación de los datos de su escala original para poder ajustar el comportamiento normal de los datos.

Para llevar a cabo la transformación de los datos, se emplearon como transformadores los operadores matemáticos de la familia Box-Cox, antes descrita, de igual forma para la jerarquización de estos operadores se consideraron los valores que puede tomar λ desde -2 a +2, de manera que para cada una de las transformaciones de los datos se realizaron las pruebas de bondad de ajuste hasta encontrar aquella transformación que satisficiera el comportamiento normal de la distribución. En la tabla 7 se puede observar cada uno de los

analitos junto con el operador matemático empleado para la transformación y el valor de p satisfactorio obtenido para la prueba de AD.

Tabla 10. Transformación para la corrección de la prueba AD.

| Analito | Transformador | Valor p |
|---------------|---|-------------|
| c4-HNE | Raíz * | $p= 0.1186$ |
| cGSSG | Logaritmo natural | $p=0.2639$ |
| aGPx | Logaritmo natural | $p= 0.1367$ |
| aGRx | $p <0.05$ en todas las transformaciones | |
| aGSTx | $p <0.05$ en todas las transformaciones | |
| aCAT | $p <0.05$ en todas las transformaciones | |
| aSOD | $p <0.05$ en todas las transformaciones | |

Una vez comprobada la normalidad de los datos por la prueba de AD, se dio paso a la estimación de los LBR para cada analito a partir de las muestras analizadas de los individuos seleccionados (Ver tabla 8).

Tabla 11. LBR para cada analito.

| Analito | Límites Biológicos de Referencia |
|----------------|---|
| cMDA | Menor a $0.734 \mu\text{M}$ |
| c4-HNE | Menor a $3.26 \mu\text{M}$ |
| cGSSG | Menor a $0.08 \mu\text{M}$ |
| aGPx | $5.55 - 27.64 \text{ U/mL}$ |

Para el caso de aGRx, aGSTx, aCAT y aSOD dado que no se logró obtener un resultado de $p > 0.05$ en la prueba de AD aun realizando todas las transformaciones matemáticas, se llevó a cabo la estimación de los LBR por el método no paramétrico.

Para la estimación de los LBR por el método no paramétrico los datos se ordenaron de manera ascendente, posteriormente se calculó el percentil 2.5 y 97.5 respectivamente, donde cada uno de estos percentiles representaría, respectivamente, tanto el límite superior como inferior

de los LBR. Los LBR para estos analitos en particular se muestran a continuación en la tabla 9.

Tabla 12. LBR por el método no paramétrico para los datos con valor de $p \leq 0.05$ para la prueba de AD.

| <i>Analito</i> | <i>Límites Biológicos de Referencia</i> |
|----------------|---|
| <i>aGRx</i> | 1.6 – 59.1 U/mL |
| <i>aGSTx</i> | 257.3 – 4059 U/mL |
| <i>aCAT</i> | 2.10 – 33.4 U/mL |
| <i>aSOD</i> | 3.93 - 18.21 U/mL |

8.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Como ya se mencionó anteriormente, el presente trabajo busca ir en comunión con la directriz más importante a nivel internacional por parte del CLSI y la IFCC hasta la fecha. No obstante, de acuerdo con Ichihara et al (2017) la directriz EP28-A23 como guía internacional presenta descripciones generalmente de naturaleza teórica, de tal forma que los fundamentos de las recomendaciones han presentado discrepancias al ser evaluados por diversos implementadores. En este sentido, los mismos autores reportan que estudios realizados en la realidad clínica han generado heterogeneidad de opiniones en aspectos como el fundamento de la exclusión, el uso de la estimación paramétrica versus la no paramétrica y sobre el criterio de como juzgar la necesidad de dividir los IR derivados de cada muestra. En la actualidad la tendencia más que la estimación de los IR de manera independiente va hacia la verificación a partir de datos internos obtenidos contra datos externos de IR previamente definidos, estandarizados y aceptados (Pavlov et al., 2012). No obstante, en situaciones donde no se dispone de datos fiables para la comparación de los IR como el caso de este proyecto, no hay forma de determinar qué método genera resultados más cercanos al IR “verdadero”, de manera que se deben de asegurar los mejores resultados posibles mediante diversas estrategias metodológicas que hayan demostrados su efectividad (Pavlov et al, 2012).

En consecuencia, para garantizar la calidad de los IR estimados a partir de este trabajo se buscó el refinamiento de puntos críticos como lo son: la selección de la muestra y la metodología estadística de inferencia. De esta forma, a pesar de que los resultados no se puedan contrastar de manera directa con IR ya establecidos, por su inexistencia, se puede asegurar la mayor exactitud de los resultados, al emplear estrategias estadísticas que hayan demostrado su alta calidad con diversos tamaños de muestra y analitos. En consecuencia, al aplicar estrategias matemáticas con un bajo porcentaje de variación, se evitan errores de estimación estadística, y se garantiza que los IR obtenidos están muy cercanos a los IR poblaciones “reales”. Para lograr esto, se realizó una revisión y análisis exhaustivo de las referencias disponibles, esto con la finalidad de adaptar y transferir las metodologías que han presentado los mejores resultados en situaciones con características particulares similares al

de la población de la comunidad de Ciencias Químicas de la BUAP que se aborda en este proyecto.

8.1 Estratificación de los grupos por sexo

En un primer momento, y de acuerdo con la guía EP28-A23 propuesta por el CLSI y la IFCC, los datos obtenidos de los individuos seleccionados se estratificaron por sexo. No obstante, estos datos se sometieron a un análisis estadístico para verificar si esta división por género presenta o no diferencias estadísticamente significativas. Para lograr esto, los datos obtenidos por género en cada uno de los analitos se sometieron a un análisis estadístico por docimasia de hipótesis para diferencias de medias de muestras grandes ($n \geq 30$), para comprobarse de forma estadística si existían diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de división a priori de este proyecto.

Para la prueba de hipótesis de acuerdo con lo descrito por Llinás Solano, H. (2017) parte de que, para esta prueba, la distribución muestral de la diferencia de dos medias muestrales es la distribución normal. Se fundamenta en el teorema: Sean \bar{x}_1 y \bar{x}_2 las medias de muestras aleatorias independientes de tamaños n_1 y n_2 referidas a poblaciones con medias μ_1 , μ_2 y varianzas σ_1^2 , σ_2^2 , respectivamente. Y cumpliendo alguna de las siguientes consideraciones:

- a) Ambas poblaciones son normales y ambas varianzas poblacionales σ_1^2 y σ_2^2 son conocidas.
- b) Ambas poblaciones son desconocidas o no normales, ambas varianzas poblacionales σ_1^2 y σ_2^2 son conocidas o desconocidas y $n_1 \geq 30$, $n_2 \geq 30$

Entonces una prueba de hipótesis bilateral con nivel de significancia α para la diferencia de $\mu_1 - \mu_2$ se presenta como: $H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$ y $H_1: \mu_1 - \mu_2 \neq 0$

Siendo que si $Z \leq -Z_\alpha$ o $Z \geq Z_\alpha$ entonces se rechaza H_0 ; de lo contrario, se acepta H_0 .

El estadístico para esta prueba sería entonces
$$Z = \frac{(\mu_1 - \mu_2) - 0}{\sqrt{\frac{\sigma_1^2}{n_1} + \frac{\sigma_2^2}{n_2}}}$$

Para el caso donde las varianzas poblacionales son desconocidas se utilizan las desviaciones muestrales respectivas como estimación de las correspondientes desviaciones poblacionales.

Una vez que se analizaron las diferencias estadísticas atribuibles al sexo, se condensaron en un solo grupo, aquellos resultados no se presentaba evidencia estadística para rechazar H_0 , de modo que el grupo masculino y femenino se conjuntaron para ampliar la n del analito en particular. Los analitos que no mostraron evidencia estadística para rechazar H_0 fueron: cLT, cMDA, cERO's, aCAT, aSOD, CRFP y cGT. Por su parte los analitos que mostraron evidencia estadística para rechazar H_0 fueron cNitritos, cGSH, cGSSG, cGSTx.

No obstante, de acuerdo con Manterola et al (2008), el encontrar una significancia estadística no es sinónimo de una significancia clínica de forma que debe de analizarse puntualmente si la separación por sexo potenciaría o disminuiría el poder inferencial de la prueba, en este caso en particular, los valores de referencia. Puntualmente para los LBR se prioriza el poder estadístico aumentando o manteniendo la n lo más grande posible. De acuerdo con los autores antes mencionados, no debe de perderse la idea de interpretación de la evidencia estadística encontrada puesto que esta evidencia busca tener una aplicación de manera directa hacia el área clínica. Analizando la $\bar{x} \pm s$ de hombres y mujeres en los analitos donde se encontraron diferencias estadísticamente significativas atribuibles a el género se tiene que para cGSH es de 6.860 ± 2.240 y 6.510 ± 1.540 , respectivamente, por su parte para cGSSG es de 0.024 ± 0.018 y 0.025 ± 0.020 , para el caso de aGSTx 1804.73 ± 1226.26 y 1236.06 ± 1073 , y finalmente para la cNitritos 0.896 ± 0.661 y 0.646 ± 0.505 . Como puede observarse en estos datos, las diferencias encontradas en los parámetros de ambos grupos, a pesar de ser estadísticamente significativas difícilmente tendrían una significancia clínica importante, por el contrario, si se separan los grupos disminuyendo la n para la obtención de los LBR el impacto podría ser clínicamente importante en la inferencia a realizar, es por eso por lo que se decidió unificar ambos sexos para los analitos antes mencionados.

Es así como una vez que se tenían los datos condensados se dio paso a la identificación y eliminación de valores atípicos bajo el método de Dixon. El método de Dixon compara D (definida como la diferencia absoluta entre las dos observaciones extremas y la siguiente observación más grande o pequeña, según corresponda) y R (el rango de todas las observaciones), para determinar si existen valores atípicos en el conjunto de datos se aplicó el criterio de Reed, que sugiere el punto de corte en $\geq 1/3$ para D/R (CLSI, 2008 citado en Arseneau et al, 2016).

Una vez con los datos depurados de valores atípicos, así como comprobada la agrupación o división de acuerdo con el género por la prueba de hipótesis. Se realizaron las pruebas de bondad de ajuste para cada uno de los conjuntos de datos obtenidos. Las pruebas de bondad de ajuste aplicadas fueron: χ^2 , SW, KS y AD.

8.2 Análisis estadístico de las distribuciones

Respecto al análisis de los datos; libros de texto como los de Hazelton (2003) y Schucany y Ng. (2006), citados en (Hoekstra et al, 2012), recomiendan que los supuestos de normalidad se verifiquen gráficamente, por ejemplo, haciendo gráficos de cuantiles normales para verificar la normalidad de la distribución obtenida. Siguiendo estas recomendaciones, los métodos gráficos que se emplearon en el presente proyecto fue el gráfico de cuartil-cuartil (Q-Q) (ver anexo IV), así como el histograma (ver apartado de resultados). Estos dos métodos gráficos permiten una evaluación inicial del comportamiento de la distribución de los datos con respecto de la normalidad. Un método alternativo es el utilizar una prueba preliminar, y con base en esta determinar si se debe continuar con la técnica prevista o utilizar alguna técnica alternativa, específicamente en este proyecto podría ser una herramienta que ayude a discernir si se empleará una técnica paramétrica o no paramétrica, no obstante, de acuerdo con Hoekstra et al (2003), las técnicas preliminares no deberían de usarse, esto dado que, podrían aumentar la probabilidad de cometer un error de tipo I.

Las técnicas gráficas para el análisis estadístico presentan grandes limitantes en comparación con las técnicas estadísticas inferenciales en cuanto a potencia y exactitud (Mishra P. et al, 2019), de forma que para poder inferir de manera segura y certera los datos obtenidos de la muestra hacia nuestra población de interés se debe de realizar un análisis estadístico riguroso a través de métodos estadísticos precisos.

En este sentido encontramos a las revisiones de Pavlov et al (2012) y Le Boedec (2019). En su revisión Pavlov et al (2012) calcularon los intervalos de referencia para 1000 muestras con $n = 60$ y $n=120$ extraídas aleatoriamente de un conjunto de datos clínicos obtenidos de 34,000 sujetos por el National Health and Nutrition Examination Survey y el Centers of Disease Control and Prevention de 33 marcadores clínicos, en esta revisión se evalúa el rendimiento de los métodos de cálculo de los IR comparándolos contra los resultados con el

valor “verdadero” del IR (obtenido de la población completa). Con esta comparación se deduce que si se pueden evaluar los aspectos estadísticos para un número considerable de marcadores clínicos; se pueden evaluar los riesgos de aplicar uno u otro método de cálculo de IR para algún marcador desconocido. Al comparar tres métodos: el no paramétrico, el paramétrico y el paramétrico apoyado con la transformación de Box-Cox los autores observaron que el método paramétrico con la transformación de Box-Cox supera al no paramétrico en cuanto a precisión y exactitud. De acuerdo con sus resultados los autores recomiendan el método paramétrico con apoyo de las transformaciones Box-Cox como la forma preferible de cálculo del IR, siempre que este satisfaga la prueba de normalidad. En caso contrario el método no paramétrico siempre es una opción y genera una muy buena aproximación con respecto del método paramétrico transformado (Pavlov et al., 2012).

Por su parte, Le Boedec en su revisión de 2019 evalúa 7 metodologías estadísticas distintas en 11 análisis clínicos mediante el software R. Las metodologías analizadas son el método paramétrico en combinación con el método robusto; el método paramétrico en combinación con él no paramétrico a diferentes valores de p ; el método paramétrico apoyado de las transformaciones Box-Cox; el método no paramétrico; el método no paramétrico Bootstrap y el método paramétrico Bootstrap. En esta revisión se reporta que una de las estrategias estadísticas más precisas fue el método paramétrico con $p > 0.05$ para la prueba de Shapiro Wilk y en caso contrario, la aplicación del método no paramétrico con una muestra igual o mayor a 120. Sin embargo, en comparación con esta metodología la estrategia paramétrica con la transformación de Box-Cox y el método no paramétrico presentaron una mayor exactitud a medida que la n de la muestra iba disminuyendo, acercándose a 20 muestras. Particularmente la metodología estadística que combina el método paramétrico (cuando la distribución de los datos obtiene un valor de $p > 0.05$ para la prueba de Shapiro Wilk) y la no paramétrica cuando esta condición no se cumple, muestra una disminución de la variación del 8.4% al 1.8% para el límite inferior y del 8.7% al 3.6 % cuando la muestra aumenta de 20 a 120 muestras. De manera similar la metodología paramétrica complementada con las transformaciones Box-Cox muestran un decremento en el porcentaje de variación del 6.0% al 3.6 % y del 9.3 % al 5.2% para el límite inferior y superior respectivamente cuando se aumenta la n de 20 a 120 muestras, al mismo tiempo, se reporta un comportamiento similar en la metodología no paramétrica mostrando una disminución de la variación del 4.9 % al

2.2 % y 8.5 % al 4.4 % para el límite inferior y superior respectivamente si se aumenta la n en las magnitudes antes descritas. De acuerdo con los resultados de Le Boedec, el mejor desempeño junto con la mejor exactitud en el mayor número de situaciones con una n de muestra entre 20-120 se obtuvo con la metodología que combina la estimación paramétrica para las distribuciones con $p > 0.05$ en la prueba de bondad de ajuste y la no paramétrica en caso contrario. Complementario a estos resultados la estimación paramétrica con la transformación Box-Cox mostró un gran poder predictivo cuando la muestra tiende a disminuir por debajo de las 100 muestras. De esta manera el autor de esta revisión de acuerdo con sus resultados propone una regla para seleccionar la mejor estrategia estadística de estimación de IR donde para muestras entre 100 y 120 individuos o más, la mejor estrategia dada su alta precisión es el emplear el método paramétrico cuando la prueba de Shapiro-Wilk tiene una $p > 0.05$ y el método no paramétrico para todas las otras circunstancias (Le Boedec, 2019).

Es importante destacar que la elección de la prueba de bondad de ajuste más adecuada debe de adaptarse según la naturaleza de la muestra, así como de factores que puedan influir en la potencia estadística particular de la misma como lo podría ser la n de la muestra. En este sentido no es extraño observar que se apliquen diversas pruebas estadísticas de bondad de ajuste como χ^2 , SW, KS y AD de acuerdo con las condiciones particulares de la muestra. Tal es el caso de la revisión de Ichihara et al (2017) donde se aplican las pruebas estadísticas de χ^2 y KS.

Retomando los resultados y las conclusiones de las revisiones ya detalladas, podemos confirmar la solides y calidad de los IR obtenidos en el presente trabajo, ya que como se puede observar en los resultados mostrados en las tablas 7-16 los IR calculados siguen las metodologías que mejores resultados han mostrado en poblaciones con características similares. En este proyecto las distribuciones de los datos obtenidos se sometieron a tres pruebas de bondad de ajuste, χ^2 , KS y AD. Estas pruebas, tal como se observa en las tablas 7, 8 y 9 se complementaron con las transformaciones de Box-Cox para permitir aplicar la metodología paramétrica o paramétrica con transformación de Box-Cox en el mayor número de situaciones posibles. No obstante, para el caso de CAT, SOD, GRx y GSTx al no poderse normalizar a través de la transformación, se optó por la estimación de manera no paramétrica. Ambas metodologías estadísticas han mostraron resultados de variación sumamente bajos

cuando las muestras cuentan con una $n \geq 100$ que son las condiciones donde se encuentran todos los analitos analizados en este proyecto tal como se muestra en la tabla 6.

A pesar de que la metodología no paramétrica mostró resultados considerablemente buenos en las revisiones de Pavlov y Le Boedec, en el presente trabajo se limitó su uso a cuestiones excepcionales donde las transformaciones Box-Cox no permitían el ajuste de la distribución de los datos a una distribución normal, como los casos antes ya mencionados, esto como consecuencia a que de acuerdo con el National Institute of Standards and Technology [NIST/SEMATECH] (2012a), el recurrir a una técnica que no se basa en un supuesto distributivo específico como lo es la metodología no paramétrica o la metodología robusta no siempre se ve como la mejor opción en comparación con las técnicas paramétricas que son más poderosas y mucho más eficaces en cuanto a su poder inferencial (NIST/SEMATECH, 2012a). Es por estas discrepancias en la potencia inferencial entre las dos metodologías estadísticas que se procura emplear, siempre que sea posible, una técnica que parte de un supuesto de normalidad (paramétrica), y para poder aplicar ello de manera adecuada, es importante confirmar que este supuesto está realmente satisfecho a través de pruebas de bondad de ajuste adecuadas, tal que estas garanticen el uso adecuado de técnicas paramétricas, que son las más potentes a nivel inferencial.

Como ya se ha mencionado, una prueba de bondad de ajuste permite docimar la hipótesis de que una variable aleatoria sigue cierta distribución de probabilidad (Quintero M. et al, 2004). Estas pruebas se basan en la función de distribución empírica y realizan la docimasia de la hipótesis nula midiendo la distancia entre la función de distribución estimada a partir de los datos observados y la función de distribución del modelo ajustado (Wang y Zhu, 2024).

La gran mayoría de las técnicas estadísticas parten de supuestos *a priori* que deben de cumplirse, y en dado caso donde no se cumplan estos supuestos, se debe de conocer la robustez o capacidad de estas mismas técnicas para soportar la violación de estos supuestos. El desconocer estos aspectos de una prueba estadística puede influir seriamente en los errores de tipo I y tipo II, lo que se traduce en deducciones inadecuadas ya sea por una sobreestimación o subestimación de las medidas inferenciales obtenidas a partir de la muestra. Se debe estar consciente que muchas veces los supuestos suelen referirse a la población y en una muestra, la población, por definición, no se conoce (Hoekstra et al., 2012). Sin embargo, de acuerdo con Díaz Rodríguez (2022), “La información muestral se

puede utilizar para probar la validez de una afirmación, conjetura o hipótesis acerca del valor del parámetro de la población”.

Quintero M. et al (2004) propone que una de las pruebas de bondad de ajuste más empleadas es la de χ^2 . La prueba de χ^2 supone que los datos se obtuvieron mediante selección aleatoria, sin embargo, también es válido y bastante frecuente el encontrar estadísticas inferenciales utilizadas cuando los datos provienen de un muestreo por cuotas o de conveniencia, en lugar de muestras aleatorias. Cuando se viola el supuesto de muestreo aleatorio, se recomienda utilizar varios estudios de replicación obteniendo esencialmente el mismo resultado. Esta prueba parte también del supuesto que todas las observaciones son independientes y que están igualmente distribuidas, estos supuestos se satisfacen en un muestreo aleatorio simple con reposición, sin embargo, se cumplen también de manera satisfactoria en una muestra aleatoria simple sin reposición para una fracción de muestreo pequeña (Quintero M. et al, 2004). Según McHugh, (2013) la prueba de χ^2 parte de los supuestos de: 1) Los datos de las celdas deben de ser frecuencias o recuentos de casos en lugar de porcentajes o alguna otra transformación de los datos, 2) Las categorías de las variables son mutuamente excluyentes, de forma que un determinado valor encaja en un y sólo un nivel de cada una de las variables, 3) cada sujeto puede aportar datos a una y sólo una celda en el χ^2 , por ejemplo, si se evalúa a los mismos sujetos a lo largo del tiempo, no es posible emplear χ^2 , 4) Los grupos de estudio deben ser independientes. Es decir, no es posible emplear χ^2 en el caso de muestras pareadas, 5) El valor de las celdas de frecuencia teórica debe ser 5 o más en al menos 80% de estas, y ninguna celda debe tener una frecuencia esperada menor que 1. Es más probable que se cumpla este supuesto si el tamaño de la muestra es igual al menos al número de celdas multiplicado por 5, básicamente este supuesto ayudaría a especificar el tamaño mínimo de la muestra necesarios para utilizar la χ^2 para cualquier número de celdas o intervalos. Por su parte Lorenzo Landa G., (2011) menciona que “Se requiere la condición de que todas las frecuencias observadas sean mayores o iguales a cinco. Cuando no se dé esta condición hay que proceder a un reagrupamiento con otros intervalos hasta que se cumpla la condición. También es recomendable, para una mejor calidad de la aproximación a través de la distribución asintótica, que los intervalos se construyan de tal manera que sus probabilidades sean aproximadamente iguales”.

Todos estos supuestos se cumplen de manera satisfactoria en la aplicación de la prueba χ^2 de este proyecto. Las muestras recolectadas al ser datos de concentraciones o actividades enzimáticas expresadas en términos de concentración o unidades internacionales (UI) respectivamente, permiten su agrupación en clases para la construcción de un histograma de forma que se expresan en manera de frecuencia, de igual forma a través de la construcción del histograma se garantiza que las clases sean excluyentes mutuamente, de manera que cada uno de los datos solo puede pertenecer a una clase, esto al mismo tiempo garantiza que cada sujeto únicamente aporte datos a una y solo una de las celdas de la prueba χ^2 . Para el caso del supuesto número 5, las diversas muestras empleadas estaban en el intervalo de $90 < n < 300$ de forma que no se tenía a priori una limitante por la n de la muestra para la construcción del histograma y en consecuencia para la realización de la prueba, en este sentido se procuró conservar la mejor calidad de la aproximación al construir el histograma con intervalos que sus probabilidades sean prácticamente iguales. No obstante, una vez construido el histograma se realizó el proceso mencionado en Lorenzo Landa G., (2011) donde se reagrupan los intervalos hasta que el criterio de frecuencia teórica > 5 se haya cumplido, esto para garantizar la calidad y potencia de la prueba y evitar con ello errores de tipo II.

La prueba de bondad de χ^2 , como ya se ha detallado se aplica a datos agrupados (clasificados en clases). Esto genera que los datos no agrupados tengan que someterse a un proceso de agrupación a través de un histograma o una tabla de frecuencia para generar la prueba de χ^2 , tal como es el caso de este proyecto. Es aquí mismo donde se encuentra una de las limitantes de esta técnica estadística dado que el valor del estadístico de prueba depende de cómo se agrupan los datos, esto se pudo comprobar al realizar la corrección necesaria para cumplir el supuesto número 5 antes descrito en los casos de cLT y cERO's, donde al cambiar la amplitud de los intervalos para satisfacer el supuesto número 5 se impacta de manera directa tanto en el valor obtenido del estadístico como en el valor crítico del mismo. De igual manera, otra de sus limitantes es que se requiere un tamaño de muestra suficiente para que la aproximación de χ^2 sea válida, de manera que a medida que disminuye la n de la muestra, el estadístico tiende a la baja en cuanto a su potencia (NIST/SEMATECH, 2012a).

De manera paralela se empleó la técnica de KS, esta técnica a diferencia de la de χ^2 emplea la frecuencia acumulada de la distribución, evaluado de manera puntual el punto donde más se aleja la frecuencia obtenida de la frecuencia esperada. De esta manera la técnica de KS no

está limitada a la forma o agrupación por clases como lo era en el caso de la prueba de χ^2 lo cual brinda a la prueba de KS en comparación, de una mayor potencia estadística. De acuerdo con Llinás Solano, H. (2017), la prueba de KS en general es superior a la prueba de bondad de ajuste de χ^2 cuando los datos involucran una variable aleatoria continua.

Sin embargo, se ha reportado que por encima de la potencia estadística de la prueba de KS, se encuentra la prueba de AD. La prueba de AD es una modificación de la prueba de KS y se caracteriza por dar más peso a las colas que la prueba de KS (National Institute of Standards and Technology [NIST/SEMATECH], 2012c). En la prueba de KS los valores críticos no dependen de la distribución específica que se está probando, mientras que la prueba de AD utiliza la distribución específica para calcular valores críticos. Esta particularidad brinda la ventaja de permitir una prueba más sensible, sin embargo, se tiene la desventaja técnica que se deben calcular valores críticos para cada distribución particular (NIST/SEMATECH, 2012c; Lorenzo Landa G., 2011). No obstante, hoy en día, con el uso de distintos software automatizados o semiautomatizados esta limitante técnica es fácilmente superada.

La prueba de AD es una alternativa a las pruebas de bondad de ajuste de χ^2 y KS (NIST/SEMATECH, 2012c). Sin embargo, la prueba de AD tiene la ventaja de no ser exclusiva de una distribución normal, sino también tiene la ventaja de que puede aplicarse a amplia gama de distribuciones como distribuciones exponenciales, logísticas y gamma, entre otras (“Prueba de Anderson-Darling”, 2008).

En cuanto a la potencia estadística, la prueba de AD superó a la prueba de KS según las comparaciones de potencia descritas por Wang y Zhu (2024). La prueba de KS requiere un tamaño de muestra mucho mayor para lograr una potencia comparable a pruebas como AD, de forma que la prueba de AD supera a la prueba de KS en diferentes tamaños y distribuciones alternativas, aunque no hay que perder de vista que las potencias de ambas pruebas aumentan conforme aumente el tamaño de la muestra (Wang y Zhu, 2024).

De manera general se puede decir que, la prueba de AD permite la evaluación de distribuciones grandes, y, en segundo lugar, da más importancia a las colas de las distribuciones que es un factor importante que considerar para el caso del cálculo del IR (Pavlov et al., 2012).

En un sentido paralelo, respecto al desempeño de las pruebas de bondad de ajuste, pero aterrizado al área clínica, se puede encontrar la revisión de Le Boedec en 2016), donde a través de un sistema computacional evalúa 4 de las pruebas de bondad más comunes, entre ellas KS y AD. Las pruebas se evaluaron según su desempeño para identificar la normalidad de la distribución de 100 muestras de datos con diferentes n a partir de tres poblaciones, cada una de ellas delimitadas por 10,000 datos y perfectamente caracterizadas, siendo una de ellas una distribución normal, otra una distribución lognormal y finalmente una distribución asimétrica. De acuerdo con sus resultados para las 100 muestras con $n=60$, la prueba KS presenta un 99% de sensibilidad al identificar de manera correcta 99/100, 65/100 y 38/100 de las muestras de la distribución normal, lognormal y asimétrica respectivamente. Por su parte la prueba de AD también mostró un 99% de sensibilidad, pero su desempeño es mejor al identificar 99/100, 83/100 y 46/100 con respecto a las mismas poblaciones analizadas.

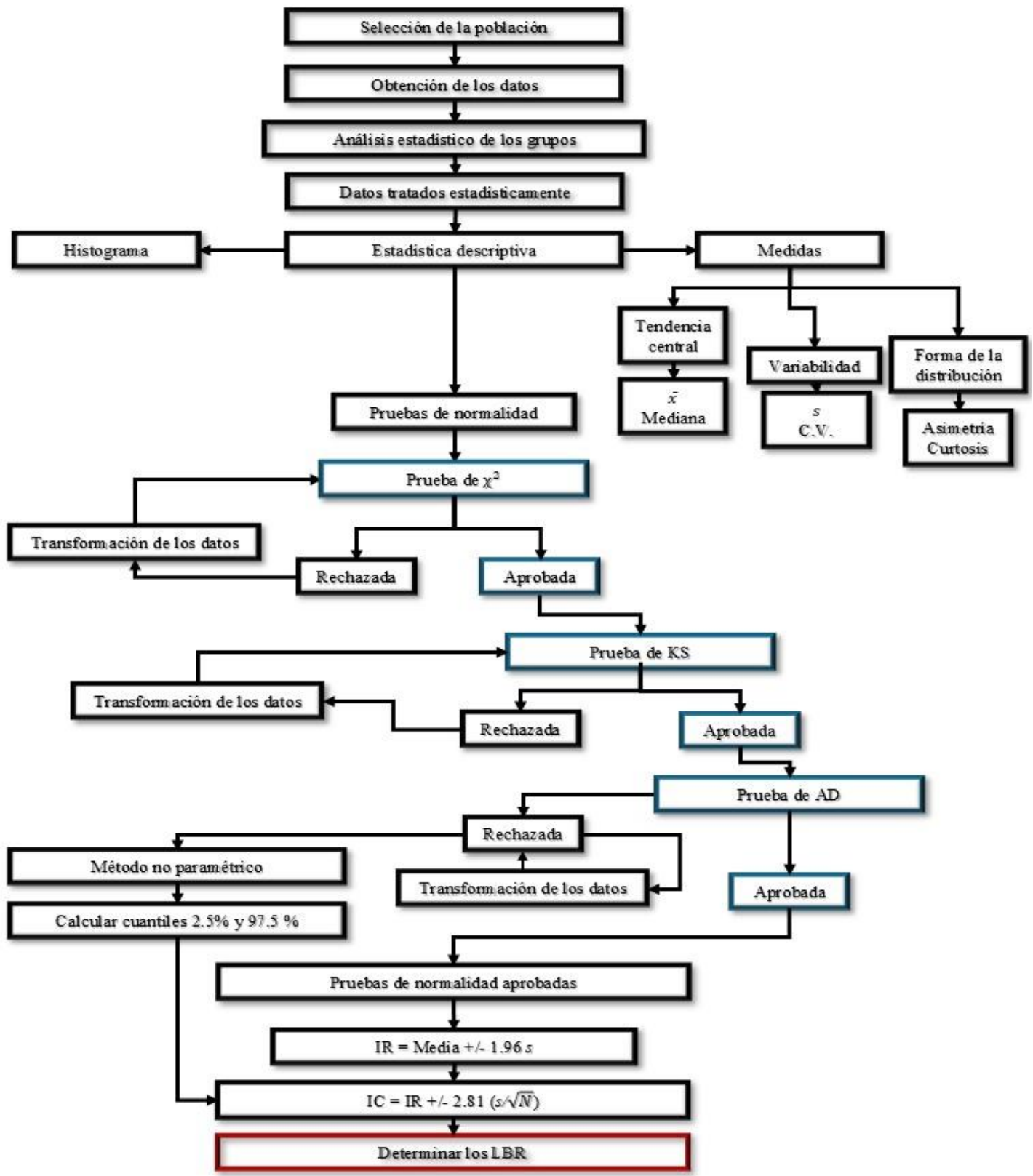
Es partir de las revisiones descritas, que el presente proyecto toma como estándar a la prueba de bondad de ajuste de AD, y es a partir de un resultado de $p > 0.05$ de esta prueba que se confirma la distribución normal de los datos y con ello se asegura la implementación adecuada de la estimación de los IR por el método paramétrico. Se selecciona esta prueba ya que como se ha revisado a nivel teórico es la que muestra una mayor cantidad de virtudes en comparación con sus pares de KS y χ^2 , esto al colocar más atención en las colas de la distribución, así como ser ampliamente recomendada en muestras con $n \geq 100$. De igual forma dentro de la práctica clínica ha mostrado resultados importantes para las distribuciones aproximadamente gaussianas o lognormal, en el presente proyecto al emplear las transformaciones Box-Cox y la evaluación de las distribuciones de los datos a través de parámetros como la asimetría y curtosis partiendo de que una distribución con una asimetría ≤ 0.3 no muestra diferencias importantes a una distribución normal y una asimetría ≤ 0.2 es prácticamente indistinguible de la misma, se garantiza que las poblaciones no difieran de manera importante de la distribución normal o una distribución lognormal de manera que se conserven las características donde la prueba de AD ha demostrado su eficacia.

Al aplicar técnicas de análisis estadístico como las pruebas de bondad de ajuste se debe de tomar en cuenta los diversos supuestos de cada una de las pruebas, tal como se realizó en el presente trabajo, ya que estos supuestos son puntos críticos para lograr una inferencia estadística adecuada. De acuerdo con Hoekstra et al, (2012) no es extraño que los

investigadores, desconozcan relativamente cuándo y cómo se deben verificar los datos para detectar violaciones de los supuestos de las pruebas estadísticas que emplean. Hoekstra et al, (2012) en su revisión dan como una posible explicación a esta situación que la comunidad científica en su conjunto no considera importante verificar que se cumplan los supuestos de las pruebas estadísticas, en muchos casos erróneamente, al no mencionar nada de los supuestos en una publicación o estudio, se podría suponer, se cumplen con los criterios cruciales. El exigir las comprobaciones a los diferentes supuestos o bien el fundamentar la solidez de las pruebas ante la violación de los supuestos ayudaría a darle una mayor conciencia a los investigadores sobre esta importante cuestión (Hoekstra et al., 2012).

A continuación, en el diagrama 1 se muestra un diagrama de flujo que ejemplifica de manera general los pasos a lo largo de este proyecto para la obtención de los LBR de cada analito. Nótese dentro de este diagrama que las pruebas de bondad de ajuste se emplearon de acuerdo con los aspectos teóricos comentados recientemente.

Diagrama 1. Diagrama de flujo para la obtención de los LBR en la comunidad estudiantil de la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP



8.3 Impacto clínico de los Límites biológicos de referencia del estado redox a nivel sérico

Los LBR deben de analizarse como la ventana que permite la transformación de un número obtenido a partir de la medición analítica precisa en información clínicamente relevante de un individuo respecto de una población específica; con ellos, los laboratorios permiten al médico tomar decisiones clínicas informadas, de manera que estos valores son pieza clave y fundamental para interpretar la situación clínica del paciente en función de un resultado medido a través de las diversas técnicas del laboratorio clínico (Timbrell N. et al 2024).

Los datos indican que la medicina del laboratorio clínico tiene un impacto en aproximadamente el 70% de las decisiones clínicas en el cuidado de la salud, aunque este porcentaje puede variar. Lo que está fuera de duda es que la medicina de laboratorio clínico es un elemento esencial del sistema de atención de la salud que proporciona a los usuarios información fundamental para la prevención, el diagnóstico, el tratamiento y la gestión de la salud y la enfermedad (Beastall G., 2013). De manera que los LBR no deben de abordarse simplemente como un número o un parámetro más de seguimiento al paciente dentro del ámbito clínico, si no muy por el contrario deben de abordarse como un reflejo del estado de homeostasis, de manera que el establecerlos de manera clara y precisa aporta información invaluable tanto para la evaluación como para la toma de decisiones dentro de la clínica para el paciente (Whyte M. et al, 2018).

El estado redox a nivel sistémico es considerado como un marcador de manejo, pronóstico o progresión de una enfermedad e incluso en la actualidad se trata de abordar como un potencial objetivo terapéutico, útil para una amplia variedad de padecimientos entre los que se puede destacar el síndrome metabólico y la obesidad. Se ha demostrado que el estrés oxidativo desempeña un papel fundamental en la patogénesis de enfermedades como la diabetes al alterar la captación de glucosa en los músculos y tejido adiposo, así como disminuir la secreción de insulina de las células β pancreáticas, de igual manera también subyace a la fisiopatología de enfermedades del tejido endotelial como la hipertensión y la aterosclerosis al tener un impacto de manera directa en las células de la pared vascular (Furukawa et al, 2004).

Reddy V. et al, (2009) señalan que el impacto del estado redox es omnipresente en enfermedades crónicas, ejemplo la diabetes, de manera que sirven como marcadores de la progresión de la enfermedad. El desbalance del estado redox contribuye también a la aparición y progresión de enfermedades como la nefropatía diabética, la neuropatía diabética y las enfermedades neurológicas, como en la EA, ELA y la EP. En la actualidad se ha identificado a el estrés oxidativo como uno de los primeros eventos en los cambios neurológicos y patológicos de la EA (Reddy V. et al, 2009). Incluso se ha establecido que el estrés oxidativo también está implicado en el cáncer y como ya se ha mencionado, tiene un impacto en la enfermedad cardiovascular (Reddy, 2023).

Autores como Furukawa et al (2004) han descrito que los niveles plasmáticos de adiponectina se correlacionaron inversamente con los marcadores de estrés oxidativo sistémico en sujetos humanos. Algunas otras condiciones como la hiperglucemia elevan los niveles de HNE en pacientes diabéticos (Reddy, 2023), e incluso en otras patologías a nivel pulmonar el nivel de estrés oxidativo se correlacionó inversamente con la función de los pacientes con enfermedad obstructiva crónica (Forman H. et al, 2021). De acuerdo Forman H. et al (2021) los resultados actuales sugieren que el estrés oxidativo ocurre tanto en el pulmón como sistémicamente en pacientes con EPOC y contribuye a la patogénesis de la enfermedad. También señalan que los marcadores oxidativos, dentro de los cuales destaca el H_2O_2 , la relación entre GSSG/GSH y el MDA aumentan significativamente en el plasma de pacientes con hipertensión (Forman H. et al, 2021).

De esta manera al contar con LBR establecidos y validados para una población en específico permite que todos estos hallazgos en la investigación se puedan transformar en oportunidades terapéuticas para los pacientes de la clínica de rutina (Furukawa et al., 2004). Al mismo tiempo permite considerar a los antioxidantes como una alternativa terapéutica que puede contrarrestar los efectos nocivos del desbalance redox y, por lo tanto, en paradigmas de prevención o tratamiento, atenuar o retrasar sustancialmente los efectos de la cronicidad de las diversas patologías ya mencionadas (Reddy V. et al, 2009).

A pesar de que en la actualidad el campo del estado redox tiene limitantes, y estas son aún mayores cuando se habla de este a nivel sérico, el determinar los LBR aporta información valiosa en la parte clínica ya que permite contextualizar y abordar la cuestión acerca de

dónde, cuándo y en qué medida el estrés oxidativo es parte de una enfermedad (Forman H. et al, 2021).

Existe un renovado interés en el desarrollo de terapias dirigidas al secuestro de productos de peroxidación lipídica y antioxidantes que buscan atenuar la peroxidación lipídica esto a consecuencia que moléculas como como el MDA y el HNE, se han señalado como los principales responsables de las modificaciones del ADN (Reddy, 2023). Mientras que ROS y RNS son una parte integral de la función celular normal y el sistema de defensa del huésped contra las bacterias invasoras, sus cantidades excesivas también contribuyen a la aparición y exacerbación de varias patologías. Tal como ya se ha establecido son las concentraciones no reguladas son las que desempeñan un papel importante en la modificación estructural de proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, de manera que esta pérdida de equilibrio se ha denotado como una de las fuerzas impulsoras en la aparición y progresión de múltiples enfermedades, entre ellas las antes mencionadas como serían diabetes, obesidad y EA (Reddy, 2023).

Todo el sistema redox ya sea a nivel celular o a nivel sérico no es un sistema perfecto, como lo demuestra una baja tasa de productos de oxidación que se acumulan y son los que permiten el establecer los LBR (Forman H. et al, 2021). Sin embargo, cada resultado en particular debe interpretarse a la luz de la historia clínica considerando que la variación en la concentración de un analito, si está significativamente fuera de los valores habituales de un paciente (pero aún dentro del intervalo de referencia), podría ser un signo de enfermedad temprana o latente (Whyte M. et al, 2018). Se debe contemplar también que un informe de laboratorio rara vez presenta un gran impacto en la evaluación clínica del paciente si se aborda desde un valor aislado. Por el contrario, cuando se solicita, analiza y reporta un conjunto completo de pruebas, es su interpretación en conjunto, la que permite realizar una aproximación adecuada al estado clínico de cada paciente (Whyte M. et al, 2018). Es en esta directriz que el presente trabajo no solo se determina el valor aislado de un biomarcador si no por el contrario propone los LBR de todo un panel completo del estado redox a nivel sistémico de forma que se permita una contextualización e integración de las determinaciones para una aproximación adecuada de cada paciente.

El intervalo de referencia es un medio extremadamente útil para contextualizar el resultado de un paciente. Si se comprende la naturaleza del intervalo de referencia, se pueden tomar decisiones lógicas que mejorarán la eficacia de la consulta clínica (Whyte M. et al, 2018).

9. CONCLUSIONES

Se estimó los LBR para cada mesurando pro y antioxidante de acuerdo con las directrices actuales para garantizar la normalidad de los datos al disminuir al mínimo la probabilidad que los resultados se vean alterados por errores aleatorios y diversas circunstancias como un error de muestreo.

Los LBR obtenidos a partir del presente trabajo son representativos para la comunidad de la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP y cada laboratorio debería establecer dichos parámetros de acuerdo con la población que atiende.

10.- PERSPECTIVAS

En este capítulo se abordan las oportunidades y las áreas clave para futuras investigaciones derivadas de los hallazgos del presente trabajo. Considerando que el presente trabajo contribuye al entendimiento del sistema redox a nivel sérico, algunas de las perspectivas serían:

- Integrar los resultados obtenidos en el presente en protocolos de monitoreo, diagnóstico e incluso estrategias terapéuticas en diversas condiciones como enfermedades crónicas, ejemplo, afecciones cardiovasculares, diabetes, trastornos neurodegenerativos, entre otras.
- Emplear los LBR establecidos en esta investigación como punto de partida en estudios epidemiológicos donde se contemplen variaciones a consecuencia de factores demográficos, como diferentes intervalos de edad, factores ambientales y genéticos.
- Ampliar el análisis a diferentes matrices biológicas, como orina, saliva o semen, de manera que se pueda evaluar si los límites establecidos en el suero son consistentes en otros fluidos corporales en la clínica de los pacientes.
- Evaluar mediante ensayos controlados con intervenciones específicas, como cambios en la dieta, suplementos antioxidantes o ejercicio físico, impactan en los valores de referencia del estado redox ya sea en condiciones fisiológicas o como potencial acción terapéutica.
- Implementar el uso de inteligencia artificial (IA) para el establecimiento de los LBR, la IA puede optimizar el establecimiento de límites biológicos de referencia del estado redox sérico al analizar grandes volúmenes de datos y detectar relaciones complejas entre biomarcadores y factores como edad, sexo y estilo de vida, esto puede permitir ajustar dinámicamente los valores de referencia. Así, la IA podría superar las limitaciones de los enfoques tradicionales, generando valores representativos y clínicamente útiles.

11. REFERENCIAS

- Adams, L., Franco, M. C., y Estevez, A. G. (2015). Reactive nitrogen species in cellular signaling. *Experimental Biology and Medicine*, 240(6), 711–717. <https://doi.org/10.1177/1535370215581314>
- Aebi Hugo. (1984). *Catalase in vitro*. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0076687984050163>
- Ahmed, S. A., Alahmadi, Y. M., y Abdou, Y. A. (2023). The Impact of Serum Levels of Reactive Oxygen and Nitrogen Species on the Disease Severity of COVID-19. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(10). <https://doi.org/10.3390/ijms24108973>
- Andersson, A., Isaksson, A., Brattstrom, L., y Hultberg', B. (1993). Homocysteine and Other Thiols Determined in Plasma by HPLC and Thiol-Specific Postcolumn Derivatization. In *CLIN. CHEM* (Vol. 39, Issue 8). <https://academic.oup.com/clinchem/article-abstract/39/8/1590/5646926>
- Arseneau, E., y Balion, C. M. (2016). Statistical methods used in the calculation of geriatric reference intervals: A systematic review. In *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* (Vol. 54, Issue 3, pp. 377–388). Walter de Gruyter GmbH. <https://doi.org/10.1515/cclm-2015-0420>
- Beastall, G. H. (2013). Adding value to laboratory medicine: A professional responsibility. In *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* (Vol. 51, Issue 1, pp. 221–227). <https://doi.org/10.1515/cclm-2012-0630>
- Beers, R. F., y Sizer, I. W. (1952). A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *The Journal of Biological Chemistry*, 195(1), 133–140. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)50881-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)50881-x)
- Begenik, H., Soyoral, Y. U., Erkoç, R., Emre, H., Taskin, A., Tasdemir, M., y Aslan, M. (2013). Serum malondialdehyde levels, myeloperoxidase, and catalase activities in patients with nephrotic syndrome. *Redox Report*, 18(3), 107–112. <https://doi.org/10.1179/1351000213Y.0000000048>
- Benzie, I. F. F., y Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. In *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY* (Vol. 239).

- Bhutia, Y., Ghosh, A., Sherpa, M. L., Pal, R., y Mohanta, P. K. (2011). Serum malondialdehyde level: Surrogate stress marker in the Sikkimese diabetics. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine*, 2(1), 107–112. <https://doi.org/10.4103/0976-9668.82309>
- Bland, M. J., y Douglas, G. A. (1996a). Transformations, means, and confidence intervals. *BMJ*, 1079.
- Bland, M. J., y Douglas, G. A. (1996b). *Transforming data*.
- Bondonno, C. P., Liu, A. H., Croft, K. D., Ward, N. C., Puddey, I. B., Woodman, R. J., y Hodgson, J. M. (2015). Short-term effects of a high nitrate diet on nitrate metabolism in healthy individuals. *Nutrients*, 7(3), 1906–1915. <https://doi.org/10.3390/nu7031906>
- Carrasco-Carballo, A., Luna-Centeno, L. D., Rojas-Morales, A., Alariste, V., Martínez, I., Martínez, L., Limón, D., y Luna, F. (2021). Anxiety and Depression among Exact and Natural Science College Students of BUAP-México under COVID-19 Lockdown. *Open Journal of Depression*, 10(03), 103–120. <https://doi.org/10.4236/ojd.2021.103007>
- Cerda L., Jaime y Villarroel del P., Luis. (2007). Interpretación del test de Chi-cuadrado (X^2) en investigación pediátrica. *Revista chilena de pediatría*, 78(4), 414-417. <https://dx.doi.org/10.4067/S0370-41062007000400010>
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., y Milzani, A. (2006). Biomarkers of oxidative damage in human disease. In *Clinical Chemistry* (Vol. 52, Issue 4, pp. 601–623). <https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.061408>
- Day, R. M., y Suzuki, Y. J. (2005). Cell Proliferation, Reactive Oxygen and Cellular Glutathione. *Dose-Response*, 3(3), dose-response.0. <https://doi.org/10.2203/dose-response.003.03.010>
- De la Guía González, Ana V. (s.f.). *La transformación Box-Cox*. Trabajo de fin de grado en administración y dirección de empresas, Universidad Complutense Madrid. <https://docta.ucm.es/rest/api/core/bitstreams/9314608a-fab0-49f8-9c3a-b172de3a21cd/content>
- Díaz Rodríguez, M. (2019). *Estadística inferencial aplicada* (1ed.). Universidad del Norte. <https://elibro.bibliotecabuap.elogim.com/es/lc/bibliotecasbuap/titulos/122378>
- D'souza, D., Babu, G., Shetty, S., y Balan, P. (2012). Estimation of serum malondialdehyde in potentially malignant disorders and post-antioxidant treated patients: A biochemical

- study. *Contemporary Clinical Dentistry*, 3(4), 448–451. <https://doi.org/10.4103/0976-237X.107438>
- Esterbauer, H., Schaur, R. J., y Zollner, H. (1991). •" Review Article CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY OF 4-HYDROXYNONENAL, MALONALDEHYDE AND RELATED ALDEHYDES. In *Free Radical Biology & Medicine* (Vol. 11).
- Forman, H. J., y Zhang, H. (2021). Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 20, Issue 9, pp. 689–709). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00233-1>
- Flores Tapia C. E. y Flores Cevallos K.L., (2021). *Pruebas para comprobar la normalidad de datos en procesos productivos: Anderson-Darling, Ryan-Joiner, Shapiro-Wilk y Kolmogórov Smirnov*. Societas, vol. 23 (2). http://portal.amelica.org/ameli/jatsRepo/341/3412237018/html/index.html#redalyc_3412237018_ref21
- Franco, R., & Cidlowski, J. A. (2009). Apoptosis and glutathione: Beyond an antioxidant. In *Cell Death and Differentiation* (Vol. 16, Issue 10, pp. 1303–1314). <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.107>
- Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y., Nakayama, O., Makishima, M., Matsuda, M., y Shimomura, I. (2004). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *Journal of Clinical Investigation*, 114(12), 1752–1761. <https://doi.org/10.1172/jci200421625>
- Galleguillos, M., Plaza De Los Reyes, R., Kessi, E., González, E., Valdivia, G., y Adarmes, H. (2012). Actividad glutatión S-transferasa en la membrana sinovial de la articulación metacarpofalángica equina normal y alterada. In *Arch Med Vet* (Vol. 44).
- Gebicka, L., y Krych-Madej, J. (2019). The role of catalases in the prevention/promotion of oxidative stress. In *Journal of Inorganic Biochemistry* (Vol. 197). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.110699>
- Geffré, A., Friedrichs, K., Harr, K., Concordet, D., Trumel, C., y Braun, J. P. (2009). Reference values: a review. *Veterinary clinical pathology*, 38(3), 288–298. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2009.00179.x>

- Ghasemi, A., y Zahediasl, S. (2012). Normality tests for statistical analysis: A guide for non-statisticians. *International Journal of Endocrinology and Metabolism*, 10(2), 486–489. <https://doi.org/10.5812/ijem.3505>
- Guo, L., Zhang, X. M., Zhang, Y. B., Huang, X., y Chi, M. H. (2017). Asociación del hydroxynonenal 4 con las adipoquinas clásicas y la resistencia a la insulina en una población China obesa no diabética. *Nutricion Hospitalaria*, 34(2), 363–368. <https://doi.org/10.20960/nh.212>
- Hadwan, M. H. (2018). Simple spectrophotometric assay for measuring catalase activity in biological tissues. *BMC Biochemistry*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12858-018-0097-5>
- Hoekstra, R., Kiers, H. A. L., y Johnson, A. (2012). Are assumptions of well-known statistical techniques checked, and why (not)? *Frontiers in Psychology*, 3(MAY). <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2012.00137>
- Ichihara, K., Ozarda, Y., Barth, J. H., Klee, G., Qiu, L., Erasmus, R., Borai, A., Evgina, S., Ashavaid, T., Khan, D., Schreier, L., Rolle, R., Shimizu, Y., Kimura, S., Kawano, R., Armbruster, D., Mori, K., y Yadav, B. K. (2017). A global multicenter study on reference values: 1. Assessment of methods for derivation and comparison of reference intervals. *Clinica Chimica Acta*, 467, 70–82. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2016.09.016>
- Indo, H. P., Hawkins, C. L., Nakanishi, I., Matsumoto, K. I., Matsui, H., Suenaga, S., Davies, M. J., St Clair, D. K., Ozawa, T., y Majima, H. J. (2017). Role of mitochondrial reactive oxygen species in the activation of cellular signals, molecules, and function. In *Handbook of Experimental Pharmacology* (Vol. 240). Springer New York LLC. https://doi.org/10.1007/164_2016_117
- Jialal, I., Norkus, E. P., Cristol, L., y Grundy, S. M. (1991). *Beta-Carotene inhibits the oxidative modification of low-density lipoprotein* (Issue}).
- Kamiński, M. M., Röth, D., Krammer, P. H., y Gülow, K. (2013). Mitochondria as oxidative signaling organelles in T-cell activation: Physiological role and pathological implications. In *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* (Vol. 61, Issue 5, pp. 367–384). <https://doi.org/10.1007/s00005-013-0235-0>

- Karten, B., Beisiegel, U., Nther Gercken, G., y Kontush, A. (1997). Mechanisms of lipid peroxidation in human blood plasma: a kinetic approach. In *Chemistry and Physics of Lipids* (Vol. 88).
- Katerji, M., Filippova, M., y Duerksen-Hughes, P. (2019). Approaches and methods to measure oxidative stress in clinical samples: Research applications in the cancer field. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Vol. 2019). <https://doi.org/10.1155/2019/1279250>
- Keskin Guler, S., Aytac, B., Durak, Z. E., Gokce Cokal, B., Gunes, N., Durak, I., y Yoldas, T. (2016). Antioxidative–oxidative balance in epilepsy patients on antiepileptic therapy: a prospective case–control study. *Neurological Sciences*, 37(5), 763–767. <https://doi.org/10.1007/s10072-016-2494-0>
- Koliakos, G. G., Befani, C. D., Mikropoulos, D., Ziakas, N. G., y Konstas, A. G. P. (2008). Prooxidant-antioxidant balance, peroxide and catalase activity in the aqueous humour and serum of patients with exfoliation syndrome or exfoliative glaucoma. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 246(10), 1477–1483. <https://doi.org/10.1007/s00417-008-0871-y>
- Le Boedec, K. (2016). Sensitivity and specificity of normality tests and consequences on reference interval accuracy at small sample size: a computer-simulation study. *Veterinary Clinical Pathology*, 45(4), 648–656. <https://doi.org/10.1111/vcp.12390>
- Le Boedec, K. (2019). Reference interval estimation of small sample sizes: A methodologic comparison using a computer-simulation study. *Veterinary Clinical Pathology*, 48(2), 335–346. <https://doi.org/10.1111/vcp.12725>
- Lee, D. K. (2020). Data transformation: A focus on the interpretation. *Korean Journal of Anesthesiology*, 73(6), 503–508. <https://doi.org/10.4097/kja.20137>
- Llinás Solano, H. (2017). *Estadística Inferencial*: (1ed.). Universidad del Norte. <https://elibro.bibliotecabuap.elogim.com/es/lc/bibliotecasbuap/titulos/70060>
- Lorenzo Landa, Genoveva. (2011). Modelación de los Retornos del Índice de Precios y Cotizaciones de México con la Distribución Pareto y Censura de tipo II. [Tesis de Licenciatura, Universidad Veracruzana]. Archivo digital. <https://www.uv.mx/personal/gelorenzo/files/2016/08/licenciatura-gelorenzo.pdf>

- Mansoor, M. A., Svardal, A. M., y Ueland, P. M. (1992). Determination of the in l&o Redox Status of Cysteine, Cysteinylglycine, Homocysteine, and Glutathione in Human Plasma. In *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY* (Vol. 200).
- Manterola, C. D., Pineda, V. N., y Mincir, G. (2008). El valor de “p” y la “significación estadística”. Aspectos generales y su valor en la práctica clínica* Interpretation of medical statistics DOCUMENTOS. In *Rev. Chilena de Cirugía* (Vol. 60, Issue 1).
- Marklund, S., y Marklund, G. (1974). Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. *European Journal of Biochemistry*, 47(3). <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x>
- Martínez E. (2020). *Estadística*. Ediciones UAPA. Disponible en: https://elibro.bibliotecabuap.elogim.com/es/ereader/bibliotecasbuap/175596?as_all=estad%C3%ADstica&as_all_op=unaccent_icontains&prev=as
- Mas-Bargues, C., Escrivá, C., Dromant, M., Borrás, C., y Viña, J. (2021). Lipid peroxidation as measured by chromatographic determination of malondialdehyde. Human plasma reference values in health and disease. In *Archives of Biochemistry and Biophysics* (Vol. 709). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2021.108941>
- McHugh, M. L. (2013). The Chi-square test of independence. *Biochemia Medica*, 23(2), 143–149. <https://doi.org/10.11613/BM.2013.018>
- Mishra, P., Pandey, C. M., Singh, U., Gupta, A., Sahu, C., y Keshri, A. (2019). Descriptive statistics and normality tests for statistical data. *Annals of Cardiac Anaesthesia*, 22(1), 67–72. https://doi.org/10.4103/aca.ACA_157_18
- Moisés, E., y Flores, R. (n.d.). *ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO, IMPORTAN-CIA E IMPLICACIÓN PATOLÓGICA*. <https://doi.org/10.51581/rccm.v24i2.401>
- Moraes, L., Dries, S. S., Seibert, B. S., Linden, R., y Perassolo, M. S. (2023). Evaluation of oxidative stress markers in ethanol users. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 56. <https://doi.org/10.1590/1414-431X2023e12465>
- Nandi, A., Yan, L.-J., Kumar Jana, C., y Das, N. (2019). *Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases*.

- National Institute of Standards and Technology [NIST/SEMATECH] (2012a). *Anderson-Darling Test*. e-Handbook of Statistical Methods, <https://www.itl.nist.gov/div898/handbook/eda/section3/eda35e.htm>
- National Institute of Standards and Technology [NIST/SEMATECH] (2012b). *Chi-Square Goodness-of-Fit Test*. e-Handbook of Statistical Methods, <https://www.itl.nist.gov/div898/handbook/eda/section3/eda35f.htm>
- National Institute of Standards and Technology [NIST/SEMATECH] (2012c). *Kolmogorov-Smirnov Goodness-of-Fit Test*. e-Handbook of Statistical Methods, <https://www.itl.nist.gov/div898/handbook/eda/section3/eda35g.htm>
- Nelson, S. K., Bose, S. K., y McCord, J. M. (1994). The toxicity of high-dose superoxide dismutase suggests that superoxide can both initiate and terminate lipid peroxidation in the reperfused heart. *Free radical biology & medicine*, 16(2), 195–200. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)90143-0](https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)90143-0)
- Neužil, J., y Stocker, R. (1994). Free and albumin-bound bilirubin are efficient co-antioxidants for α -tocopherol, inhibiting plasma and low-density lipoprotein lipid peroxidation. *Journal of Biological Chemistry*, 269(24), 16712–16719. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)89449-8](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)89449-8)
- Nielsen, F., Mikkelsen, B. B., Nielsen, B., Andersen, R., y Grandjean, P. (n.d.). *Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors*. <https://academic.oup.com/clinchem/article/43/7/1209/5640944>
- Nuhu, F., Gordon, A., Sturmey, R., Seymour, A. M., y Bhandari, S. (2020). Measurement of Glutathione as a Tool for Oxidative Stress Studies by High Performance Liquid Chromatography. *Molecules*, 25(18). <https://doi.org/10.3390/molecules25184196>
- Oakley, A. (2011). Glutathione transferases: A structural perspective. In *Drug Metabolism Reviews* (Vol. 43, Issue 2, pp. 138–151). <https://doi.org/10.3109/03602532.2011.558093>
- Öngöz Dede, F., Bozkurt Doğan, Ballı, U., Avcı, B., Durmuşlar, M. C., y Baratzade, T. (2016). Glutathione levels in plasma, saliva and gingival crevicular fluid after periodontal therapy in obese and normal weight individuals. *Journal of Periodontal Research*, 51(6), 726–734. <https://doi.org/10.1111/jre.12349>

- Organización Mundial de la Salud [OMS] (s.f.) *Cuestionario de Identificación de los Transtornos debidos al Consumo de Alcohol: Pautas para su utilización en Atención Primaria*. https://www3.paho.org/hq/dmdocuments/2009/AUDIT_spa.pdf
- Ozarda, Y., Ichihara, K., Barth, J. H., y Klee, G. (2013). Protocol and standard operating procedures for common use in a worldwide multicenter study on reference values. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 51(5), 1027–1040. <https://doi.org/10.1515/cclm-2013-0249>
- Ozbay, I., Topuz, M. F., Oghan, F., Kocak, H., y Kucur, C. (2021). Serum prolidase, malondialdehyde and catalase levels for the evaluation of oxidative stress in patients with peripheral vertigo. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 278(10), 3773–3776. <https://doi.org/10.1007/s00405-020-06466-x>
- Pacher, P., Beckman, J. S., y Liaudet, L. (n.d.). *Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease*.
- Pannala, V. R., Bazil, J. N., Camara, A. K. S., y Dash, R. K. (2013). A biophysically based mathematical model for the catalytic mechanism of glutathione reductase. *Free Radical Biology and Medicine*, 65, 1385–1397. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.10.001>
- Pavlov, I. Y., Wilson, A. R., y Delgado, J. C. (2012). Reference interval computation: Which method (not) to choose? *Clinica Chimica Acta*, 413(13–14), 1107–1114. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2012.03.005>
- Peng, F. C., Tang, S. H., Huang, M. C., Chen, C. C., Kuo, T. L., y Yin, S. J. (2005). Oxidative status in patients with alcohol dependence: A clinical study in Taiwan. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A*, 68(17–18), 1497–1509. <https://doi.org/10.1080/15287390590967432>
- Pérez, L. M., Hooshmand, B., Mangialasche, F., Mecocci, P., Smith, A. D., Refsum, H., Inzitari, M., Fratiglioni, L., Rizzuto, D., y Calderón-Larrañaga, A. (2020). Glutathione serum levels and rate of multimorbidity development in older adults. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 75(6), 1089–1094. <https://doi.org/10.1093/GERONA/GLZ101>
- Pita S, Pértega S: Asociación de variables cualitativas: test de chi-cuadrado. Disponible en www.fisterra.Com

- Piątek-Guziewicz, A., Zagrodzki, P., Paśko, P., Krośniak, M., Mach, T., y Zwolińska-Wcisło, M. (2017). Ferric reducing ability of plasma and assessment of selected plasma antioxidants in adults with celiac disease. *FOLIA MEDICA CRACOVIENSIA*, 4, 13–26.
- Płonka-Półtorak, E., Zagrodzki, P., Chłopicka, J., Bartoń, H., Westermarck, T., Kaipainen, P., Kaski, M., y Atroshi, F. (2011). Valproic acid modulates superoxide dismutase, uric acid-independent FRAP and zinc in blood of adult epileptic patients. *Biological Trace Element Research*, 143(3), 1424–1434. <https://doi.org/10.1007/s12011-011-9003-3>
- Płonka-Półtorak, E., Zagrodzki, P., Nicol, F., Kryczyk, J., Bartoń, H., Westermarck, T., Kaipainen, P., Ounjaijean, S., Kaski, M., y Atroshi, F. (2013). Antioxidant agents and physiological responses in adult epileptic patients treated with lamotrigine. *Pharmacological Reports*, 65(1), 99–106. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(13\)70968-X](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(13)70968-X)
- Quintero M., M. A., y Duran, M. (2004). Análisis del error tipo I en las pruebas de bondad de ajuste. *BOSQUE*, 45–55.
- Quintero M., M. A., y Duran, M. (2004). Análisis del error tipo I en las pruebas de bondad de ajuste e independencia utilizando el muestreo con parcelas de tamaño variable (Bitterlich). *BOSQUE*, 45–55.
- Reddy, V. P. (2023). Oxidative Stress in Health and Disease. In *Biomedicines* (Vol. 11, Issue 11). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/biomedicines11112925>
- Reddy, V. P., Zhu, X., Perry, G., y Smith, M. A. (2009). Oxidative stress in diabetes and Alzheimer's disease. In *Journal of Alzheimer's Disease* (Vol. 16, Issue 4, pp. 763–774). IOS Press. <https://doi.org/10.3233/JAD-2009-1013>
- Schieber, M., y Chandel, N. S. (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. In *Current Biology* (Vol. 24, Issue 10). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>
- Sies, H., y Jones, D. P. (2020). Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 21, Issue 7, pp. 363–383). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3>
- Sikaris, K. A., y Sikaris, K. (2014). Physiology and its Importance for Reference Intervals. In *Clin Biochem Rev* (Vol. 35, Issue 1).

- Thannickal, V. J., y Fanburg, B. L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. In *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* (Vol. 279). <http://www.ajplung.orgL1005>
- Timbrell, N. E. (2024a). The Role and Limitations of the Reference Interval Within Clinical Chemistry and Its Reliability for Disease Detection. In *British Journal of Biomedical Science* (Vol. 81). Institute of Biomedical Science (IBMS). <https://doi.org/10.3389/bjbs.2024.12339>
- Timbrell, N. E. (2024b). The Role and Limitations of the Reference Interval Within Clinical Chemistry and Its Reliability for Disease Detection. In *British Journal of Biomedical Science* (Vol. 81). Institute of Biomedical Science (IBMS). <https://doi.org/10.3389/bjbs.2024.12339>
- Tenny S, Abdelgawad I. Statistical Significance. [Updated 2023 Nov 23]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459346/>
- Torun, E., Kahraman, F. U., Goksu, A. Z., Vahapoglu, A., y Cakin, Z. E. (2019). Serum catalase, thiol and myeloperoxidase levels in children passively exposed to cigarette smoke. *Italian Journal of Pediatrics*, 45(1). <https://doi.org/10.1186/s13052-019-0652-8>
- Tsikas, D. (2005). Methods of quantitative analysis of the nitric oxide metabolites nitrite and nitrate in human biological fluids. In *Free Radical Research* (Vol. 39, Issue 8, pp. 797–815). <https://doi.org/10.1080/10715760500053651>
- Turell, L., Carballal, S., Botti, H., Radi, R., y Alvarez, B. (2009). Oxidation of the albumin thiol to sulfenic acid and its implications in the intravascular compartment. In *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* (Vol. 42, Issue 4). www.bjournal.com.br
- Vassalle, C., Masini, S., Carpeggiani, C., L'abbate, A., Boni, C., Zucchelli, G. C., y Cristina Vassalle, D. (2004). In vivo total antioxidant capacity: comparison of two different analytical methods. In *Clin Chem Lab Med* (Vol. 42, Issue 1).
- Vázquez-Meza, H., Vilchis-Landeros, M. M., Vázquez-Carrada, M., Uribe-Ramírez, D., y Matuz-Mares, D. (2023). Cellular Compartmentalization, Glutathione Transport and Its Relevance in Some Pathologies. In *Antioxidants* (Vol. 12, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/antiox12040834>

- Veselinovic, M., Barudzic, N., Vuletic, M., Zivkovic, V., Tomic-Lucic, A., Djuric, D., y Jakovljevic, V. (2014). Oxidative stress in rheumatoid arthritis patients: Relationship to diseases activity. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 391(1–2), 225–232. <https://doi.org/10.1007/s11010-014-2006-6>
- Wang, C., y Zhu, H. (2024). Tests of fit for the power function lognormal distribution. *PLoS ONE*, 19(2 February). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0298309>
- Wang, J., Mei, F., Bai, L., Zhou, S., Liu, D., Yao, L., Ahluwalia, A., Ghiladi, R. A., Su, L., Shu, T., Gong, M., Wang, X., Zhu, L., Cai, K., y Zhang, X. (2021). Serum nitrite and nitrate: A potential biomarker for post-covid-19 complications? *Free Radical Biology and Medicine*, 175, 216–225. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.08.237>
- Whyte, M. B., y Kelly, P. (2018). The normal range: It is not normal and it is not a range. *Postgraduate Medical Journal*, 94(1117), 613–616. <https://doi.org/10.1136/postgradmedj-2018-135983>
- Zhang, Z., Zhang, Q., Xue, Y., Fang, H., y Wu, Z. (2023). Serum levels of reduced glutathione, oxidized glutathione, and glutathione reductase activity in minor recurrent aphthous stomatitis patients. *Journal of Dental Sciences*, 18(3), 1103–1108. <https://doi.org/10.1016/j.jds.2022.11.016>
- (2008). Prueba de Anderson-Darling. En: La enciclopedia concisa de estadística. Springer, Nueva York, Nueva York. https://doi.org/10.1007/978-0-387-32833-1_11

12. ANEXOS

I. Consentimiento informado

Carta de consentimiento informado

A través de este consentimiento:

Se le invita a participar en el proyecto de investigación titulado "Establecimiento de límites biológicos de referencia para marcadores séricos de estrés oxidativo en la Comunidad Universitaria de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla". El objetivo de este estudio es obtener los intervalos biológicos de referencia que se podrán aplicar en laboratorios de análisis clínicos, así como establecer el comportamiento de diferentes marcadores enzimáticos y no enzimáticos en pacientes de la población universitaria.

Su participación consistirá en presentarse con un ayuno de ocho horas y permitir la extracción de 5 mL de sangre mediante venopunción utilizando un sistema cerrado. La muestra de sangre se recolectará en un tubo con aceleradores de la coagulación y posteriormente se centrifugará para obtener el suero, mismo que será utilizado para cuantificar diferentes componentes relacionados con el estado redox, cumpliendo así el objetivo del proyecto de investigación.

Los riesgos asociados a los procedimientos incluyen sangrado leve, que cesará por sí solo; la aparición de un hematoma o pequeño moretón en la zona punzada, que no causará daños significativos en su salud y se resolverá sin necesidad de tratamiento específico; y un leve malestar durante y después de la toma de muestra. En caso de no poder extraer una muestra de sangre de manera exitosa, se realizará una punción adicional para obtener la muestra necesaria. Sin embargo, el personal de flebotomía capacitado trabajará para minimizar cualquier evento adverso mencionado anteriormente.

El estudio ofrece los siguientes beneficios: a) estandarización de técnicas para evaluar el estado redox en pacientes; b) establecimiento de intervalos de referencia biológica en la población de Puebla; c) evidencia del comportamiento del estado redox en pacientes fisiológicamente sanos. La información generada se aplicará en laboratorios clínicos y en el campo de la medicina, contribuyendo en el diagnóstico, seguimiento y tratamiento de los pacientes.

Los investigadores se comprometen a tratar todos los datos y resultados obtenidos de los pacientes en el laboratorio clínico de manera confidencial en todo momento. Solo el personal científico involucrado en el estudio tendrá acceso a estos datos, con el objetivo exclusivo de llevar a cabo la investigación y garantizar la calidad de la atención médica. Se utilizarán códigos o números de identificación en lugar de nombres para preservar su privacidad. No obstante, los resultados del estudio podrían ser publicados en informes científicos o presentados en conferencias, manteniendo su identidad en el anonimato.

La participación en este estudio es completamente voluntaria. Puede decidir no participar o retirarse en cualquier momento sin sufrir consecuencias negativas para su atención médica o tratamiento. En caso de optar por retirarse, le pedimos que nos informe para realizar un seguimiento adecuado.

Si tiene alguna pregunta o inquietud sobre el estudio o sus derechos como participante, puede comunicarse con el M.C. Hugo Hernández Fragoso al número 2211876770 o por correo electrónico a Hugo.hernandezf@correo.buap.mx.

Declaro que todo lo mencionado en este documento me fue explicado verbalmente.

Con fecha ___ de febrero del 2024, y habiendo comprendido lo anterior, así como una vez que se me aclararon todas las dudas que surgieron con respecto a mi participación, acepto participar en el estudio antes mencionado.

Nombre y firma del participante.

II. Encuesta para la evaluación de la población

FORMATO DE ENCUESTA PARA MARCADORES SÉRICOS DE ESTRÉS OXIDANTE

¡Bienvenidos a nuestra encuesta! Estamos muy emocionados y agradecidos de contar con tu participación en este estudio, el cual tiene como objetivo: Establecer los límites biológicos de referencia de los marcadores séricos de estrés oxidante en la población universitaria de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Tú participación nos ayuda a poder establecer de forma más eficaz las condiciones en la cual se encuentra nuestra población. La encuesta es completamente confidencial, los datos que aquí nos proporcionas serán empleados únicamente con fines de análisis estadísticos, por lo que te animamos a responder con honestidad y sinceridad. Agradecemos tu tiempo y colaboración.

Por favor, rellena los siguientes campos:

1.- Nombre:

2.-Edad:

3.-Género:

4.- Coloca tu IMC (si lo desconoces, omite esta respuesta).

4.-Coloca tu talla en metros:

5.-Por favor, coloca tu peso (esto para poder calcular tu IMC):

6.-Como catalogarías tu dieta:

a) Mayoritariamente carbohidratos

b) Mayoritariamente grasas

c) Mayoritariamente proteínas

d) Otra:

7.- ¿Consumes tabaco? Por favor indica la frecuencia con la que lo haces

a) Nunca b) 1 vez cada quince días c)1-2 veces por semana d) Más de 3 veces por semana

8.- ¿Consumes alcohol? Por favor indica la frecuencia con la que lo haces

a) Nunca b) 1 vez cada quince días c)1-2 veces por semana d) Más de 3 veces por semana

9.- ¿En los últimos 14 días has sufrido de algún tipo de infección o enfermedad como tos, gripa, fiebre, infección estomacal, COVID-19, dengue o similares? Otra:

10.- ¿En los últimos 14 días has sufrido alguna clase de traumatismo, contusión, accidente cardiovascular o isquémico, accidente de auto o algún siniestro por el cual hayas sido hospitalizado o sufrido alguna revisión médica?

En caso de que tu respuesta anterior haya sido Sí, por favor indicar cual:

11.- ¿Has tenido un cambio de actividad física o realizado alguna actividad física demandante fuera de lo cotidiano en los últimos 14 días?

En caso de que tu respuesta anterior haya sido Sí, por favor especifica como fue tu cambio de actividad física:

12.- ¿Padeces o sufres de alguna enfermedad crónica? Ej. Diabetes, hipertensión, insuficiencia renal crónica, asma, afecciones pulmonares, daño y/o alteraciones hepáticas (ej. Hígado graso) o alguna otra enfermedad crónica similar.

En caso de que tu respuesta anterior haya sido Sí, por favor especifica:

13.- ¿Has sido diagnosticado o sufres de síntomas de enfermedades autoinmunes (ej. Artritis)?

En caso de que tu respuesta anterior haya sido Sí, por favor especifica:

14.- ¿Consumes alguna clase de medicamento?

En caso de que tu respuesta anterior haya sido Sí, por favor especifica:

15.- ¿Te suplementas o consumes de manera frecuente antioxidantes en cualquier presentación?

16.- En caso de que tu respuesta anterior haya sido **SÍ**, por favor especifica:

17.- ¿Consumes de manera frecuente medicamentos sin prescripción médica? Por ejemplo, Ibuprofeno, paracetamol y/o aspirina.

a) Si b) No

18.- En caso de que tu respuesta haya sido **SI** en la pregunta anterior, por favor especifica:

19.- En caso de que tu respuesta haya sido **SI** en las preguntas anteriores, ¿Con que frecuencia consumes ese medicamento?

a) 1 vez al mes b) 1 vez cada 15 días c) 1 vez a la semana d) 2 o más veces por semana

20.- En promedio dentro de tu día de manera cotidiana, ¿Cuántos litros de agua consumes?

a) Menos de 1 L b) Entre 1 y 2 L de agua c) Entre 2 y 4 L de agua d) Más de 4 L de agua

- 21.- En promedio dentro de tu día de manera cotidiana, ¿Cuántas veces orinas?
a) 1 vez al día b) Entre 2 y 4 veces c) Entre 4 y 6 veces d) Más de 6 veces al día
- 22.- ¿ Se ha sentido muy nervioso, en tensión o excitado?
a) Sí b) No
- 23.- ¿Ha estado muy preocupado por algo?
a) Sí b) No
- 24.- ¿ Se ha sentido muy irritable?
a) Sí b) No
- 25.- ¿Ha tenido dificultad para relajarse?
a) Sí b) No
- 26.- ¿Ha dormido mal, ha tenido dificultades para dormir?
a) Sí b) No
- 27.- ¿Ha tenido dolores de cabeza o nuca?
a) Sí b) No
- 28.- ¿Ha tenido algunos de los siguientes síntomas: temblores, hormigueos, mareos, sudores o diarrea sin motivo aparente?
a) Sí b) No
- 29.- ¿Ha estado preocupado por su salud?
a) Sí b) No
- 30.- ¿ Ha tenido alguna dificultad para conciliar el sueño, para quedarse dormido?
a) Sí b) No
- 31.- ¿ Se ha sentido con poca energía?
a) Sí b) No
- 32.- ¿Ha perdido usted su interés por las cosas?
a) Sí b) No
- 33.- ¿ Ha perdido usted la confianza en sí mismo?
a) Sí b) No
- 34.- ¿ Se ha sentido usted desesperanzado, sin esperanzas?
a) Sí b) No
- 35.- ¿Ha tenido dificultades para concentrarse?
a) Sí b) No

36.- ¿ Ha perdido peso a causa de una falta de apetito sin motivo aparente?

a) Sí b) No

37.- ¿ Se ha estado despertando demasiado temprano sin motivo aparente?

a) Sí b) No

38.- ¿ Se ha sentido usted enlentecido (lento o aletargado)?

a) Sí b) No

39.- ¿ Cree usted que ha tenido tendencia a encontrarse peor por las mañanas?

a) Sí b) No

40.- ¿ Qué tan frecuente ingiere bebidas alcohólicas?

a) Nunca b) Una vez al mes o menos c) De 2 a 4 veces por mes d) 2 o 3 veces por semana

41.- ¿ Cuántas copas se toma en un día típico o común de los que bebe?

a) Una o dos b) Tres o cuatro c) Cinco o seis d) Siete a nueve e) Diez o más

42.- ¿ Qué tan frecuentemente toma seis o más copas en la misma ocasión?

a) Nunca b) Menos de una vez al mes c) Mensualmente d) Semanalmente e) Diario o casi diario

43.- ¿ Durante el último año, ¿Le ocurrió que no pudo parar de beber una vez que habría empezado?

a) Nunca b) Menos de una vez al mes c) Mensualmente d) Semanalmente e) Diario o casi diario

44.- Durante el último año, ¿Qué tan frecuentemente dejó de hacer algo que debería haber hecho por beber?

a) Nunca b) Menos de una vez al mes c) Mensualmente d) Semanalmente e) Diario o casi diario

45.- Durante el último año, ¿Qué tan frecuentemente bebió a la mañana siguiente después de haber bebido en exceso el día anterior?

a) Nunca b) Menos de una vez al mes c) Mensualmente d) Semanalmente e) Diario o casi diario

46.- Durante el último año, ¿Qué tan frecuentemente se sintió culpable o tuvo remordimiento por haber bebido?

a) Nunca b) Menos de una vez al mes c) Mensualmente d) Semanalmente e) Diario o casi diario

47.- Durante el último año, ¿Qué tan frecuentemente olvidó algo de lo que había pasado cuando estaba bebiendo?

a) Nunca b) Menos de una vez al mes c) Mensualmente d) Semanalmente e) Diario o casi diario

48.- ¿ Se ha lastimado o alguien ha resultado lastimado como consecuencia de su ingestión de alcohol?

a) No b) Sí, pero no en el último año c) Sí en el último año

49.-¿Algún amigo, familiar o doctor se ha preocupado por la forma en que bebe o ha sugerido que le baje?

a) No b) Sí, pero no en el último año c) Sí en el último año

Muchas gracias por contestar la encuesta, tu respuesta nos ayuda mucho a generar un análisis de calidad. Te recordamos que los datos recopilados en esta encuesta serán utilizados únicamente con fines de investigación y análisis. La información aquí proporcionada será tratada de manera confidencial. Los resultados generales podrán ser utilizados de manera agregada para informes o presentaciones, pero en ningún caso se revelarán datos específicos que permitan identificar a los participantes individuales. Al completar esta encuesta, estás dando tu consentimiento para el uso de tus respuestas con estos fines.

III. Resultados de la encuesta para la evaluación de la población

A continuación, se presentan los resultados de acuerdo con la encuesta realizada a la población.

Tabla 13. Promedio de edad, talla, peso e índice de masa corporal de la población encuestada

| | |
|--------------------------------------|-------------------|
| Edad | 22.22 años |
| Talla (m) | 1.63 m |
| Peso (Kg) | 62.72 Kg |
| Índice de masa corporal (IMC) | 23.75 |

Se muestra el promedio de los resultados en sus respectivas unidades obtenidos a partir de las personas encuestadas de la comunidad estudiantil de la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP.

Gráfico 12. Clasificación de la dieta de la comunidad estudiantil de la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP

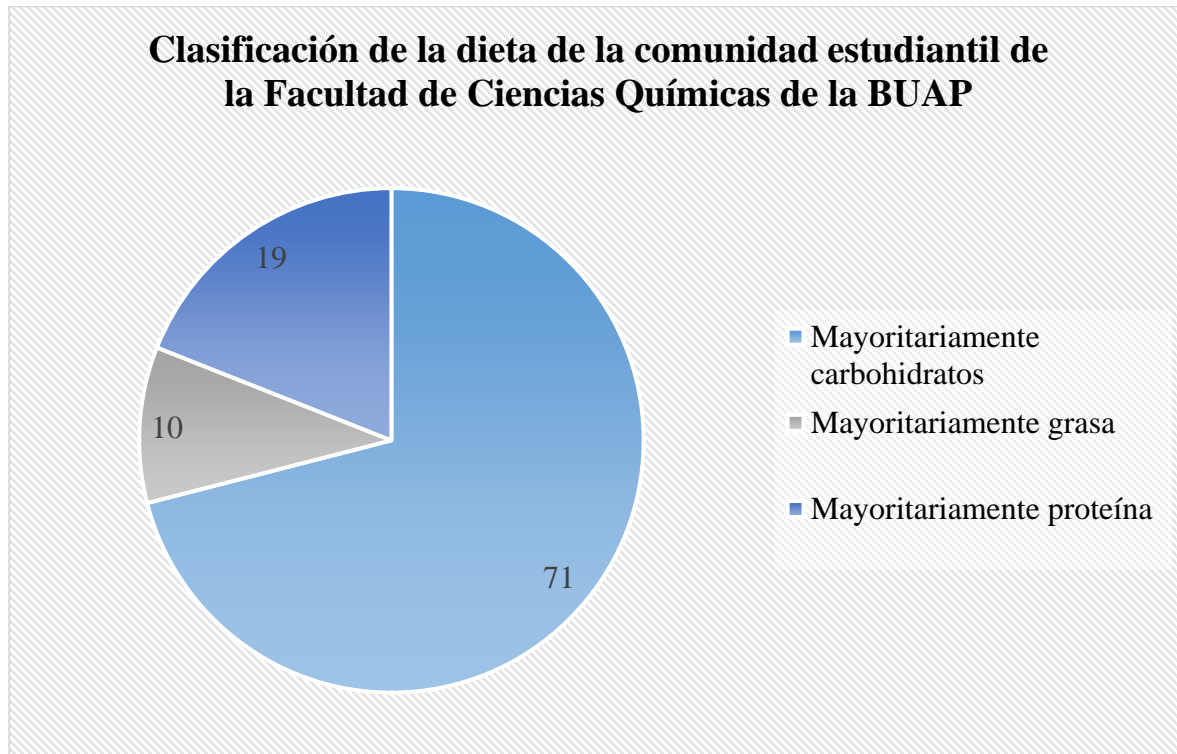


Gráfico 13. Frecuencia en el consumo de alcohol y tabaco en la comunidad estudiantil de la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP

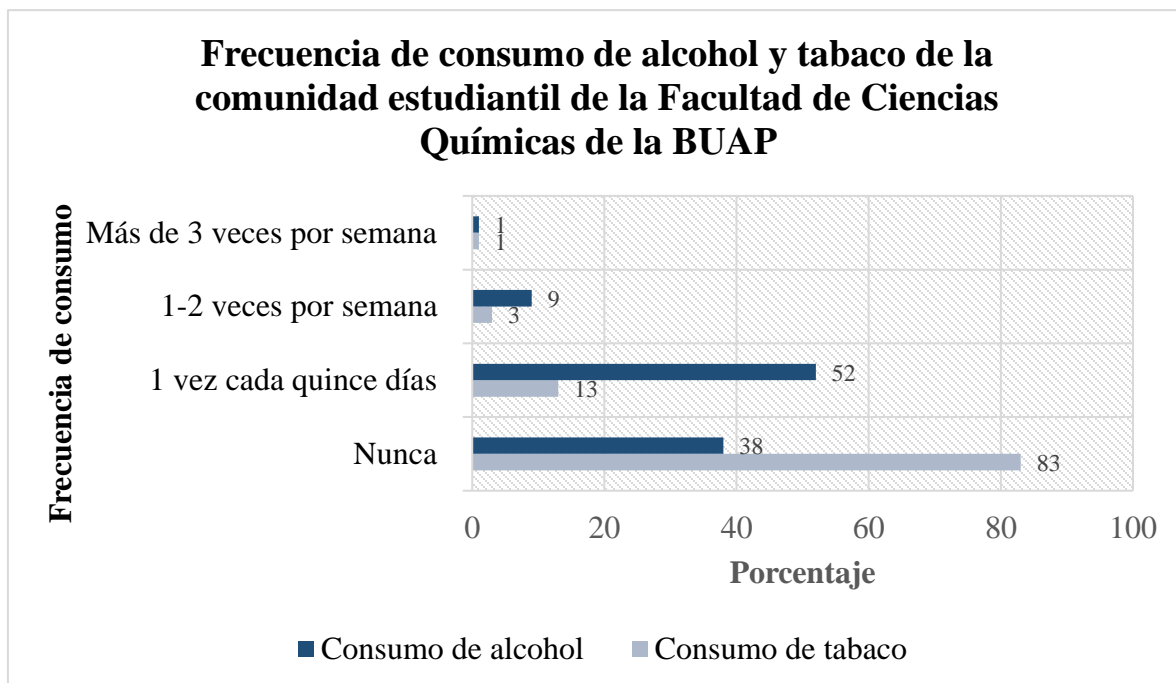


Gráfico 14. Consumo de agua diario de la comunidad estudiantil de la Facultad de Ciencias Químicas

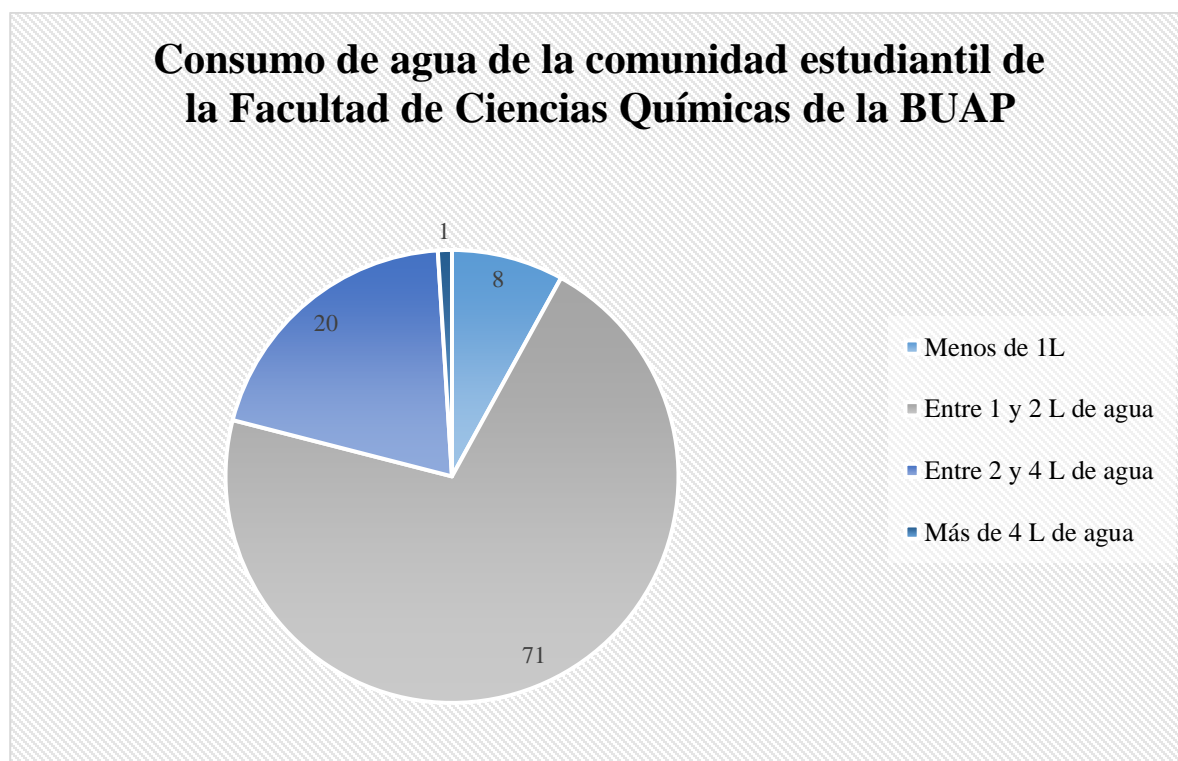


Gráfico 15. Frecuencia urinaria de la comunidad estudiantil de la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP

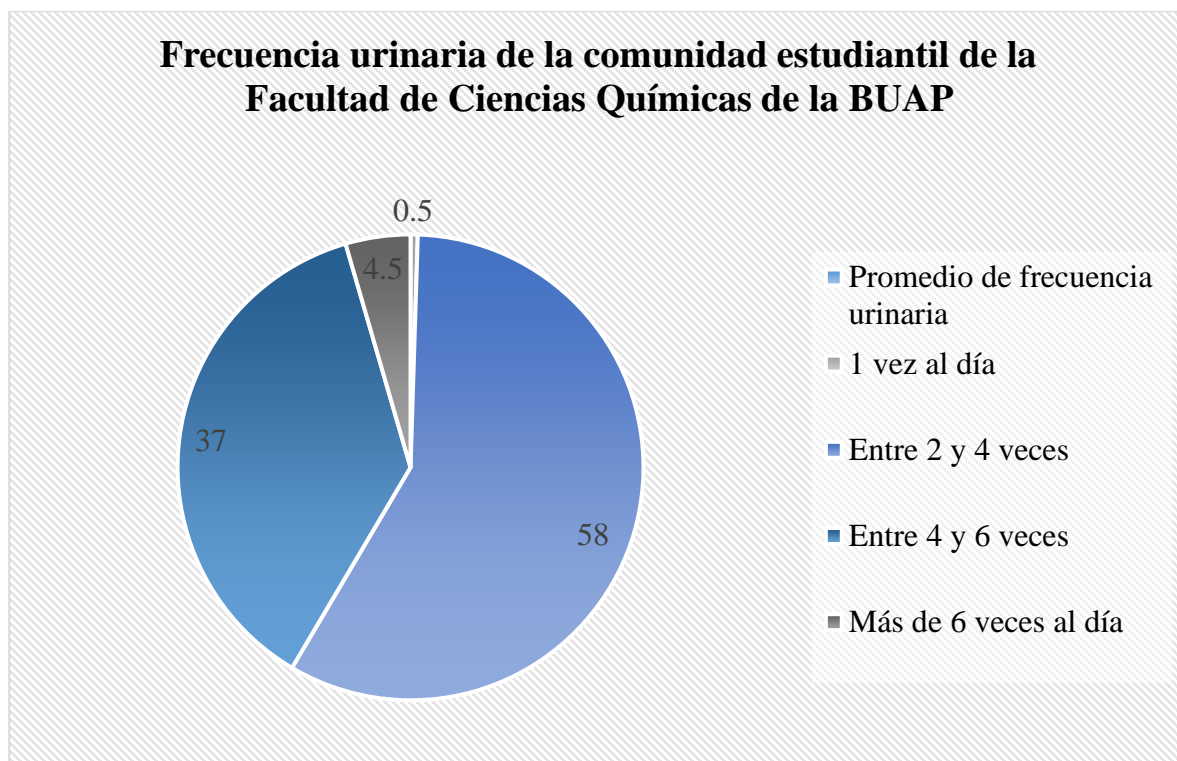


Gráfico 16. Atención médica accidente o traumatismo en los últimos 14 días en la comunidad estudiantil de la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP

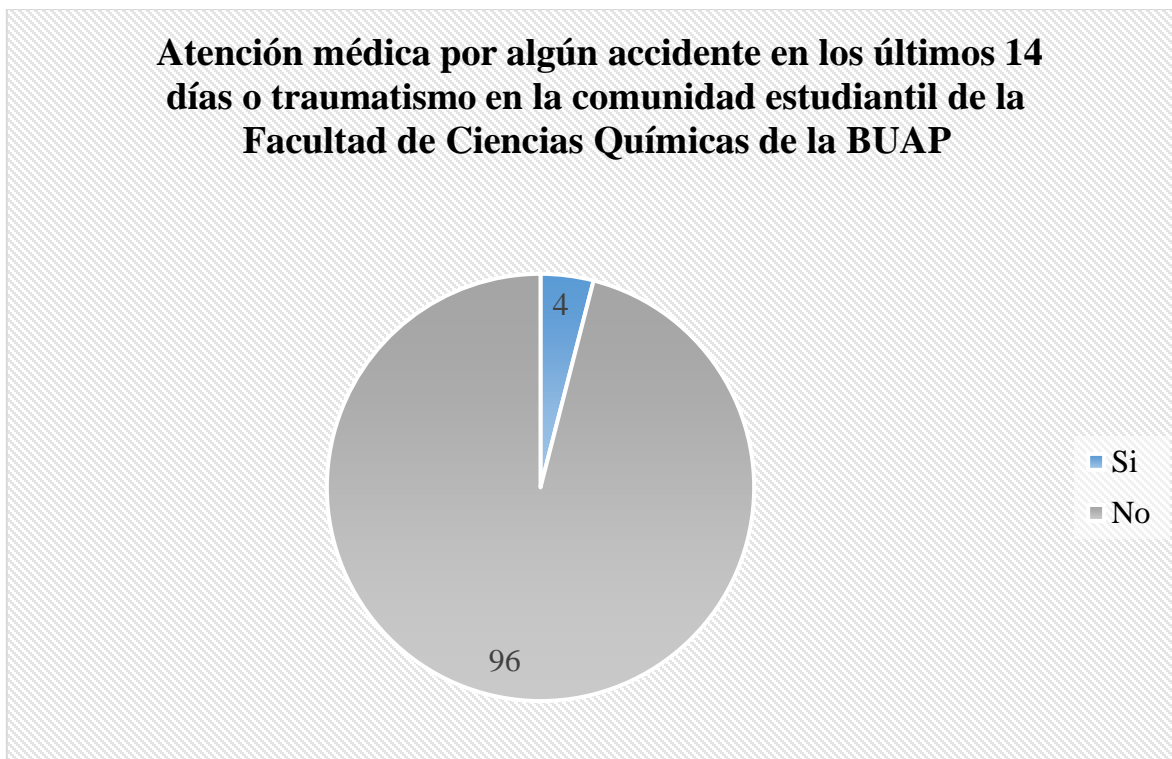


Gráfico 7. Padecimiento de enfermedades crónicas, Ej. Diabetes, hipertensión, etc. en la comunidad estudiantil de la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP

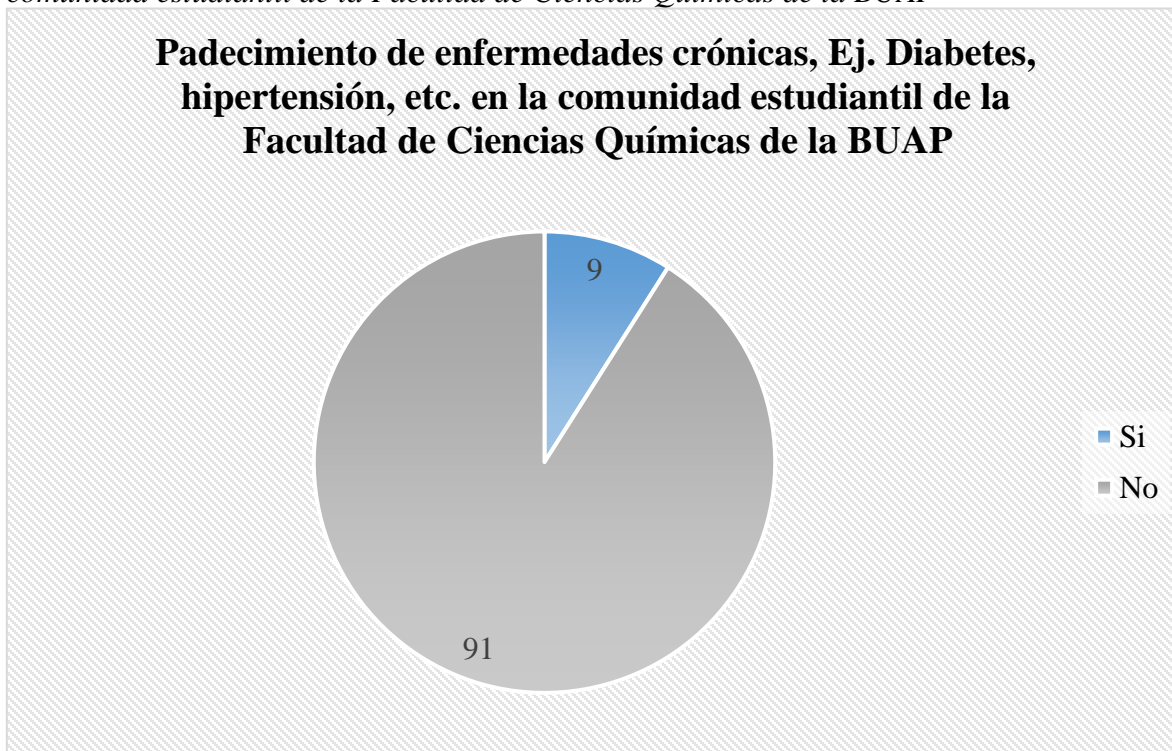


Gráfico 8. Padecimiento de enfermedades autoinmunes en la comunidad estudiantil de la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP

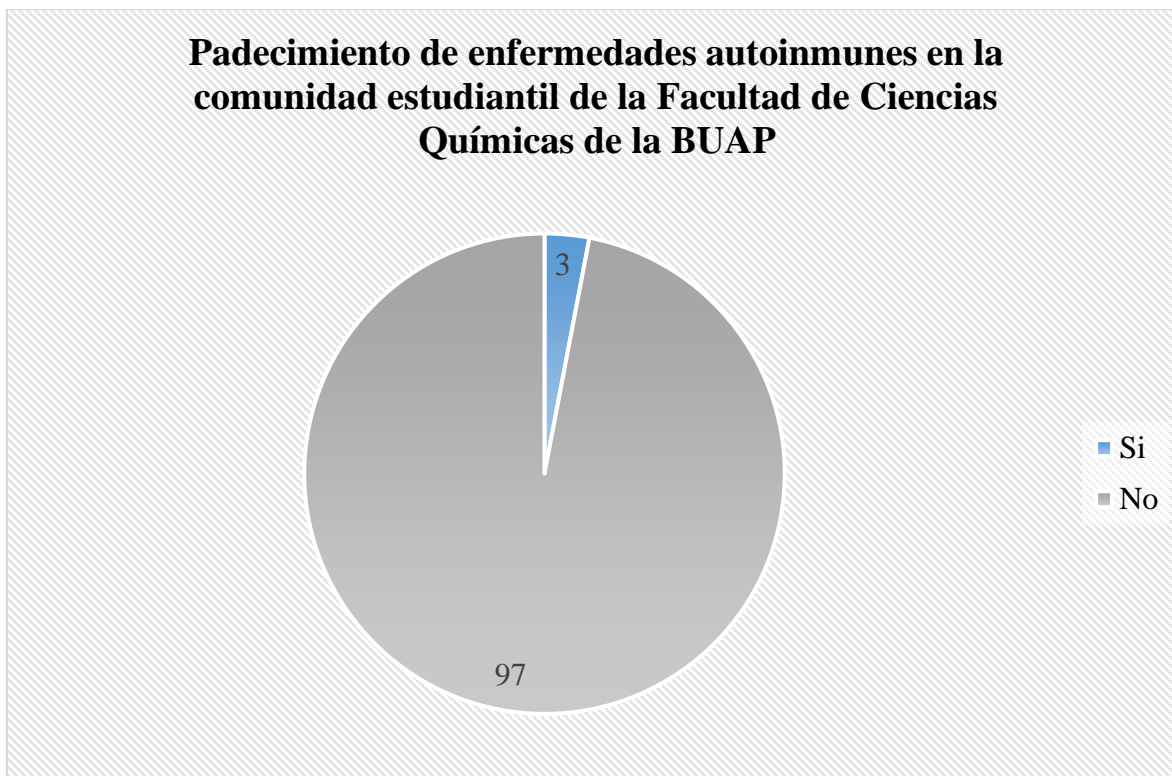


Gráfico 9. Consumo de antioxidantes de manera frecuente en la comunidad estudiantil de la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP

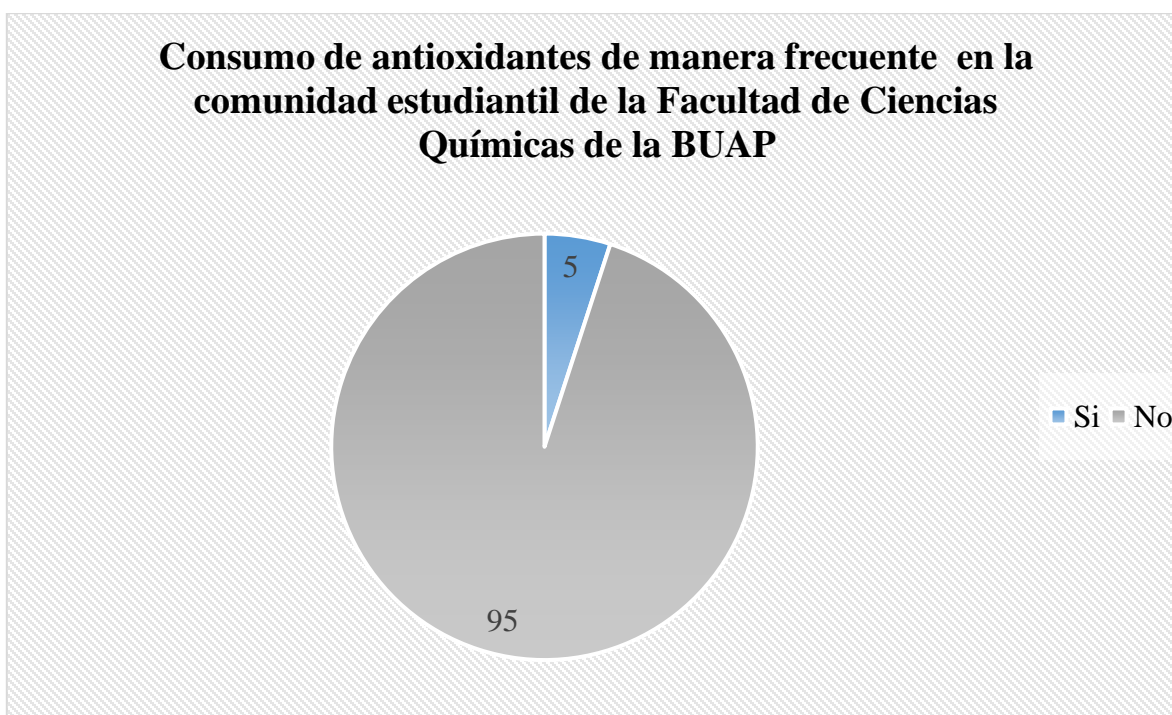


Gráfico 10. Consumo de manera frecuente de medicamentos sin prescripción médica en la comunidad estudiantil de la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP

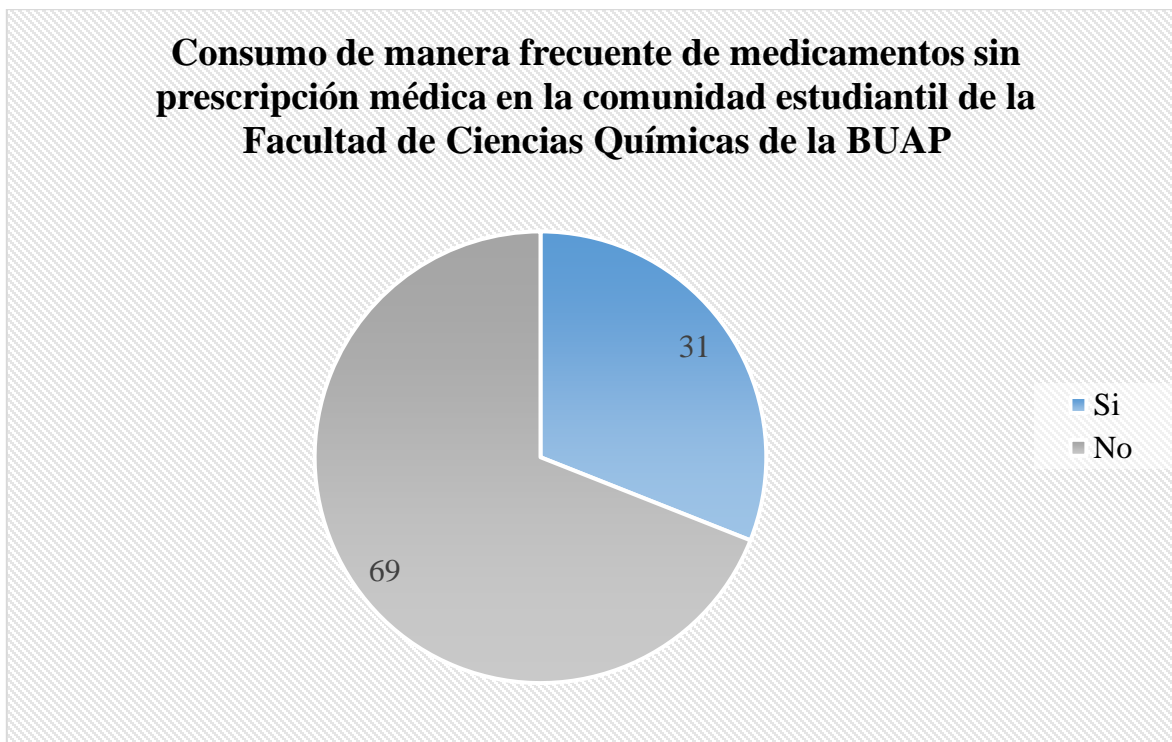


Gráfico 11. Frecuencia de consumo de medicamentos sin prescripción médica en la comunidad estudiantil de la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP

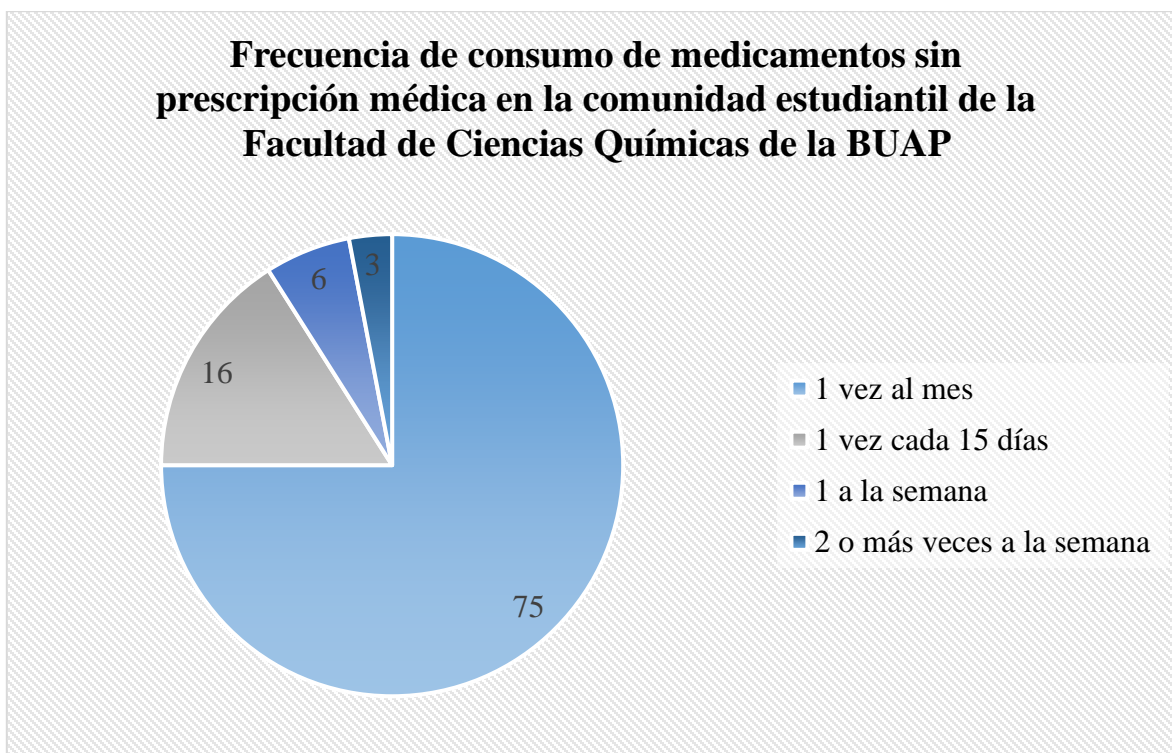
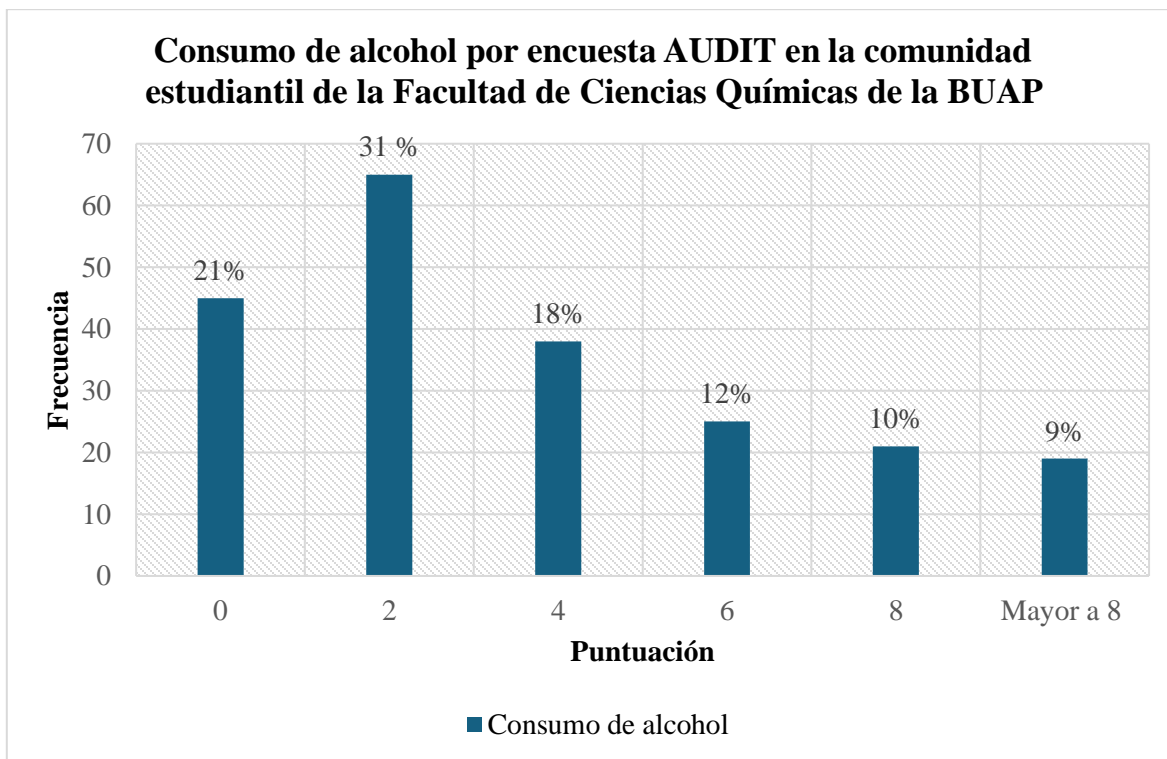


Gráfico 12. Consumo de alcohol por encuesta AUDIT en la comunidad estudiantil de la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP



Criterios de eliminación

De acuerdo con los resultados de la encuesta realizada, se excluyeron aquellos individuos que habían recibido atención médica debido a accidentes o traumatismos en los últimos 14 días, los cuales representaban el 4 % de los encuestados. Asimismo, se excluyó a las personas con enfermedades crónicas como diabetes, hipertensión, hígado graso, entre otras, que constituían el 9 % de los participantes. Por otro lado, aquellos que padecían enfermedades autoinmunes representaban únicamente el 3 % de la muestra y también fueron excluidos.

De igual manera, se excluyó a los individuos que consumían antioxidantes de manera frecuente, quienes representaban el 5 % de la población encuestada. En cuanto al consumo de medicamentos sin prescripción médica, aunque el 31 % de los encuestados declaró consumir este tipo de medicamentos, no se excluyó a esta población debido a la baja frecuencia de consumo ya que el 75 % de ellos los utilizaba una vez al mes y el 16 %, una vez cada 15 días. Esta decisión se tomó considerando tanto la frecuencia de uso como la naturaleza de los fármacos. De manera paralela se excluyó a la población que presentó una

puntuación mayor a 8 en el cuestionario AUDIT para el consumo de alcohol que fue el 9% de los encuestados.

IV. Resultados complementarios

Tabla 14. Condensado de resultados con los grupos colapsados (Hombres más mujeres).

| <i>Analito</i> | Medidas de tendencia central | | Medidas de variabilidad | | Medidas de forma de la distribución | |
|-------------------|-------------------------------------|----------|--------------------------------|--------|--|-----------|
| | \bar{x} | Mediana | s | C.V. | Curtosis | Asimetría |
| <i>c-LT</i> | 1.613 | 1.560 | 0.901 | 55.9 % | 3.773 | 1.173 |
| <i>c-4-HNE</i> | 1.363 | 1.359 | 0.837 | 65.9 % | -0.635 | 0.334 |
| <i>c-MDA</i> | 0.266 | 0.221 | 0.191 | 80.7 % | -0.239 | 0.768 |
| <i>c-Nitritos</i> | 0.807 | 0.591 | 0.694 | 86.1 % | 9.294 | 2.396 |
| <i>a-SOD</i> | 7.273 | 5.793 | 4.051 | 55.7 % | 2.723 | 1.734 |
| <i>a-CAT</i> | 12.480 | 9.695 | 8.377 | 95.1 % | 1.104 | 1.108 |
| <i>CRFP</i> | 176.771 | 160.250 | 99.267 | 56.2 % | 1.708 | 0.963 |
| <i>c-ERO's</i> | 2.802 | 2.718 | 1.592 | 56.8 % | 0.417 | 0.594 |
| <i>c-GSH-T</i> | 6.600 | 6.890 | 1.690 | 27.9 % | -0.180 | -0.30 |
| <i>c-GSH</i> | 6.656 | 6.878 | 1.861 | 28.0 % | 2.236 | 0.435 |
| <i>c-GSSG</i> | 0.025 | 0.020 | 0.019 | 78.2 % | 4.869 | 1.982 |
| <i>a-GRx</i> | 20.870 | 14.47 | 17.28 | 95.4 % | -0.120 | 0.910 |
| <i>a-GSTx</i> | 1495.674 | 1149.982 | 1173.992 | 78.5 % | 1.690 | 1.306 |
| <i>a-GPx</i> | 14.95 | 13.20 | 9.92 | 66.4 % | 8.63 | 2.64 |

IV. Gráficos Q-Q de cada analito

Gráfico 13.- Gráfico Q-Q normal: Concentración de LT

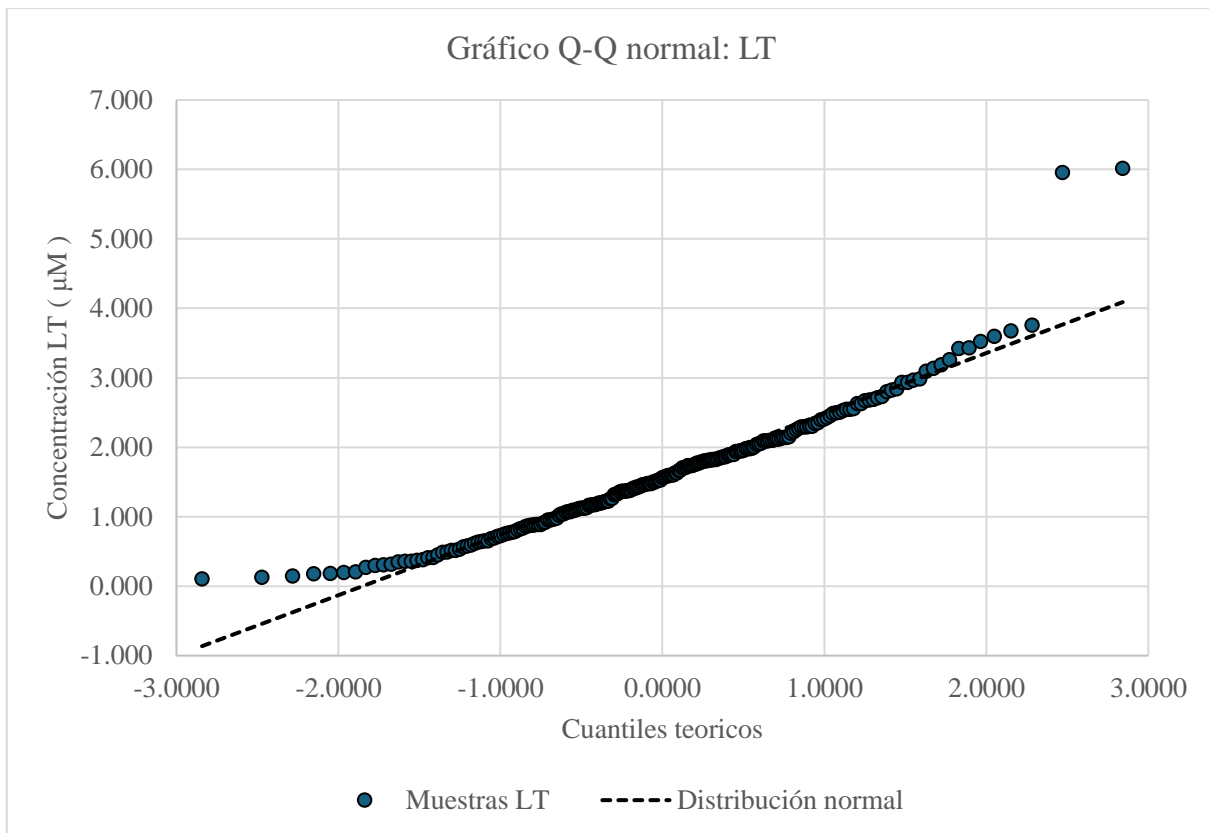


Gráfico 14. Gráfico Q-Q normal: Concentración MDA

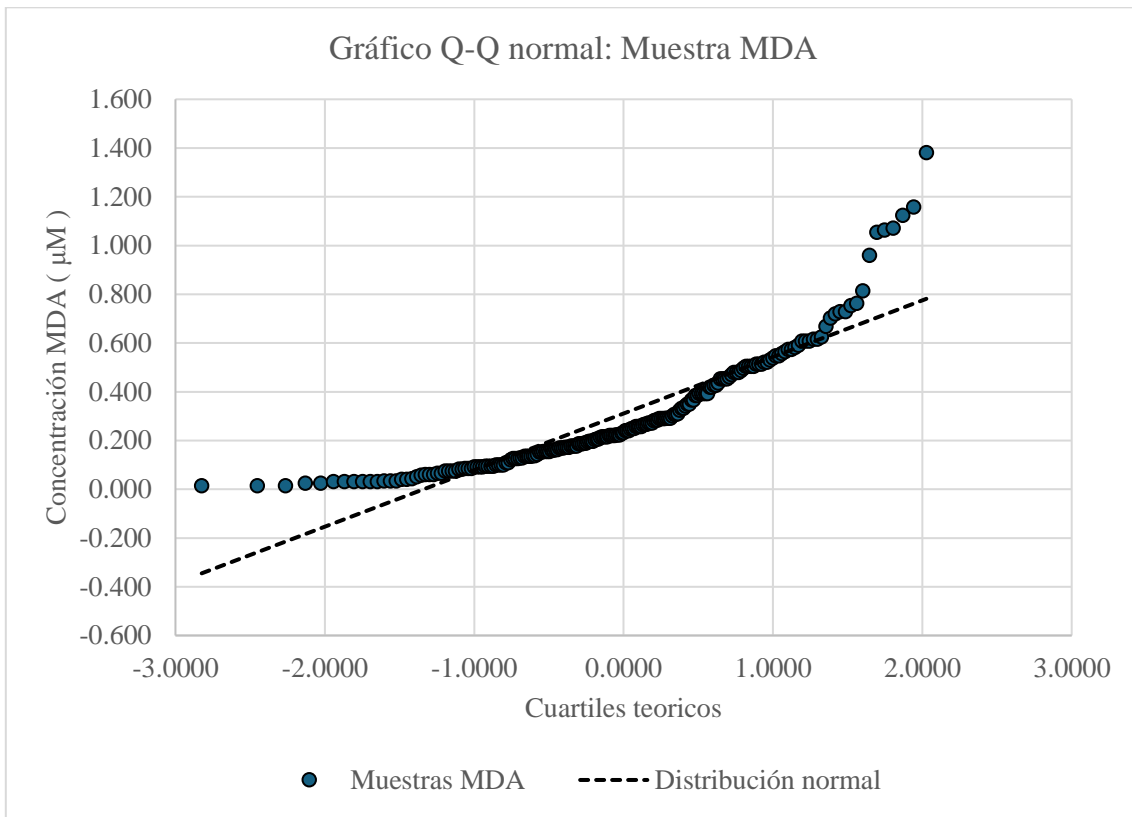


Gráfico 15.- Gráfico Q-Q normal: Concentración de nitritos

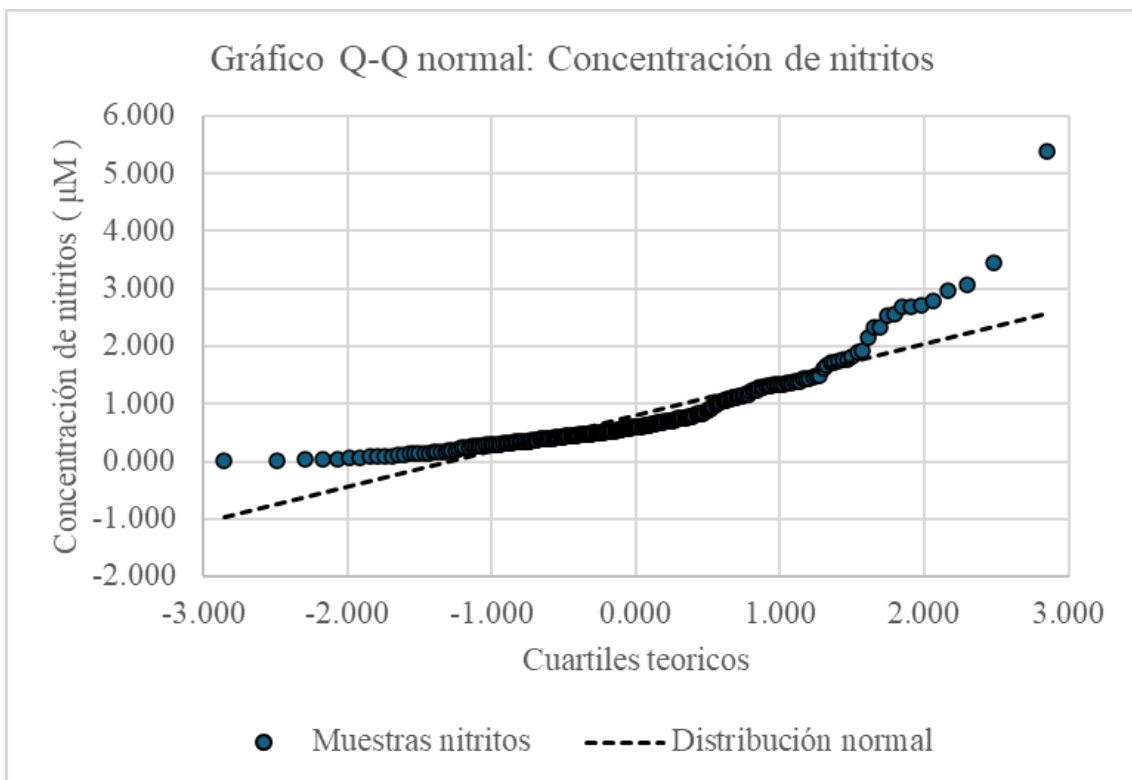


Gráfico 16. Gráfico Q-Q normal: Actividad de SOD

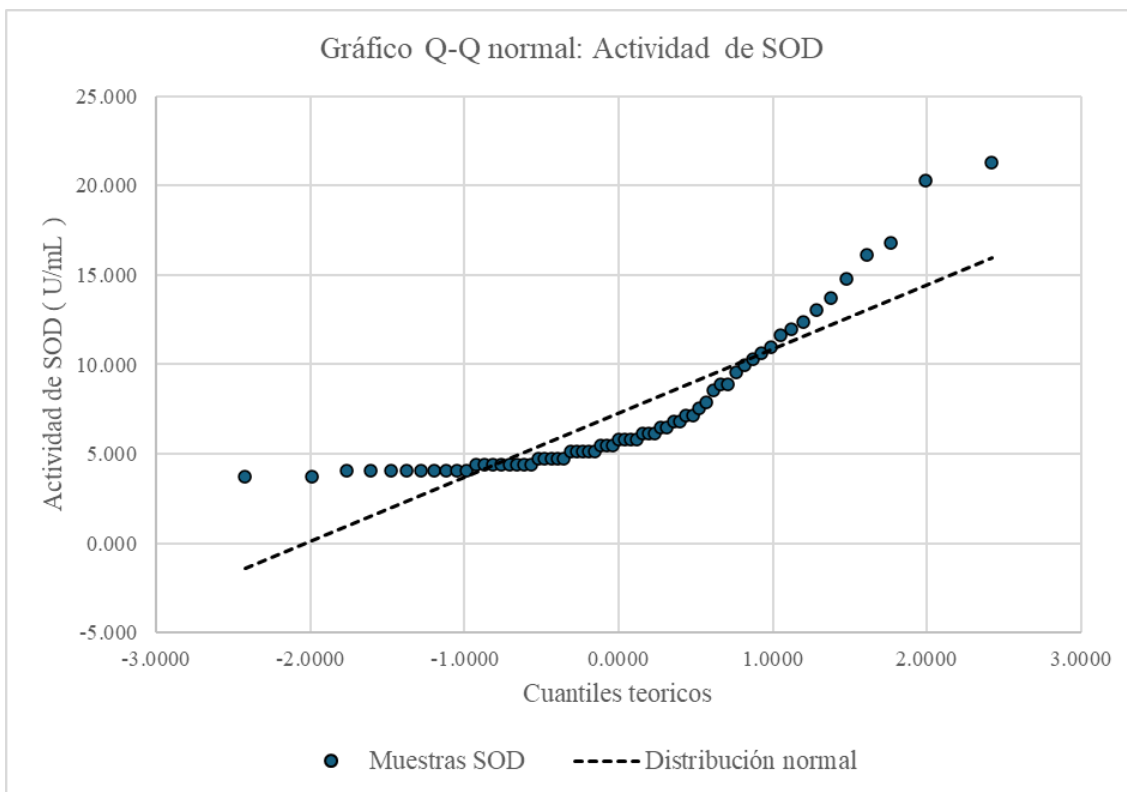


Gráfico 17. Gráfico Q-Q normal: Actividad de CAT

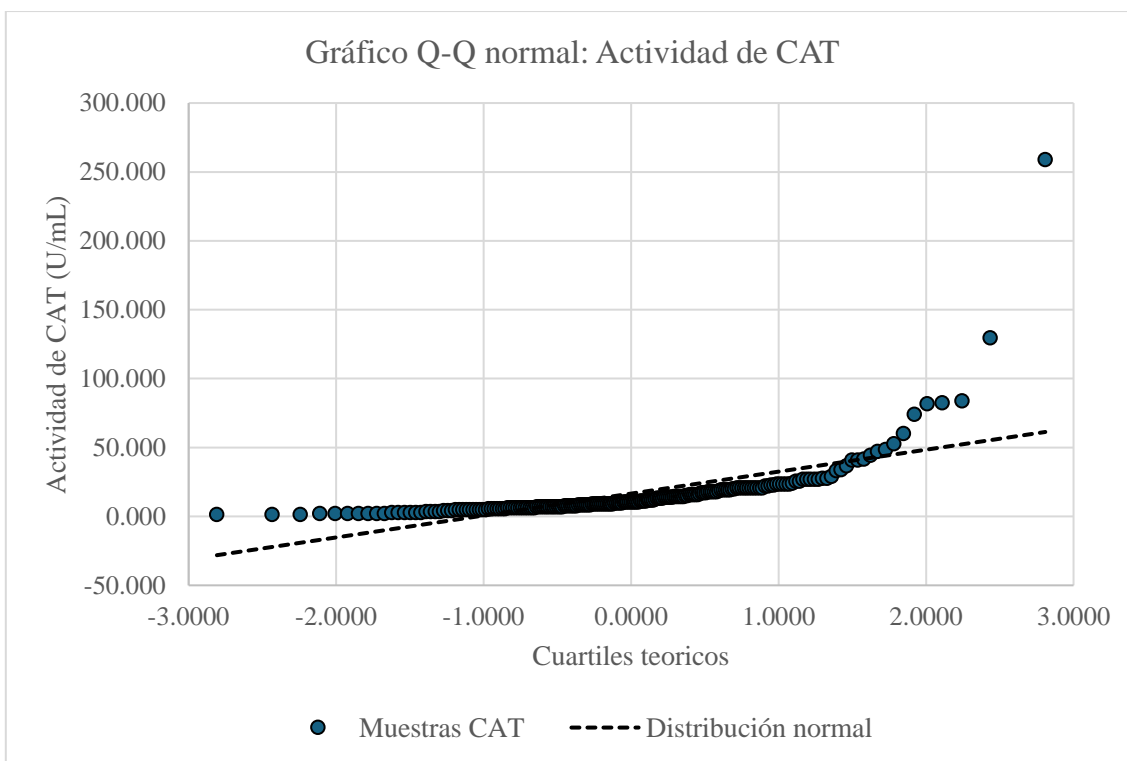


Gráfico 18. Gráfico Q-Q normal: CRFP

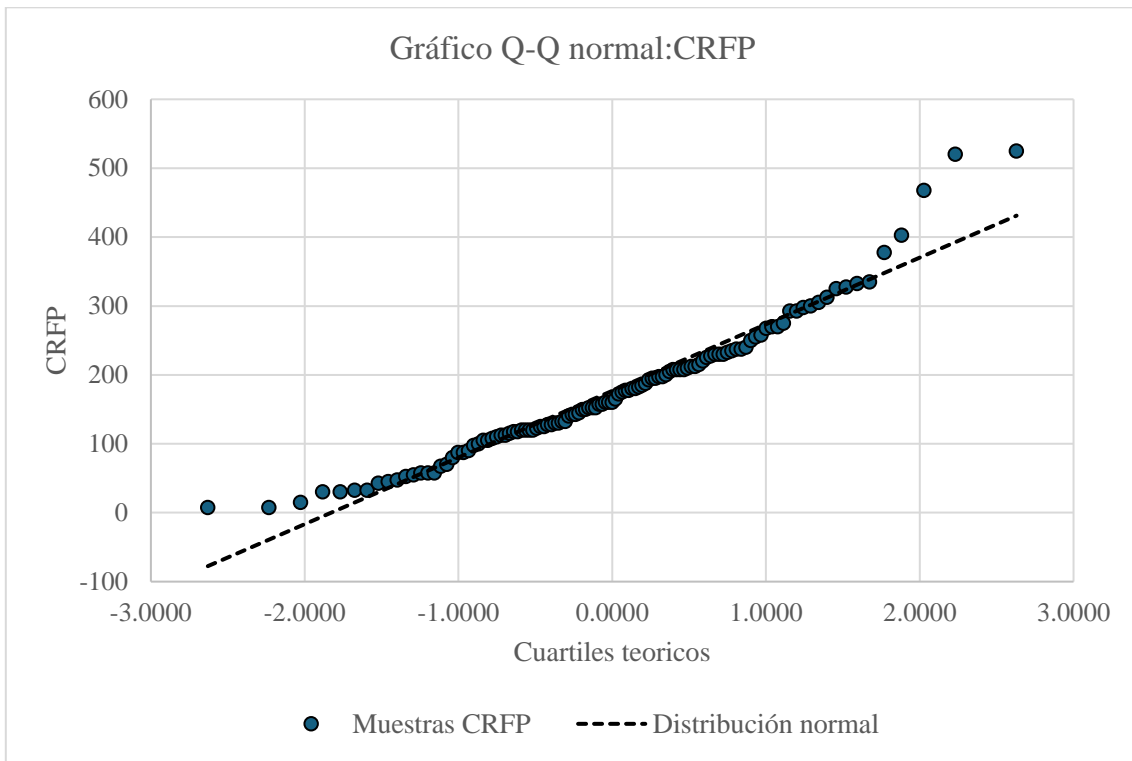


Gráfico 19. Gráfico Q-Q normal: Concentración de ERO's

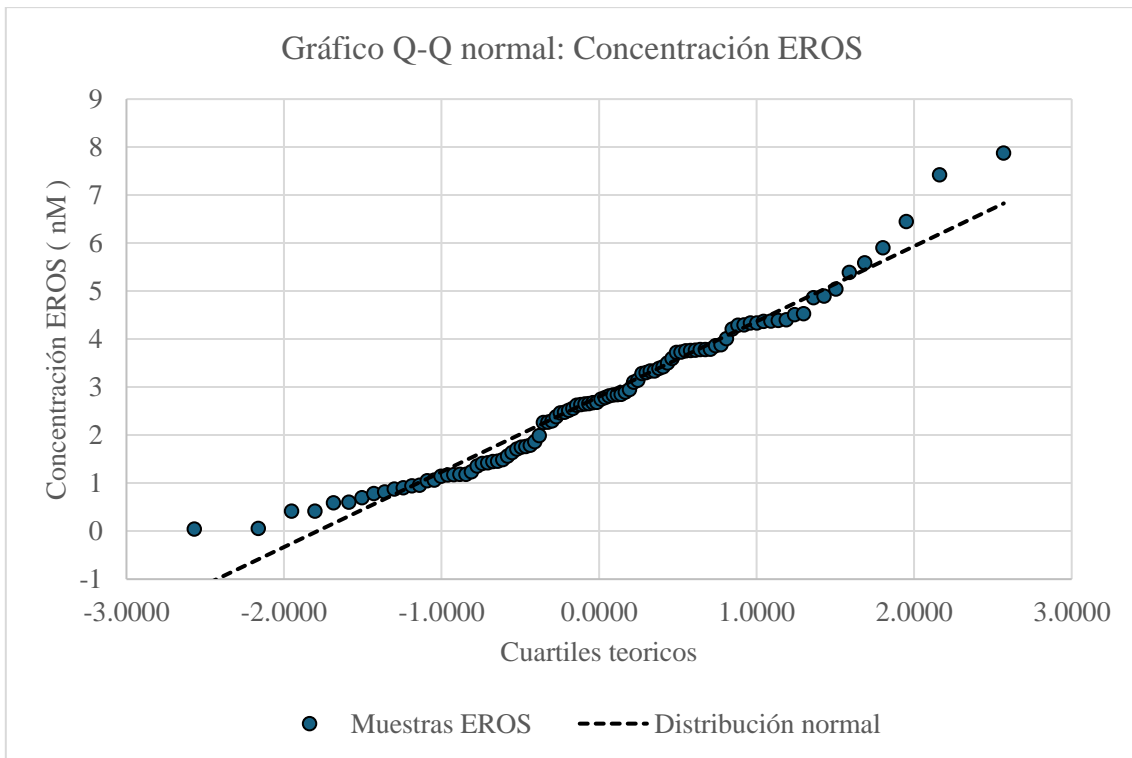


Gráfico 20. Histograma Q-Q normal: Concentración GSH-T

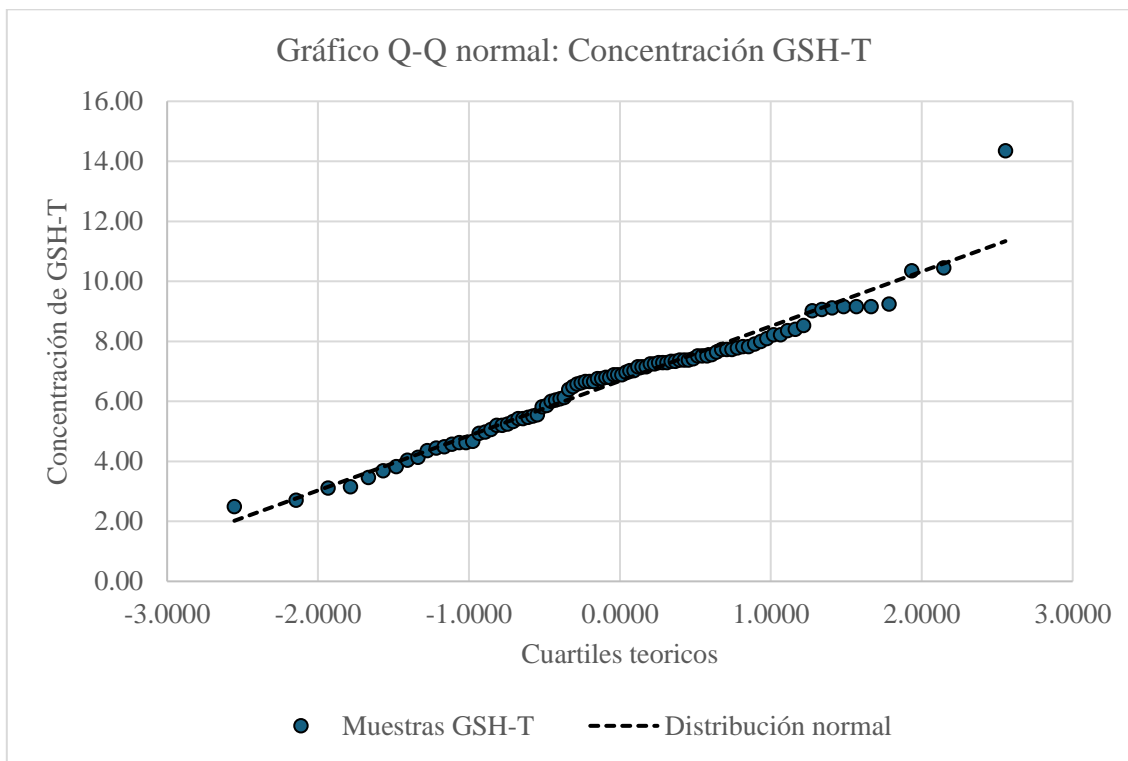


Gráfico 21. Gráfico Q-Q normal: Concentración GSH

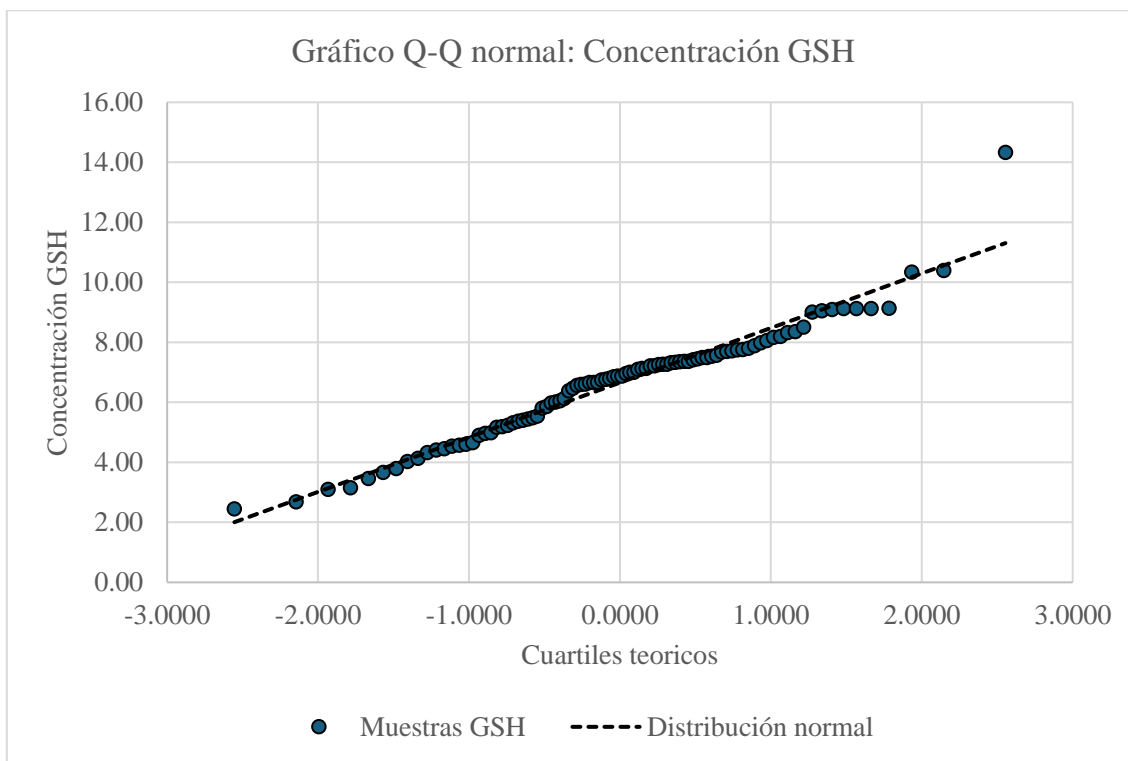


Gráfico 22. Gráfico Q-Q normal: Concentración GSSG

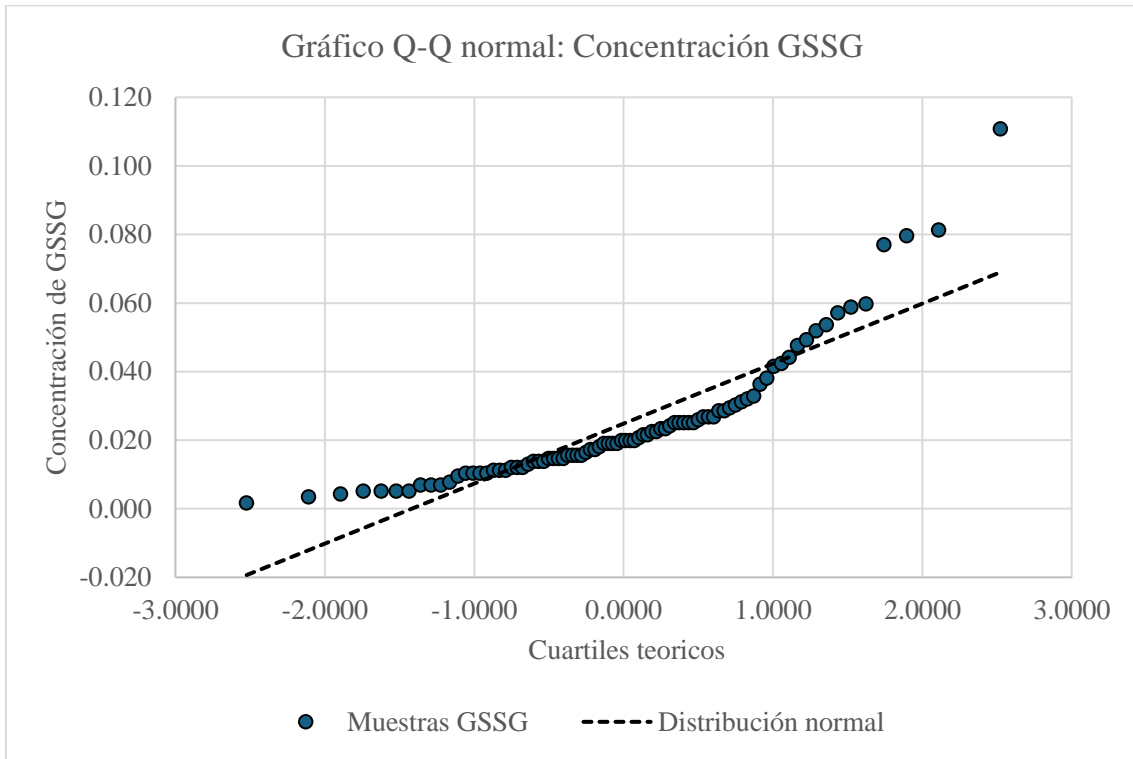


Gráfico 23. Gráfico Q-Q normal: Actividad de GRx

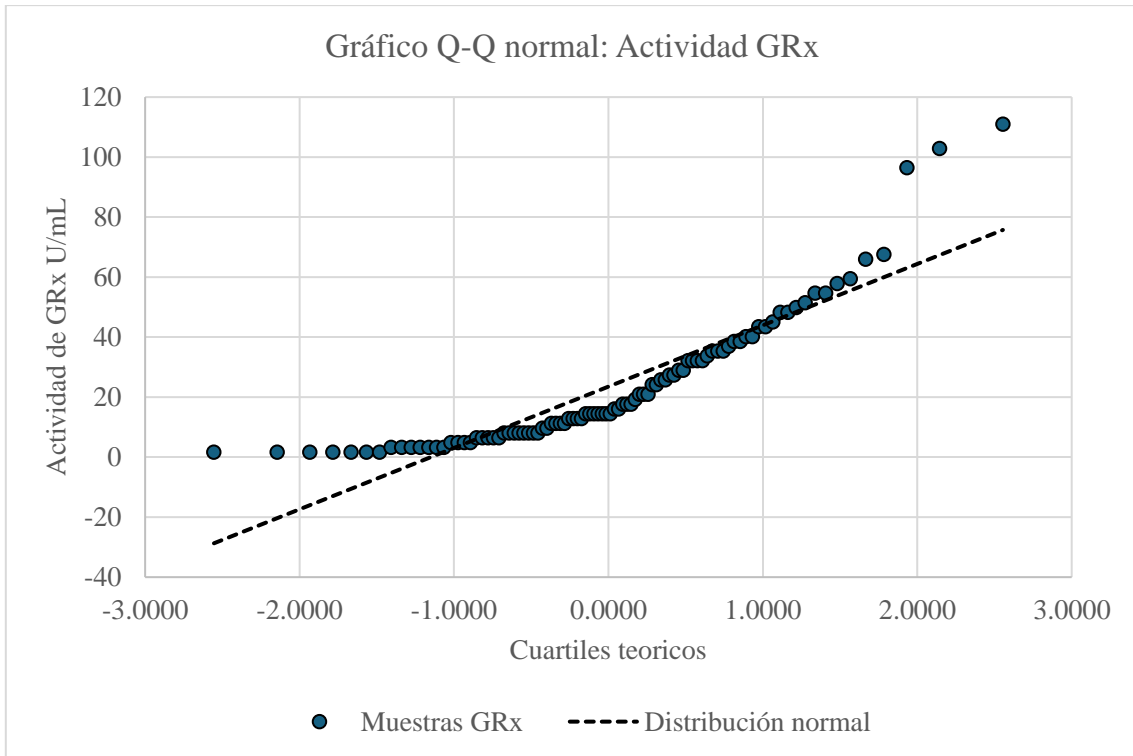


Gráfico 24.- Gráfico Q-Q normal: Concentración de 4-HNE

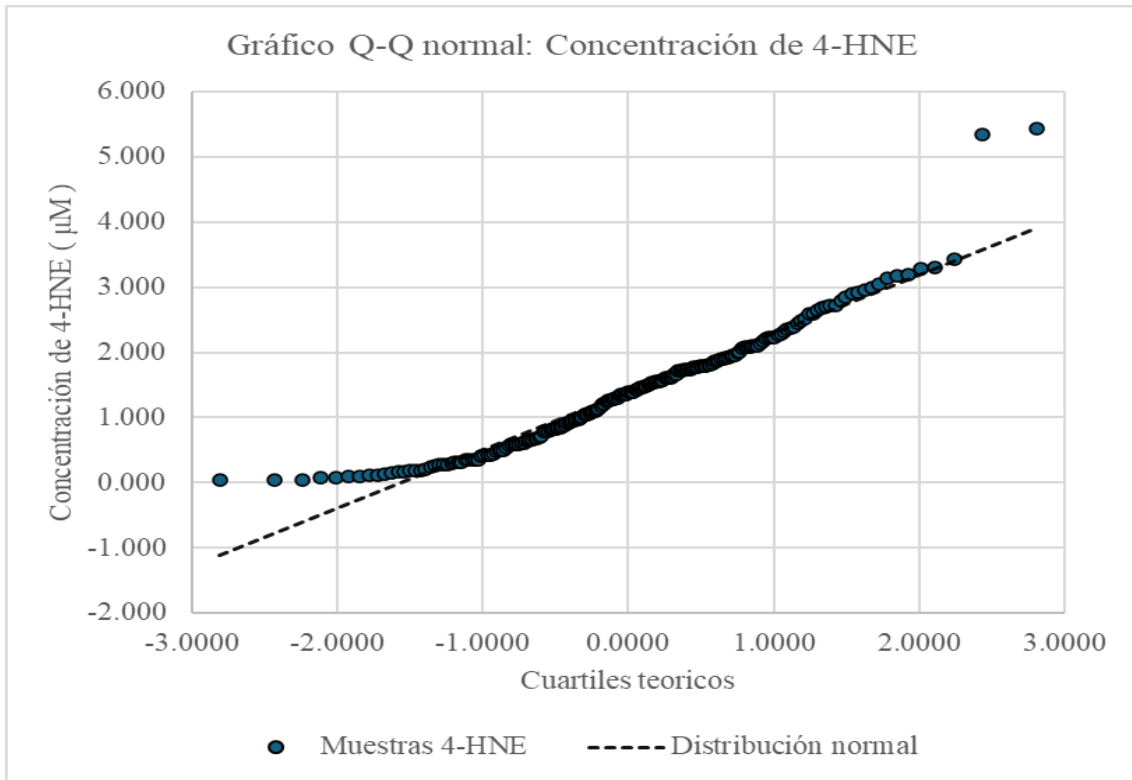


Gráfico 25. Gráfico Q-Q normal: Actividad GSTx

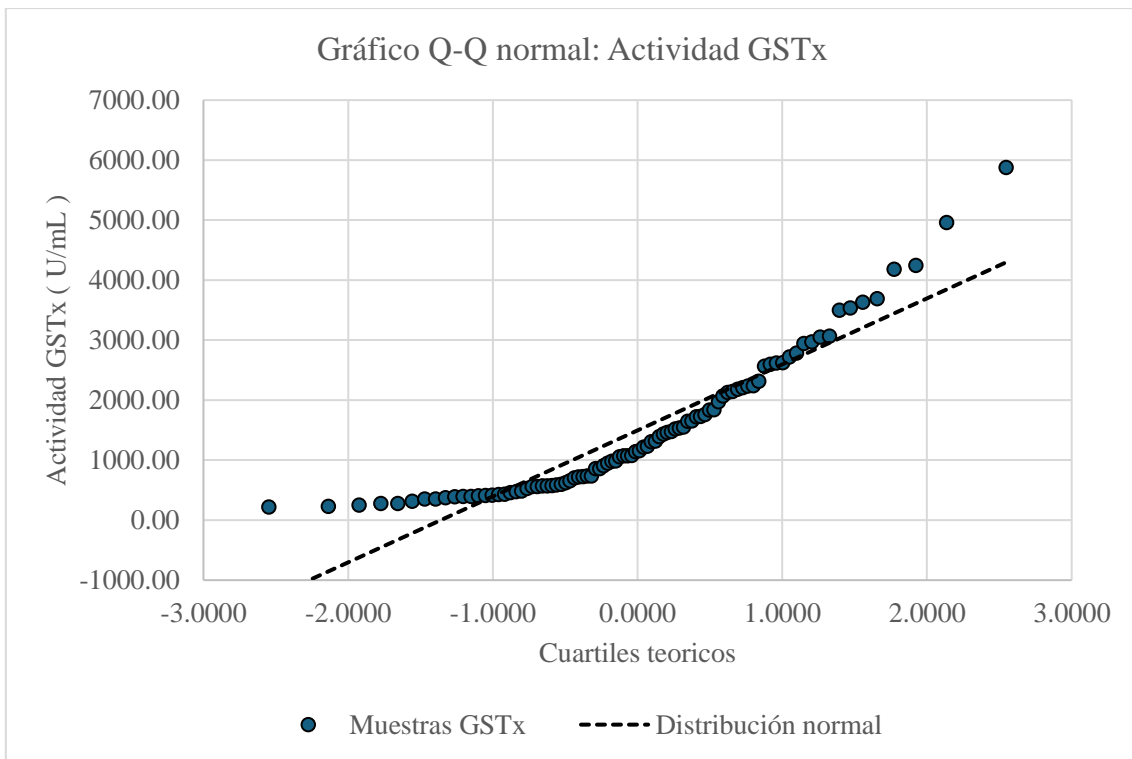
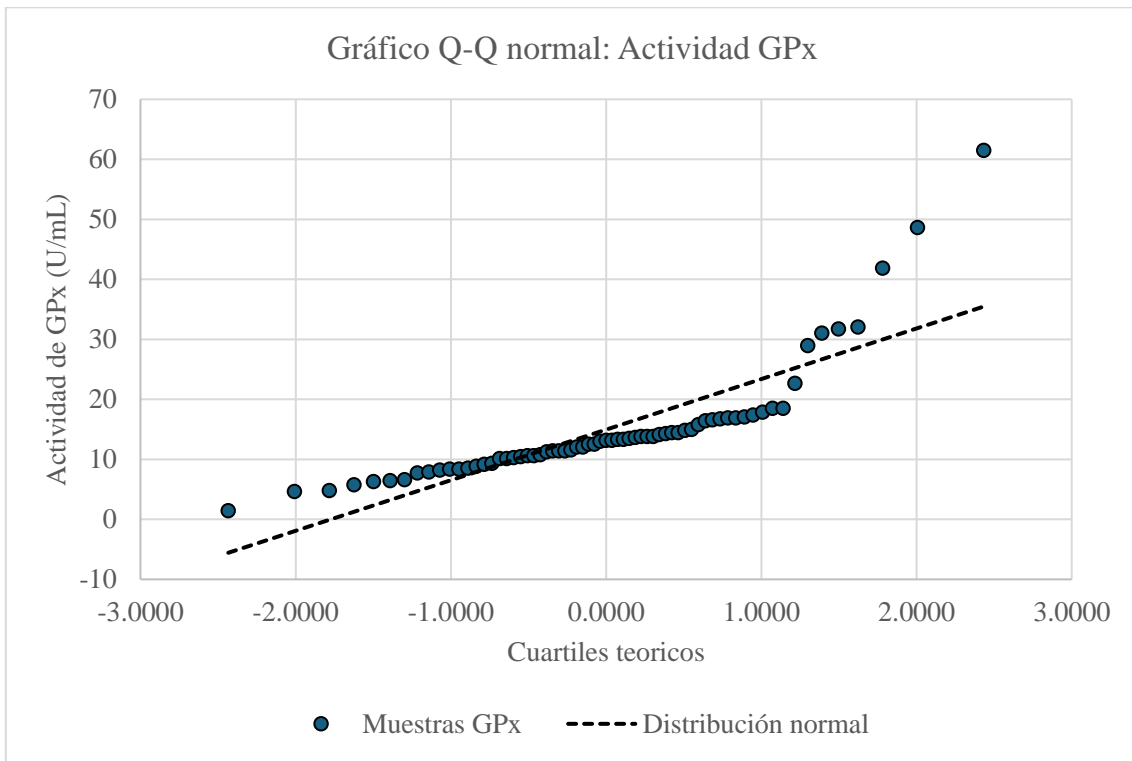


Gráfico 26. Gráfico Q-Q normal: Actividad de GPx



V. Prueba de χ^2

Para la prueba de χ^2 ; se siguió el proceso descrito por Díaz Rodríguez, M. (2022) y Llinás Solano, H. (2017).

Como primer paso, los datos se ordenaron de forma ascendente. Una vez ordenados, se dio paso la construcción de una tabla de frecuencias agrupadas de la muestra correspondiente, donde el número de clases estuvo definido por la fórmula de Sturges, donde $k = 1 + 3.322 \text{ Log } (N)$ siendo k el número de clases para N datos, y N el total de datos que contendrá el histograma. Conociendo entonces el número de clases para el histograma, se dio paso a calcular el ancho de cada una de las clases, este dado por la fórmula $C = \frac{R}{k}$ donde C es el ancho de clase, R el rango de los datos y k el número de clases. Posteriormente, se establecen las hipótesis tanto nula como alternativa, partiendo que de esta prueba de bondad parte del supuesto de normalidad, las hipótesis quedarían establecidas tal que: Hipótesis nula (H_0) e hipótesis alternativa (H_a) siendo que:

H_0 : Los datos se distribuyen de manera normal

H_a : Los datos no se distribuyen de manera normal

De manera inmediata se calcula el valor de probabilidad de que la variable se encuentre dentro de cada uno de los intervalos. Al desconocer la media y la desviación estándar poblacional, se toman los aproximados obtenidos a través del análisis de los datos de la muestra; se establece entonces que únicamente durante el desarrollo de la prueba de χ^2 : $\mu = \bar{X}$ y $\sigma^2 = s^2$; siendo μ la media poblacional, \bar{X} la media muestral, σ^2 la varianza poblacional y s^2 la varianza muestral. Para calcular esta probabilidad entonces, se aplica la fórmula de:

$$p_i = P\left(\frac{X - \bar{x}}{s}\right)$$

donde se denota p_i como la probabilidad para que la variable X , se encuentre dentro del intervalo de i , donde $i=1 \dots k$. Esta fórmula se aplica a ambos límites de los intervalos, límite superior (L_{sup}) e inferior (L_{inf}) de clase del histograma, en este sentido la fórmula pasa a ser:

$$p_i = P\left(\frac{L_{sup} - \bar{x}}{s} - \frac{L_{inf} - \bar{x}}{s}\right)$$

No obstante, se puede utilizar un procedimiento análogo calculando únicamente la probabilidad por debajo de los límites inferiores (PL_{inf}) de cada uno de los intervalos y posteriormente obtener por diferencia la probabilidad de encontrar la variable X en el intervalo de i (p_i), que se interpreta como el área bajo la curva normal hipotética que caen entre las fronteras de clase en unidades de valor Z .

A continuación, bajo el supuesto de distribución normal se calcula la frecuencia teórica esperada para la distribución de datos analizada. La frecuencia teórica se obtiene a partir de $E_i = p_i * n$, donde E_i es la frecuencia teórica esperada y n el total de datos de la muestra.

En seguida, se aplica el estadístico χ^2 se calcula el valor de chi experimental (χ_{exp}^2) con la fórmula de:

$$\chi^2 = \sum \frac{(F_e - F_t)^2}{F_t}$$

Finalmente, se obtiene el valor de χ^2 crítica a partir del valor de significancia y los grados de libertad, este valor se encuentra disponible en tablas del valor de χ^2 . El valor de χ^2 crítica

se denota como $\chi^2_{\alpha, \circ L}$, donde α es el valor de significancia y $\circ L$ los grados de libertad calculados para esa distribución.

Los grados de libertad para la prueba de χ^2 como prueba de bondad de ajuste a lo largo de este documento parte de que χ^2 sigue una distribución asintótica con $k-1$ grados de libertad cuando la distribución normal teórica está completamente especificada, sin embargo, para los casos donde se tienen que estimar p parámetros, la distribución asintótica de χ^2 esta dada por $\circ L = k - p$ (Lorenzo Landa, G.,2011). Para el caso de los datos analizados se desconocen tanto μ como σ^2 ; de forma que $\circ L$ se calculan a partir de la fórmula: $\circ L = k - 3$; siendo k el número de clases del histograma generado a partir de los datos que se va a realizar la prueba. A continuación, se muestran los datos obtenidos en el desarrollo de la elaboración de la prueba χ^2 .

Tabla 15. Prueba de χ^2 para la muestra de LT.

| Clase | Frecuencia | Valor de Z | PL_{inf} | p_i | E_i | χ^2_{exp} |
|-----------|------------|------------|------------|-------|--------|----------------|
| 0.106 | 1 | -1.829 | 0.034 | 0.034 | 7.453 | 5.587 |
| 0.349 | 10 | -1.525 | 0.064 | 0.030 | 6.600 | 1.751 |
| 0.593 | 15 | -1.222 | 0.111 | 0.047 | 10.447 | 1.984 |
| 0.836 | 17 | -0.919 | 0.179 | 0.068 | 15.092 | 0.241 |
| 1.080 | 21 | -0.615 | 0.269 | 0.090 | 19.900 | 0.061 |
| 1.323 | 22 | -0.312 | 0.378 | 0.108 | 23.950 | 0.159 |
| 1.567 | 26 | -0.009 | 0.497 | 0.119 | 26.307 | 0.004 |
| 1.810 | 24 | 0.295 | 0.616 | 0.119 | 26.375 | 0.214 |
| 2.054 | 26 | 0.598 | 0.725 | 0.109 | 24.134 | 0.144 |
| 2.297 | 20 | 0.902 | 0.816 | 0.091 | 20.157 | 0.001 |
| 2.541 | 12 | 1.205 | 0.886 | 0.070 | 15.366 | 0.737 |
| 2.784 | 10 | 1.508 | 0.934 | 0.048 | 10.691 | 0.045 |
| 3.027 | 7 | 1.812 | 0.965 | 0.031 | 6.789 | 0.007 |
| 3.271 | 4 | 2.115 | 0.983 | 0.018 | 3.935 | 0.001 |
| 3.514 | 2 | 2.418 | 0.992 | 0.009 | 2.082 | 0.003 |
| 3.758 | 4 | 2.722 | 0.997 | 0.005 | 1.005 | 8.925 |
| SUMATORIA | | | | | | 19.863 |

La n tomada para el análisis de los datos de lipoperoxidación total fue de 221, $n =114$ de hombres y $n =109$ de mujeres junto con la eliminación de 2 valores atípicos identificados.

Para este caso, la $\chi_{\alpha, L}^2$ específica fue $\chi_{0.05, 13}^2 = 22.362$. Como puede observarse el valor de $\chi_{0.05, 13}^2 > \chi_{exp}^2$, de forma que no hay evidencia estadística para rechazar la hipótesis nula, lo que se traduce en que los datos no difieren estadísticamente de una distribución de tipo normal.

Tabla 16. Prueba de χ^2 para la concentración de 4-HNE

| Clase | Frecuencia | Valor Z | PL_{inf} | p_i | E_i | χ_{exp}^2 |
|-----------|------------|---------|------------|-------|--------|----------------|
| 0.184 | 1.000 | -2.298 | 0.011 | 0.010 | 1.990 | 0.493 |
| 0.295 | 3.000 | -2.019 | 0.022 | 0.011 | 2.183 | 0.306 |
| 0.406 | 7.000 | -1.740 | 0.041 | 0.019 | 3.821 | 2.645 |
| 0.517 | 8.000 | -1.461 | 0.072 | 0.031 | 6.190 | 0.529 |
| 0.628 | 12.000 | -1.182 | 0.119 | 0.047 | 9.281 | 0.796 |
| 0.739 | 10.000 | -0.902 | 0.183 | 0.065 | 12.880 | 0.644 |
| 0.850 | 15.000 | -0.623 | 0.267 | 0.083 | 16.542 | 0.144 |
| 0.961 | 13.000 | -0.344 | 0.365 | 0.099 | 19.663 | 2.258 |
| 1.072 | 16.000 | -0.065 | 0.474 | 0.109 | 21.633 | 1.467 |
| 1.183 | 19.000 | 0.214 | 0.585 | 0.111 | 22.026 | 0.416 |
| 1.294 | 23.000 | 0.493 | 0.689 | 0.104 | 20.757 | 0.242 |
| 1.405 | 28.000 | 0.772 | 0.780 | 0.091 | 18.104 | 5.410 |
| 1.516 | 17.000 | 1.051 | 0.853 | 0.073 | 14.614 | 0.390 |
| 1.627 | 9.000 | 1.331 | 0.908 | 0.055 | 10.918 | 0.337 |
| 1.738 | 11.000 | 1.610 | 0.946 | 0.038 | 7.549 | 1.578 |
| 1.855 | 7.000 | 1.904 | 0.972 | 0.025 | 5.029 | 0.772 |
| SUMATORIA | | | | | | 18.426 |

La n tomada para el análisis de los datos de la muestra obtenida de la concentración de 4-HNE fue de 199, $n = 102$ de hombres y $n = 99$ de mujeres junto con la eliminación de 2 valores atípicos identificados, el transformador empleado para la normalización de los datos fue el operador de raíz cuadrada.

Para este caso, la $\chi_{\alpha, L}^2$ específica fue $\chi_{0.05, 13}^2 = 22.362$. Como puede observarse el valor de $\chi_{0.05, 13}^2 > \chi_{exp}^2$, de forma que no hay evidencia estadística para rechazar la hipótesis nula, lo que se traduce en que los datos no difieren estadísticamente de una distribución de tipo normal.

Tabla 17. Prueba de χ^2 para la concentración de MDA

| Clase | Frecuencia | Valor Z | PL_{inf} | p_i | E_i | χ_{exp}^2 |
|-----------|------------|---------|------------|-------|--------|----------------|
| 0.079 | 4.000 | -2.073 | 0.019 | 0.019 | 3.896 | 0.003 |
| 0.171 | 5.000 | -1.596 | 0.055 | 0.036 | 7.382 | 0.769 |
| 0.263 | 19.000 | -1.119 | 0.132 | 0.076 | 15.583 | 0.749 |
| 0.355 | 24.000 | -0.641 | 0.261 | 0.129 | 26.308 | 0.202 |
| 0.447 | 41.000 | -0.164 | 0.435 | 0.174 | 35.521 | 0.845 |
| 0.539 | 40.000 | 0.313 | 0.623 | 0.188 | 38.360 | 0.070 |
| 0.631 | 22.000 | 0.790 | 0.785 | 0.162 | 33.135 | 3.742 |
| 0.723 | 25.000 | 1.267 | 0.897 | 0.112 | 22.891 | 0.194 |
| 0.815 | 16.000 | 1.744 | 0.959 | 0.062 | 12.648 | 0.888 |
| 0.907 | 8.000 | 2.221 | 0.987 | 0.027 | 5.589 | 1.040 |
| SUMATORIA | | | | | | 8.502 |

La n tomada para el análisis de los datos de la muestra obtenida de la concentración de MDA fue de 204, $n = 107$ de hombres y $n = 104$ de mujeres junto con la eliminación de 7 valores atípicos identificados, el transformador empleado para la normalización de los datos fue el operador de raíz cuadrada.

Para este caso, la $\chi_{\alpha, \nu}^2$ específica fue $\chi_{0.05, 7}^2 = 14.067$. Como puede observarse el valor de $\chi_{0.05, 7}^2 > \chi_{exp}^2$, de forma que no hay evidencia estadística para rechazar la hipótesis nula, lo que se traduce en que los datos no difieren estadísticamente de una distribución de tipo normal.

Tabla 18. Prueba de χ^2 para la concentración de nitritos

| Clase | Frecuencia | Valor Z | PL_{inf} | p_i | E_i | χ_{exp}^2 |
|-----------|------------|---------|------------|-------|--------|----------------|
| 0.061 | 1 | -2.287 | 0.011 | 0.011 | 1.207 | 0.035 |
| 0.245 | 4 | -1.655 | 0.048 | 0.037 | 4.122 | 0.003 |
| 0.429 | 14 | -1.023 | 0.153 | 0.104 | 11.348 | 0.619 |
| 0.612 | 19 | -0.391 | 0.347 | 0.194 | 21.220 | 0.232 |
| 0.796 | 29 | 0.240 | 0.595 | 0.247 | 26.959 | 0.154 |
| 0.979 | 19 | 0.872 | 0.808 | 0.213 | 23.273 | 0.784 |
| 1.163 | 14 | 1.504 | 0.933 | 0.125 | 13.651 | 0.008 |
| 1.347 | 9 | 2.138 | 0.983 | 0.050 | 5.445 | 2.319 |
| SUMATORIA | | | | | | 4.159 |

Para este caso, la $\chi^2_{\alpha, L}$ específica fue $\chi^2_{0.05,7} = 11.071$. Como puede observarse el valor de $\chi^2_{0.05,7} > \chi^2_{exp}$, de forma que no hay evidencia estadística para rechazar la hipótesis nula, lo que se traduce en que los datos no difieren estadísticamente de una distribución de tipo normal.

Tabla 19. Prueba de χ^2 para la actividad de SOD

| Clase | Frecuencia | Valor Z | PL_{inf} | p_i | E_i | χ^2_{exp} |
|-----------|------------|---------|------------|-------|--------|----------------|
| 0.292 | 9.000 | -1.329 | 0.092 | 0.092 | 5.980 | 1.525 |
| 0.330 | 6.000 | -0.872 | 0.191 | 0.100 | 6.475 | 0.035 |
| 0.367 | 5.000 | -0.428 | 0.334 | 0.143 | 9.294 | 1.984 |
| 0.405 | 9.000 | 0.029 | 0.512 | 0.177 | 11.517 | 0.550 |
| 0.443 | 12.000 | 0.486 | 0.687 | 0.175 | 11.367 | 0.035 |
| 0.480 | 13.000 | 0.931 | 0.824 | 0.138 | 8.938 | 1.847 |
| 0.520 | 11.000 | 1.412 | 0.921 | 0.097 | 6.302 | 3.503 |
| SUMATORIA | | | | | | 9.333 |

La n tomada para el análisis de los datos de la muestra obtenida de la actividad de SOD fue de 65, $n = 32$ de hombres y $n = 33$ de mujeres sin valores atípicos identificados, el transformador empleado para la normalización de los datos fue a través del operador inverso de la raíz cuadrada. Debe señalarse que se realizó la corrección para los intervalos con una frecuencia teórica esperada menor a 5.

Para este caso, la $\chi^2_{\alpha, L}$ específica fue $\chi^2_{0.05,4} = 9.488$. Como puede observarse el valor de $\chi^2_{0.05,7} > \chi^2_{exp}$, de forma que no hay evidencia estadística para rechazar la hipótesis nula, lo que se traduce en que los datos no difieren estadísticamente de una distribución de tipo normal.

Tabla 20. Prueba de χ^2 para la concentración de CAT.

| Clase | Frecuencia | Valor Z | PL_{inf} | p_i | E_i | χ^2_{exp} |
|-------|------------|---------|------------|-------|--------|----------------|
| 1.177 | 3.000 | -1.873 | 0.031 | 0.031 | 5.808 | 1.357 |
| 2.055 | 20.000 | -1.112 | 0.133 | 0.102 | 19.462 | 0.015 |
| 2.933 | 56.000 | -0.352 | 0.362 | 0.229 | 43.581 | 3.539 |
| 3.811 | 44.000 | 0.408 | 0.658 | 0.296 | 56.243 | 2.665 |
| 4.689 | 41.000 | 1.168 | 0.879 | 0.220 | 41.850 | 0.017 |

| | | | | | | |
|-----------|--------|-------|-------|-------|--------|-------|
| 5.567 | 20.000 | 1.928 | 0.973 | 0.094 | 17.946 | 0.235 |
| 6.447 | 6.000 | 2.691 | 0.996 | 0.023 | 4.433 | 0.554 |
| SUMATORIA | | | | | | 8.383 |

La n tomada para el análisis de los datos de la muestra obtenida de la actividad de CAT fue de 190, $n = 92$ de hombres y $n = 109$ de mujeres con 11 valores atípicos identificados, el transformador empleado para la normalización de los datos fue a través del operador de raíz cuadrada.

Para este caso, la $\chi^2_{\alpha, L}$ específica fue $\chi^2_{0.05, 4} = 9.488$. Como puede observarse el valor de $\chi^2_{0.05, 4} > \chi^2_{exp}$, de forma que no hay evidencia estadística para rechazar la hipótesis nula, lo que se traduce en que los datos no difieren estadísticamente de una distribución de tipo normal.

Tabla 21. Prueba de χ^2 para CRFP.

| Clase | Frecuencia | Valor Z | PL_{inf} | p_i | E_i | χ^2_{exp} |
|-----------|------------|---------|------------|-------|--------|----------------|
| 7.750 | 1.000 | -1.835 | 0.033 | 0.033 | 3.823 | 2.085 |
| 73.464 | 16.000 | -1.095 | 0.137 | 0.103 | 11.897 | 1.415 |
| 139.178 | 28.000 | -0.355 | 0.361 | 0.224 | 25.808 | 0.186 |
| 204.892 | 30.000 | 0.384 | 0.650 | 0.289 | 33.179 | 0.305 |
| 270.606 | 26.000 | 1.124 | 0.870 | 0.220 | 25.287 | 0.020 |
| 336.320 | 11.000 | 1.864 | 0.969 | 0.099 | 11.421 | 0.016 |
| 402.034 | 1.000 | 2.604 | 0.995 | 0.027 | 3.054 | 1.381 |
| 467.780 | 2.000 | 3.344 | 1.000 | 0.004 | 0.483 | 4.769 |
| SUMATORIA | | | | | | 10.177 |

La n tomada para el análisis de los datos de la muestra obtenida de la actividad de CRFP fue de 115, $n = 63$ de hombres y $n = 52$ de mujeres, sin valores atípicos identificados, no fue necesario el uso de un transformador para la normalización de los datos.

Para este caso, la $\chi^2_{\alpha, L}$ específica fue $\chi^2_{0.05, 5} = 11.071$. Como puede observarse el valor de $\chi^2_{0.05, 5} > \chi^2_{exp}$, de forma que no hay evidencia estadística para rechazar la hipótesis nula, lo que se traduce en que los datos no difieren estadísticamente de una distribución de tipo normal.

Tabla 22. Prueba de χ^2 para la concentración de ERO's.

| Clase | Frecuencia | Valor Z | PL_{inf} | p_i | E_i | χ_{exp}^2 |
|-----------|------------|---------|------------|-------|--------|----------------|
| 0.0455 | 1 | -1.731 | 0.042 | 0.042 | 4.086 | 2.331 |
| 1.1655 | 15 | -1.028 | 0.152 | 0.110 | 10.811 | 1.623 |
| 2.2855 | 21 | -0.324 | 0.373 | 0.221 | 21.642 | 0.019 |
| 3.4055 | 27 | 0.379 | 0.648 | 0.275 | 26.939 | 0.000 |
| 4.5255 | 24 | 1.083 | 0.861 | 0.213 | 20.855 | 0.474 |
| 5.6455 | 6 | 1.786 | 0.963 | 0.102 | 10.039 | 1.625 |
| 6.7655 | 2 | 2.490 | 0.994 | 0.031 | 3.003 | 0.335 |
| 7.8855 | 2 | 3.193 | 0.999 | 0.006 | 0.557 | 3.733 |
| SUMATORIA | | | | | | 10.140 |

La n tomada para el análisis de los datos de la muestra obtenida de la concentración de ERO's fue de 98, $n = 61$ de hombres y $n = 37$ de mujeres, sin valores atípicos identificados y de igual forma no fue necesario el uso de un transformador para la normalización de los datos.

Para este caso, la $\chi_{\alpha, L}^2$ específica fue $\chi_{0.05, 5}^2 = 11.071$. Como puede observarse el valor de $\chi_{0.05, 5}^2 > \chi_{exp}^2$, de forma que no hay evidencia estadística para rechazar la hipótesis nula, lo que se traduce en que los datos no difieren estadísticamente de una distribución de tipo normal.

Tabla 23. Prueba de χ^2 para la concentración de glutatión total.

| Clase | Frecuencia | Valor Z | PL_{inf} | p_i | E_i | χ_{exp}^2 |
|-----------|------------|---------|------------|-------|--------|----------------|
| 3.474 | 5.000 | -1.844 | 0.033 | 0.033 | 3.069 | 1.215 |
| 4.469 | 6.000 | -1.257 | 0.104 | 0.072 | 6.683 | 0.070 |
| 5.463 | 14.000 | -0.669 | 0.252 | 0.147 | 13.696 | 0.007 |
| 6.458 | 10.000 | -0.082 | 0.467 | 0.216 | 20.066 | 5.050 |
| 7.452 | 30.000 | 0.506 | 0.694 | 0.226 | 21.024 | 3.833 |
| 8.447 | 18.000 | 1.093 | 0.863 | 0.169 | 15.750 | 0.321 |
| 9.441 | 8.000 | 1.681 | 0.954 | 0.091 | 8.437 | 0.023 |
| 10.450 | 2.000 | 2.277 | 0.989 | 0.035 | 3.255 | 0.484 |
| SUMATORIA | | | | | | 11.002 |

La n tomada para el análisis de los datos de la muestra obtenida de la concentración de GSH-T fue de 93, $n = 38$ de hombres y $n = 56$ de mujeres, con 1 valor atípico identificado. No fue necesario el uso de un transformador para la normalización de los datos.

Para este caso, la $\chi^2_{\alpha, PL}$ específica fue $\chi^2_{0.05, 6} = 12.592$. Como puede observarse el valor de $\chi^2_{0.05, 6} > \chi^2_{exp}$, de forma que no hay evidencia estadística para rechazar la hipótesis nula, lo que se traduce en que los datos no difieren estadísticamente de una distribución de tipo normal.

Tabla 24. Prueba de para la concentración de GSH.

| Clase | Frecuencia | Valor Z | PL_{inf} | p_i | E_i | χ^2_{exp} |
|-----------|------------|---------|------------|-------|--------|----------------|
| 2.458 | 1.000 | -2.436 | 0.007 | 0.007 | 0.690 | 0.139 |
| 3.451 | 3.000 | -1.848 | 0.032 | 0.025 | 2.311 | 0.205 |
| 4.444 | 7.000 | -1.261 | 0.104 | 0.071 | 6.644 | 0.019 |
| 5.436 | 14.000 | -0.673 | 0.251 | 0.147 | 13.651 | 0.009 |
| 6.429 | 10.000 | -0.085 | 0.466 | 0.216 | 20.047 | 5.035 |
| 7.422 | 30.000 | 0.503 | 0.692 | 0.226 | 21.046 | 3.810 |
| 8.415 | 18.000 | 1.090 | 0.862 | 0.170 | 15.796 | 0.308 |
| 9.408 | 8.000 | 1.678 | 0.953 | 0.091 | 8.474 | 0.027 |
| 10.401 | 2.000 | 2.266 | 0.988 | 0.035 | 3.249 | 0.480 |
| SUMATORIA | | | | | | 10.032 |

La n tomada para el análisis de los datos de la muestra obtenida de la concentración de GSH-T fue de 93, $n = 39$ de hombres y $n = 55$ de mujeres, con 1 valor atípico identificado. No fue necesario el uso de un transformador para la normalización de los datos.

Para este caso, la $\chi^2_{\alpha, PL}$ específica fue $\chi^2_{0.05, 6} = 12.592$. Como puede observarse el valor de $\chi^2_{0.05, 6} > \chi^2_{exp}$, de forma que no hay evidencia estadística para rechazar la hipótesis nula, lo que se traduce en que los datos no difieren estadísticamente de una distribución de tipo normal. Sin embargo, es importante mencionar que no se logró llegar a una χ^2_{exp} favorable una vez que se realizaba la corrección para los intervalos con una frecuencia teórica menor a 5.

Tabla 25. Prueba de χ^2 para la concentración de GSSG

| Clase | Frecuencia | Valor Z | PL_{inf} | p_i | E_i | χ^2_{exp} |
|--------|------------|---------|------------|--------|-------|----------------|
| 0.0721 | 3 | -1.4353 | 0.0756 | 0.0756 | 6.426 | 1.827 |

| | | | | | | |
|-----------|----|---------|--------|--------|--------|-------|
| 0.1025 | 13 | -0.8415 | 0.2000 | 0.1244 | 10.576 | 0.555 |
| 0.1330 | 21 | -0.2477 | 0.4022 | 0.2021 | 17.182 | 0.848 |
| 0.1634 | 23 | 0.3461 | 0.6354 | 0.2332 | 19.821 | 0.510 |
| 0.1939 | 11 | 0.9399 | 0.8264 | 0.1910 | 16.235 | 1.688 |
| 0.2243 | 6 | 1.5337 | 0.9374 | 0.1111 | 9.442 | 1.255 |
| 0.2854 | 8 | 2.7242 | 0.9968 | 0.0593 | 5.043 | 1.733 |
| SUMATORIA | | | | | | 8.417 |

La n tomada para el análisis de los datos de la muestra obtenida de la concentración de GSSG fue de 85, $n = 35$ de hombres y $n = 51$ de mujeres, con 1 valor atípico identificado. Para la normalización de los datos de los datos se empleó el transformador de raíz cuadrada.

Para este caso, la $\chi^2_{\alpha, L}$ específica fue $\chi^2_{0.05, 4} = 9.488$. Como puede observarse el valor de $\chi^2_{0.05, 4} > \chi^2_{exp}$, de forma que no hay evidencia estadística para rechazar la hipótesis nula, lo que se traduce en que los datos no difieren estadísticamente de una distribución de tipo normal.

Tabla 26. Prueba de χ^2 para la actividad de GRx.

| Clase | Frecuencia | Valor Z | PL_{inf} | p_i | E_i | χ^2_{exp} |
|-----------|------------|---------|------------|-------|--------|----------------|
| 1.270 | 7 | -1.511 | 0.065 | 0.065 | 5.915 | 0.199 |
| 1.965 | 7 | -1.147 | 0.126 | 0.060 | 5.487 | 0.417 |
| 2.660 | 9 | -0.783 | 0.217 | 0.091 | 8.292 | 0.060 |
| 3.355 | 14 | -0.419 | 0.338 | 0.121 | 10.993 | 0.822 |
| 4.050 | 13 | -0.055 | 0.478 | 0.140 | 12.783 | 0.004 |
| 4.745 | 7 | 0.309 | 0.621 | 0.143 | 13.039 | 2.797 |
| 5.440 | 8 | 0.673 | 0.750 | 0.128 | 11.666 | 1.152 |
| 6.135 | 9 | 1.037 | 0.850 | 0.101 | 9.155 | 0.003 |
| 6.830 | 7 | 1.401 | 0.919 | 0.069 | 6.302 | 0.077 |
| 8.220 | 10 | 2.129 | 0.983 | 0.064 | 5.821 | 3.000 |
| SUMATORIA | | | | | | 8.532 |

La n tomada para el análisis de los datos de la muestra obtenida de la concentración de GRx fue de 91, $n = 42$ de hombres y $n = 52$ de mujeres, con 3 valores atípicos identificados. Para la normalización de los datos de los datos se empleó el transformador de raíz cuadrada.

Para este caso, la $\chi^2_{\alpha, L}$ específica fue $\chi^2_{0.05, 7} = 14.067$. Como puede observarse el valor de $\chi^2_{0.05, 7} > \chi^2_{exp}$, de forma que no hay evidencia estadística para rechazar la hipótesis nula, lo

que se traduce en que los datos no difieren estadísticamente de una distribución de tipo normal.

Tabla 27. Prueba de χ^2 para la actividad de GSTx.

| Clase | Frecuencia | Valor Z | PL_{inf} | p_i | E_i | χ_{exp}^2 |
|-----------|------------|---------|------------|-------|--------|----------------|
| 5.77 | 6 | -1.51 | 0.065 | 0.065 | 5.915 | 0.001 |
| 6.16 | 12 | -1.02 | 0.153 | 0.087 | 7.943 | 2.072 |
| 6.55 | 12 | -0.54 | 0.295 | 0.142 | 12.941 | 0.068 |
| 6.95 | 11 | -0.04 | 0.484 | 0.189 | 17.180 | 2.223 |
| 7.34 | 16 | 0.44 | 0.672 | 0.188 | 17.117 | 0.073 |
| 7.73 | 16 | 0.93 | 0.824 | 0.152 | 13.848 | 0.335 |
| 8.53 | 18 | 1.93 | 0.973 | 0.149 | 13.560 | 1.454 |
| SUMATORIA | | | | | | 6.226 |

La n tomada para el análisis de los datos de la muestra obtenida de la actividad de GSTx fue de 91, $n = 42$ de hombres y $n = 50$ de mujeres, con 1 valor atípico identificado. Para la normalización de los datos de los datos se empleó el transformador de logaritmo natural.

Para este caso, la $\chi_{\alpha, L}^2$ específica fue $\chi_{0.05, 4}^2 = 9.488$. Como puede observarse el valor de $\chi_{0.05, 4}^2 > \chi_{exp}^2$, de forma que no hay evidencia estadística para rechazar la hipótesis nula, lo que se traduce en que los datos no difieren estadísticamente de una distribución de tipo normal.

Tabla 28. Prueba de χ^2 para la actividad de GPx.

| Clase | Frecuencia | Valor Z | PL_{inf} | p_i | E_i | χ_{exp}^2 |
|-----------|------------|---------|------------|--------|-------|----------------|
| 2.48 | 4 | -1.341 | 0.0899 | 0.0899 | 5.75 | 0.534 |
| 3.11 | 12 | -0.555 | 0.2893 | 0.1994 | 12.76 | 0.045 |
| 3.75 | 26 | 0.243 | 0.5960 | 0.3067 | 19.63 | 2.070 |
| 4.39 | 17 | 1.041 | 0.8511 | 0.2552 | 16.33 | 0.027 |
| 5.67 | 5 | 2.638 | 0.9958 | 0.1447 | 9.26 | 1.961 |
| SUMATORIA | | | | | | 4.638 |

La n tomada para el análisis de los datos de la muestra obtenida de la actividad de GPx fue de 64, $n = 28$ de hombres y $n = 39$ de mujeres, con 3 valores atípicos identificados. Para la normalización de los datos de los datos se empleó el transformador de raíz cuadrada.

Para este caso, la $\chi^2_{\alpha, \circ L}$ específica fue $\chi^2_{0.05, 2} = 5.991$. Como puede observarse el valor de $\chi^2_{0.05, 2} > \chi^2_{exp}$, de forma que no hay evidencia estadística para rechazar la hipótesis nula, lo que se traduce en que los datos no difieren estadísticamente de una distribución de tipo normal.

Tabla 29. Valores obtenidos de la prueba de χ^2 .

| Analito | <i>n</i> (inicial) | <i>n</i> (depurada) | Transformador | °GL | χ^2_{exp} | $\chi^2_{\alpha, \circ L}$ | Decisión respecto a H_0 |
|--------------------------|-----------------------|------------------------|---------------|-----|----------------|----------------------------|---------------------------------|
| <i>cLT</i> | 223 | 221 | -- | 13 | 19.863 | 22.362 | Se mantiene |
| <i>cERO's</i> | 98 | 98 | -- | 5 | 10.140 | 11.071 | Se mantiene |
| <i>CRFP</i> | 117 | 115 | -- | 5 | 10.177 | 11.071 | Se mantiene |
| <i>cGSH-T</i> | 94 | 93 | -- | 6 | 11.000 | 12.592 | Se mantiene |
| <i>cGSH*</i> | 94 | 93 | -- | 6 | 10.032 | 12.592 | Se mantiene |
| <i>cMDA</i> | 211 | 200 | Raíz cuadrada | 7 | 8.502 | 14.067 | Se mantiene |
| <i>c4-HNE</i> | 201 | 199 | Raíz cuadrada | 13 | 18.426 | 22.362 | Se mantiene |
| <i>cNitritos (M)</i> | 111 | 109 | Raíz cuadrada | 5 | 4.159 | 11.071 | Se mantiene |
| <i>aCAT</i> | 201 | 190 | Raíz cuadrada | 4 | 8.383 | 9.488 | Se mantiene |
| <i>cGSSG</i> | 86 | 85 | Raíz cuadrada | 4 | 8.417 | 9.488 | Se mantiene |
| <i>aGRx</i> | 94 | 91 | Raíz cuadrada | 7 | 8.532 | 14.067 | Se mantiene |

| | | | | | | | |
|--------------|----|----|--------------------------|---|-------|-------|-------------|
| <i>aSOD</i> | 65 | 65 | Inverso de raíz cuadrada | 4 | 9.478 | 9.488 | Se mantiene |
| <i>aGSTx</i> | 92 | 91 | Logaritmo natural | 4 | 6.226 | 9.488 | Se mantiene |
| <i>aGPx</i> | 67 | 64 | Raíz cuadrada | 2 | 4.638 | 5.991 | Se mantiene |

* Sin corrección para la frecuencia esperada <5.

VI. Prueba de Kolmogórov-Smirnov

Para la prueba de Kolmogórov-Smirnov se retomó el procedimiento descrito por Llinás Solano, H. (2017), a través de esta prueba se busca probar que la función F es la función de distribución acumulada en una población de la que se ha tomado una determinada muestra aleatoria.

En un primer momento se deben ordenar las observaciones obtenidas a partir de la muestra aleatoria de tamaño n , y se definirá la función de distribución acumulada muestral $F_n(x)$ como la proporción del número de valores de la muestra que son menores o iguales a x ; sea $x_i, x_{ii}...$ las observaciones ordenadas obtenidas de la muestra, en términos operacionales sería:

$$F_n(x) = \frac{(\text{Número de observaciones de la muestra} \leq x)}{n}$$

De forma que, $F(x)$ sería la distribución teórica, completamente especificada, propuesta bajo la hipótesis nula, para el caso de la prueba de bondad de ajuste, la función de $F(x)$ sería una distribución teórica normal. Con esto establecido, la estadística de Kolmogórov-Smirnov se define como:

$$D_n = \max_x |F_n(x) - F(x)|$$

Esta distribución esta tabulada y es conocida. De forma que D_n es la diferencia máxima entre la función de distribución acumulada muestral $F_n(x)$ y la función de distribución acumulada hipotética $F(x)$. Ahora D_n tenderá a ser pequeño cuando H_o es cierta, pero tendrá a ser grande si la verdadera función de distribución acumulada es distinta de $F(x)$. Para n y α dados, se halla c tal que:

$$P\left(D_n \geq \frac{c}{\sqrt{n}}\right) = \alpha$$

De la misma manera, la región crítica de la prueba es:

$$D_n \geq \frac{c}{\sqrt{n}}$$

Aterrizando todos estos conceptos de una manera práctica, las hipótesis para una prueba serían:

H_0 : La población es normal con parámetros μ y σ^2

H_1 : La población no es normal con parámetros μ y σ^2

Dada X , siendo una variable aleatoria continua y partiendo de que se desconocen los parámetros poblacionales de μ y σ^2 , se utilizan sus aproximados muestrales que son \bar{x} y s . De forma que cuando H_0 es verdadera, F será la función de distribución acumulada normal y estará dada por:

$$F(x) = P\left(X \leq \frac{x - \mu}{\sigma}\right)$$

Utilizando una tabla de distribución normal, se calcula el valor de P . De esta forma se obtienen todos los valores de $F(x)$ para todos los valores de x presentes en la muestra. Análogamente y como ya se detalló anteriormente, para hallar el valor de $F_n(x)$ se aplicaría:

$$F_n(x) = \frac{(\text{Número de observaciones de la muestra} \leq x)}{n}$$

De esta forma se obtendría los valores para la función $F_n(x)$ para todos los valores x dados en la muestra. Lo siguiente sería el ordenar y analizar estos datos obtenidos, para ello se recomienda el emplear una tabla como se muestra a continuación para facilitar el proceso.

| x | $F_n(x)$ | $F(x)$ | $ F_n(x)-F(x) $ |
|-----|----------|--------|-----------------|
|-----|----------|--------|-----------------|

De esta forma se analiza la máxima desviación entre la función $F_n(x)$ y $F(x)$ y a partir de una tabla de valores D se obtiene el valor crítico de acuerdo con la n de la muestra, siendo que si $D_{crítica} > D_n$ no se tendrá evidencia estadística para rechazar la hipótesis nula.

VII. Prueba de Anderson-Darling

El estadístico de bondad de ajuste de Anderson-Darling (AD) mide el área entre una distribución normal (una línea ajustada) y la función de distribución empírica resultante de

los datos obtenidos de la muestra aleatoria (Flores Tapia C. E. y Flores Cevallos K.L., 2021). Básicamente esta prueba compara las dos funciones, la función de la distribución acumulada empírica de los resultados de la muestra con la distribución esperada si los datos fueran normales, de manera que si al obtener los resultados, la diferencia excede de un valor crítico fijado a nivel de significancia específico se rechazará la hipótesis nula de normalidad. Es considerada como una modificación de la prueba de KS, con la diferencia que al elevarse al cuadrado las diferencias da más peso a las colas que la prueba de KS estándar. Esta prueba pertenece a una clase de medidas de discrepancia, conocidas como estadística cuadráticas y se utiliza para probar si una muestra aleatoria de datos proviene de una distribución continua F_0 con vector de parámetros θ . El estadístico de la prueba es:

$$Q_n = n \int_{-\infty}^{\infty} (F_n(x) - F_0(x; \theta))^2 \psi(x) dF_0(x; \theta)$$

Donde F_n es la función de distribución empírica de la muestra aleatoria x_1, \dots, x_n y ψ es una función que pondera a las discrepancias cuadradas. La estadística de Anderson-Darling se obtiene con $\psi(x) = \{[F_0(x; \theta)][1 - F_0(x; \theta)]\}^{-1}$, de esta forma el estadístico de prueba de Anderson-Darling esta dado por:

$$\begin{aligned} A &= -n - \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (2i - 1) [\log F_0(x_{(i)}; \theta) + \log (1 - F_0(x_{n+1-i}; \theta))] \\ &= -n - \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n [(2i - 1) \log(Z_i) + (2n + 1 - 2i) \log(1 - Z_i)] \end{aligned}$$

Donde $Z_i = F_0(x_{(i)}; \theta)$. Es importante destacar que cuando la distribución F_0 está completamente especificada, es decir, no se debe de estimar ningún parámetro, la distribución de A^2 no depende de F_0 aunque si depende de n . Sin embargo, cuando se debe de estimar algún parámetro, la distribución aparte de depender de n también depende de la estimación del parámetro (Lorenzo Landa, G., 2011).

Para realizar esta prueba primero se crea la distribución acumulativa de los datos obtenidos de la muestra, y la segunda es una distribución acumulativa normal para comparar las dos distribuciones acumulativas y de esta forma poder estimar la mayor diferencia numérica absoluta entre ambas (Flores Tapia C. E. y Flores Cevallos K.L., 2021).

VIII Intervalos de confianza

Tabla 30. Resultados de media +/- 1.96*s de *cLT*, *cERO's*, *CRFP* y *cMDA*.

| <i>Analito</i> | $\bar{X} + 1.96*s$ | $\bar{X} - 1.96* s$ |
|--------------------|--------------------|---------------------|
| <i>cLT</i> | 3.147 | 0.0004 |
| <i>cERO's</i> | 5.922 | -0.318 |
| <i>CRFP</i> | 344.854 | -3.345 |
| <i>cMDA (raíz)</i> | 0.857 | 0.101 |

En seguida de los analitos ya descritos se calculó de igual forma los límites del 95% de los datos, pero en esta ocasión para los datos donde al transformarlos se obtuvo un valor de $p > 0.05$ para las pruebas de χ^2 y KS y con $p \leq 0.05$ para la prueba de AD. Los resultados se muestran en la tabla 11. Posteriormente se calcularon los límites del 95% de los datos, con los resultados que se muestran en la tabla 9, es decir con las transformaciones donde se obtuvo $p > 0.05$ para la prueba de AD, los resultados se muestran en la tabla 12.

Tabla 31. Límites del 95% de los datos transformados con $p > 0.05$ para las pruebas χ^2 y KS con $p \leq 0.05$ para AD.

| <i>Analito</i> | $\bar{X} + 1.96*s$ | $\bar{X} - 1.96* s$ |
|----------------------------|--------------------|---------------------|
| <i>cGSH-T</i> | 9.914 | 3.278 |
| <i>cGSH</i> | 9.884 | 3.262 |
| <i>c4-HNE (raíz)</i> | 1.877 | 0.318 |
| <i>aCAT (raíz)</i> | 5.603 | 1.076 |
| <i>cGSSG (raíz)</i> | 0.246 | 0.045 |
| <i>aGRx (raíz)</i> | 7.897 | 0.413 |
| <i>aGPx (raíz)</i> | 5.127 | 1.984 |
| <i>aGSTx (LN)</i> | 8.556 | 5.409 |
| <i>aSOD (inverso raíz)</i> | 0.566 | 0.240 |

Tabla 32. Límites del 95% de los datos transformados con $p > 0.05$ para la prueba de AD.

| Análito | $\bar{X} + 1.96*s$ | $\bar{X} - 1.96* s$ |
|--------------------------|--------------------|---------------------|
| c4-HNE (raíz*) | 1.807 | 0.625 |
| cGSSG (LN) | -2.545 | -5.413 |
| aGPx (LN) | 3.319 | 1.713 |
| cGSH-T (cuadrado) | 89.058 | 3.623 |
| cGSH (cuadrado) | 88.493 | 3.566 |

Una vez calculados los límites del 95% de los datos para todos los análisis con las diversas transformaciones se calculan los intervalos de confianza al 90% para cada uno de los límites obtenidos mediante la fórmula de:

$$(\text{Límite}) \pm 2.81 * \frac{S_x}{\sqrt{n}}$$

Los resultados se muestran en la tabla siguiente:

Tabla 33. Intervalos de confianza para los límites del 95 % de los datos.

| Análito | IC de límite superior | IC de límite inferior |
|--------------------------|------------------------------|------------------------------|
| c-LT | 2.995 | -0.1513 |
| | 3.298 | 0.1521 |
| c-ERO's | 1.140 | -0.770 |
| | 6.374 | 0.133 |
| CFRP | 321.578 | -26.62 |
| | 368.129 | 19.94 |
| cMDA (raíz) | 0.819 | 0.063 |
| | 0.895 | 0.139 |
| cGSH-T | 9.42 | 2.79 |
| | 10.41 | 3.77 |
| cGSH-T (cuadrado) | 82.71 | -2.73 |
| | 95.41 | 9.97 |
| cGSH | 9.39 | 2.77 |
| | 10.38 | 3.75 |

| | | |
|----------------------------|--------|--------|
| cGSH (cuadrado) | 82.180 | -2.747 |
| | 94.806 | 9.879 |
| c4-HNE (raíz) | 1.798 | 0.239 |
| | 1.957 | 0.398 |
| c4-HNE (raíz*) | 1.741 | 0.560 |
| | 1.872 | 0.690 |
| aCAT (raíz) | 5.368 | 0.840 |
| | 5.839 | 1.311 |
| cGSSG (raíz) | 0.231 | 0.030 |
| | 0.262 | 0.061 |
| cGSSG (LN) | -2.768 | -5.636 |
| | -2.322 | -5.190 |
| aGRx (raíz) | 7.335 | -0.149 |
| | 8.459 | 0.975 |
| aGPx (raíz) | 4.845 | 1.702 |
| | 5.408 | 2.266 |
| aGPx (LN) | 3.174 | 1.568 |
| | 3.464 | 1.858 |
| aGSTx (LN) | 8.320 | 5.173 |
| | 8.793 | 5.646 |
| aSOD (inverso raíz) | 0.537 | 0.211 |
| | 0.595 | 0.269 |

A continuación, se obtuvo el promedio del IC calculado para cada uno de los analitos, los resultados se muestran condensados en la tabla 14.

Tabla 34. Promedio de los intervalos de confianza para los límites del 95 % de los datos.

| Analito | \bar{X} IC de límite superior | \bar{X} IC de límite inferior |
|----------------|---------------------------------|---------------------------------|
| c-LT | 3.147 | 0.000 |
| c-ERO's | 3.757 | -0.318 |

| | | |
|----------------------------|---------|--------|
| CFRP | 344.854 | -3.342 |
| cMDA (raíz) | 0.857 | 0.101 |
| cGSH-T | 9.914 | 3.278 |
| cGSH-T (cuadrado) | 89.058 | 3.623 |
| cGSH | 9.884 | 3.262 |
| cGSH (cuadrado) | 88.943 | 3.556 |
| c4-HNE (raíz) | 1.877 | 0.318 |
| c4-HNE (raíz*) | 1.807 | 0.625 |
| aCAT (raíz) | 5.603 | 1.076 |
| cGSSG (raíz) | 0.246 | 0.045 |
| cGSSG (LN) | -2.545 | -5.413 |
| aGRx (raíz) | 7.897 | 0.413 |
| aGPx (raíz) | 5.127 | 1.984 |
| aGPx (LN) | 3.319 | 1.713 |
| aGSTx (LN) | 8.556 | 5.409 |
| aSOD (inverso raíz) | 0.566 | 0.240 |

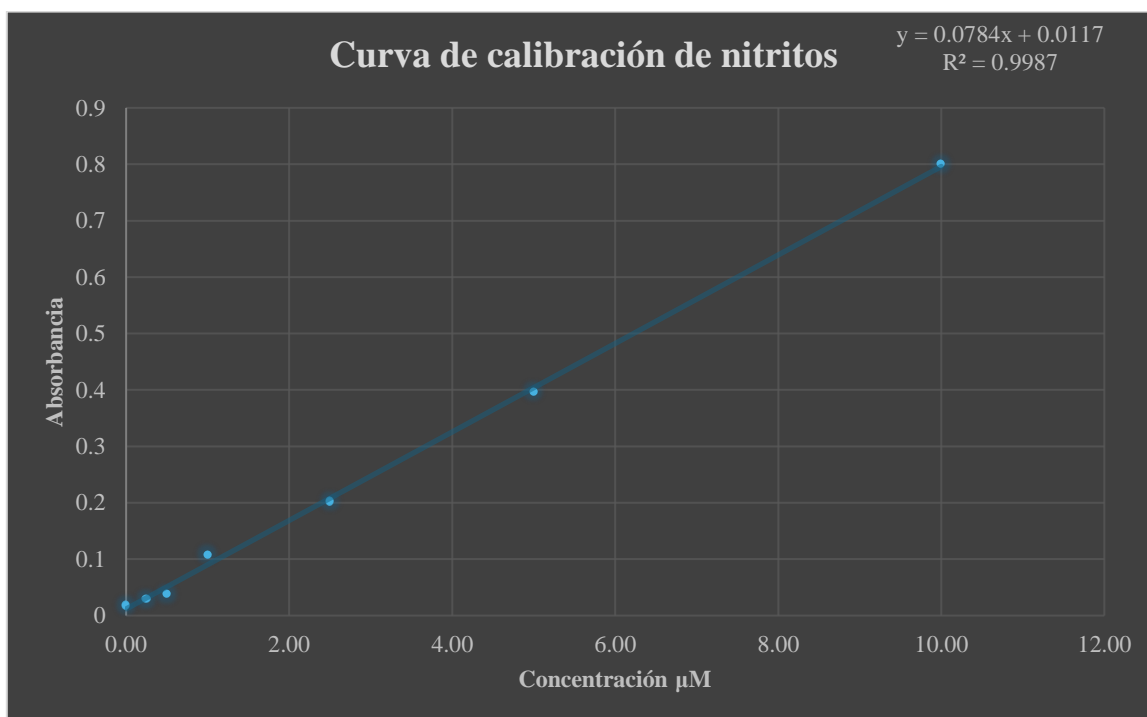
Para el caso de los datos como cLT, cERO's y CRFP, donde no se necesitó de un transformador, estos serían los LBR directamente, dado que no es necesario un proceso de retrotransformación. Sin embargo, para el resto de los datos fue necesario realizar este proceso a través del operador recíproco inverso de acuerdo con el operador empleado para la transformación. A continuación, se muestran los valores de referencia para cada uno de los analitos.

IX. Curvas de calibración

A continuación, se muestran las curvas de calibración empleadas en el presente trabajo.

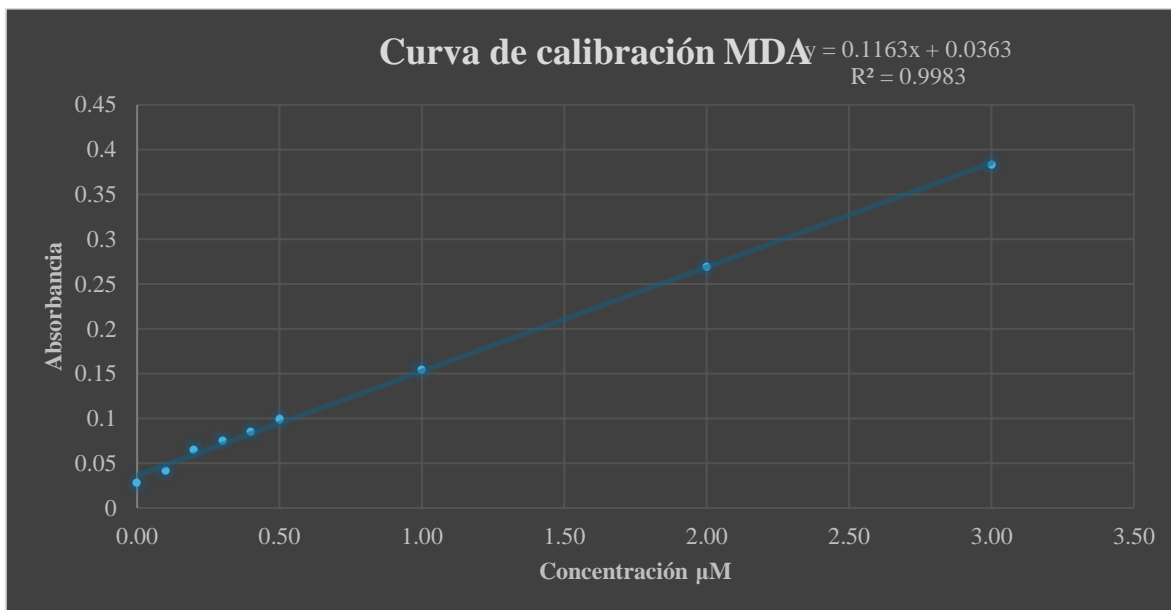
Curva de calibración de nitritos

| Concentración de nitritos (μM) | Absorbancia |
|---|-------------|
| 0.00 | 0.018 |
| 0.25 | 0.029 |
| 0.50 | 0.038 |
| 1.00 | 0.108 |
| 2.50 | 0.202 |
| 5.00 | 0.397 |
| 10.00 | 0.800 |



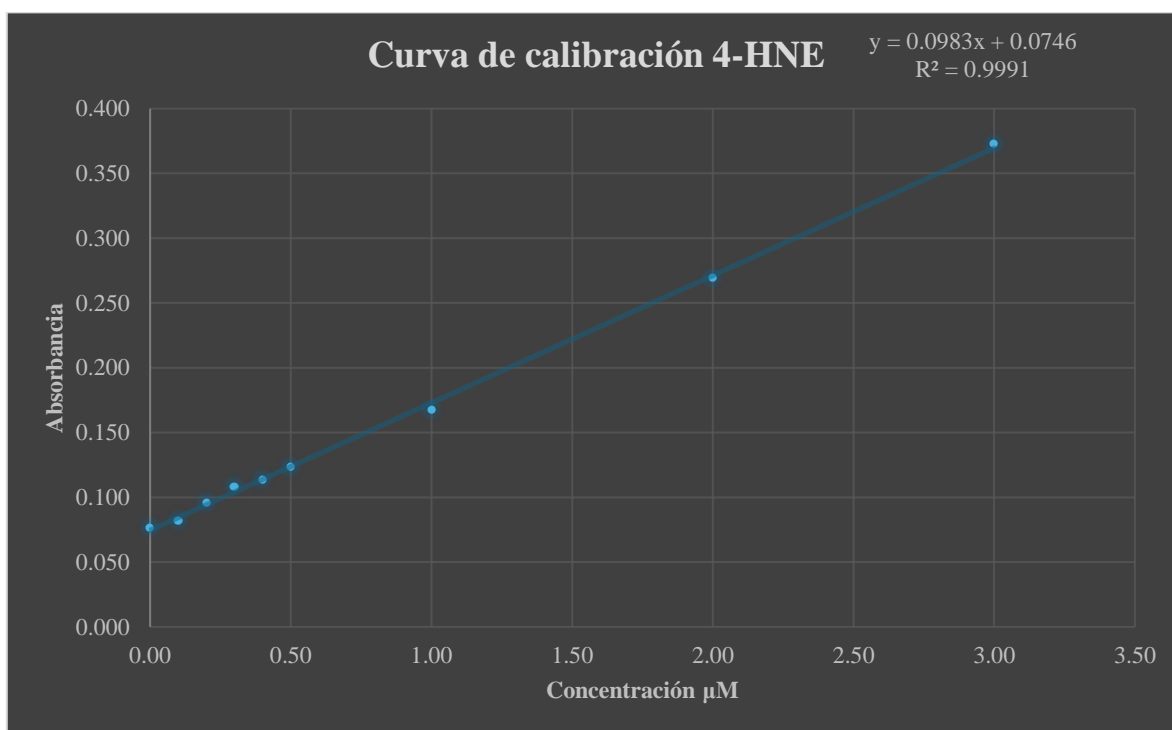
Curva de calibración de MDA

| Concentración de MDA (μM) | Absorbancia |
|--|-------------|
| 0.00 | 0.026 |
| 0.10 | 0.043 |
| 0.20 | 0.065 |
| 0.30 | 0.079 |
| 0.40 | 0.090 |
| 0.50 | 0.106 |
| 1.00 | 0.153 |
| 2.00 | 0.276 |
| 3.00 | 0.397 |



Curva de calibración de 4-HNE

| Concentración de 4-HNE (μM) | Absorbancia |
|--|-------------|
| 0.00 | 0.077 |
| 0.10 | 0.082 |
| 0.20 | 0.096 |
| 0.30 | 0.108 |
| 0.40 | 0.114 |
| 0.50 | 0.124 |
| 1.00 | 0.168 |
| 2.00 | 0.269 |
| 3.00 | 0.373 |



Curva de calibración de CRFP

| Concentración (μmol/L) | Absorbancia |
|------------------------|-------------|
| 0 | 0.125 |
| 50 | 0.136 |
| 100 | 0.149 |
| 150 | 0.167 |
| 200 | 0.182 |
| 300 | 0.199 |
| 400 | 0.254 |
| 500 | 0.290 |
| 600 | 0.301 |
| 700 | 0.334 |
| 800 | 0.400 |
| 900 | 0.407 |
| 1000 | 0.483 |
| 1200 | 0.573 |
| 1400 | 0.617 |
| 1600 | 0.702 |
| 1800 | 0.781 |
| 2000 | 0.932 |

