

Determinación de enzimas antioxidantes y malondialdehído en el suero de niños con IgM positiva para citomegalovirus

Dr. José Gutiérrez-Salinas,* Dra. Leticia Cruz-Tovar*

RESUMEN

Antecedentes: Estudios previos han demostrado que se genera un exceso en la producción de radicales libres derivados del oxígeno característicos de un estrés oxidativo en personas que padecen algún tipo de infección viral. El propósito del presente trabajo es determinar la actividad sérica de enzimas antioxidante y la concentración de malondialdehído como indicadores de estrés oxidativo en niños que presentan en su suero IgM positiva para CMV.

Material y métodos: Se seleccionaron muestras de suero de niños que presentan una concentración sérica de IgM que indican una infección por CMV. Los sueros fueron analizados por métodos espectrofotométricos para determinar la concentración de malondialdehído (MDA) y la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) catalasa y glutatión peroxidasa. Como grupo control se usó el suero de niños aparentemente sanos con IgM negativa para CMV.

Resultados: Nuestros resultados muestran que en los niños que presentan IgM positiva para CMV existe un aumento del 171.18% en los niveles de MDA en comparación al grupo control. Además, la actividad de la SOD disminuye un 21.89% en relación al grupo control mientras que la catalasa y la glutatión peroxidasa presentan, respectivamente un incremento del 18.77% y 63.38% con respecto de grupo control.

Conclusiones: Las modificaciones en las actividades de las enzimas antioxidantes y el incremento en los niveles de MDA sugieren la presencia de un estrés oxidativo en los niños que presentan una infección actual por citomegalovirus, lo que puede contribuir al proceso fisiopatológico de la enfermedad.

Palabras clave: catalasa, citomegalovirus, enzimas antioxidantes, estrés oxidativo, glutatión peroxidasa, infección viral, malondialdehído, niños, superóxido dismutasa.

ABSTRACT

Background: Recent advances revealed that an excess in production of oxygen free radicals that characterizes an oxidative stress is development in subjects with a viral infection. The purpose of the present work is to determine in serum the activity of antioxidant enzymes and malondialdehyde (MDA) concentration as indicators of oxidative stress in children that present in serum an IgM positive for CMV.

Material and methods: Serum samples from childrens that present levels of IgM that indicate an infection for CMV were selected. MDA and antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase and glutathion peroxidase were determined in serum by spectrophotometric methods. Serum samples from childrens with a negative IgM for CMV were used as controls.

Results: Our results show that in childrens with IgM positive for CMV present an increase up to 171.18% in MDA levels has compared with control group. Also, SOD activity decreased 21.89% in regard to control group. While catalase and glutathion peroxidase present an increase of 18.77% and 63.38% respectively, in regard to control subjects.

Conclusions: The changes in antioxidant enzymes and the increase in MDA levels are suggested of an oxidative stress is present in childrens with a cytomegalovirus infection. These oxidative stress can contribute to physiopathologic process of cytomegalovirus infection.

Key words: antioxidant enzymes, catalase, childrens, cytomegalovirus, glutathione peroxidase, malondialdehyde, oxidative stress, superoxide dismutase, viral infection.

* Laboratorio de Bioquímica y Medicina Experimental, División de Investigación Biomédica, Centro Médico Nacional, "20 de Noviembre", ISSSTE.

Correspondencia: Dr. José Gutiérrez-Salinas. Laboratorio de Bioquímica y Medicina Experimental. División de Investigación Biomédica. Centro Médico Nacional "20 de Noviembre", ISSSTE. San Lorenzo No. 502, 2º. piso, colonia Del Valle, C.P. 03100, México D.F. Tel.: 5200-5003, ext. 14603 Fax: 5559-3256. Correo

electrónico: quauhtlicutli@yahoo.com

Recibido: junio, 2008. Aceptado: enero, 2009.

Este artículo debe citarse como: Gutiérrez SJ, Cruz TL. Determinación de enzimas antioxidantes y malondialdehído en el suero de niños con IgM positiva para citomegalovirus. Acta Pediatr Mex 2009;30(2):77-83.

El citomegalovirus (CMV) es el virus más grande de la familia *Herpesviridae* a la que pertenecen los virus Epstein-Barr, herpes simplex, varicela zoster y herpes virus 6, 7 y 8.¹⁻⁵ La forma de transmisión del CMV es por contacto directo con secreciones contaminadas: saliva, lágrimas, orina, sangre, secreciones vaginales y semen. El CMV es un residente habitual en tejidos como el hígado, intestino, páncreas, testículo y tejido nervioso así como en células como los leucocitos y fibroblastos^{1,6,7} lo que ha hecho pensar que esta distribución tan heterogénea del virus en el organismo contribuye de alguna forma a que se presenten períodos de reactivación de la infección.^{1,3,7,8}

La infección primaria por CMV generalmente es asintomática y permanece en forma latente en el organismo por toda la vida del sujeto. El estado latente del virus es responsable de los períodos de reactivación que ocurre sobre todo en sujetos inmunocomprometidos, como los recién nacidos, los niños prematuros, los enfermos de SIDA o quienes han sido sometidos a algún tipo de trasplante de órgano, de tejido o de ambos. Según el período de la vida en que se adquiera la infección, puede ser congénita, perinatal o postnatal.^{1,5-9}

La infección por CMV tiene alta prevalencia en la población general, en la que se ha señalado que existe 70 a 100% de anticuerpos tipo IgG en el suero de adultos lo que significa un contacto previo con el virus.^{2-4,10}

En países desarrollados entre 70 y 85% de la población mayor de 18 años tiene anticuerpos IgG contra CMV. En países latinoamericanos hay entre 65 y 90% de positividad de IgG para CMV en personas de más de 16 años.^{2-4,10-13} Por otro lado, 20 a 40% de menores de 15 años son positivos para IgG anti-CMV. Esta es una infección muy común en adolescentes que es el período cuando se inician las relaciones sexuales.^{2-4,10-13} En niños, 40 a 100% tiene anticuerpos anti-CMV de la clase IgG y en nuestro país llega a 90% en menores de un año.^{2,3,5,10-14}

La primoinfección o la reactivación de la infección por CMV puede pasar inadvertida, por lo que su diagnóstico se basa en la detección en suero de inmunoglobulina IgM específica para CMV; un incremento en la concentración sérica de esta inmunoglobulina indica que existe una infección activa por este virus.¹⁵⁻¹⁸

Diversos estudios han señalado que una infección por bacterias, parásitos o ciertos virus provoca una respuesta metabólica general del huésped. Asimismo, la producción

de radicales libres derivados del oxígeno (RLOx) es un componente importante en la fisiopatología de la enfermedad y un agente causal de daño al organismo.¹⁹⁻²³

Los radicales libres son especies químicas que poseen un electrón desapareado en su orbital más externo (último orbital) lo que los hace altamente reactivos a las moléculas vecinas.²⁴⁻²⁷ En los seres vivos, los radicales libres provienen principalmente del oxígeno (radicales libres derivados del oxígeno); pueden reaccionar con lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos.²⁴⁻²⁶ Por su parte, la célula posee varios tipos de mecanismos antioxidantes que evitan o minimizan el daño provocado por los RLOx; los más importantes son las enzimas antioxidantes,²⁴⁻²⁶ como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y la glutatión peroxidasa las cuales actúan en conjunto para minimizar o contener el daño que los RLOx puedan causar a las macromoléculas.^{27,28}

Cuando en la célula o en el organismo en general aumenta considerablemente la formación de RLOx o cuando disminuyen los mecanismos antioxidantes, se produce un “estrés oxidativo”, que se caracteriza por un daño a los lípidos, una lipoperoxidación, así como alteraciones en la actividad de las enzimas antioxidantes que, si no son controladas, pueden causar daño irreparable al ADN y occasionar la muerte de la célula, del tejido o de ambos.²⁴⁻²⁹

Durante el estrés oxidativo los RLOx reaccionan con los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares lo que genera un metabolito final, el malondialdehído (MDA) que se identifica en el laboratorio e indica la presencia de RLOx, cuya concentración es directamente proporcional al daño en el organismo.³⁰ A su vez, el estrés oxidativo altera la actividad de las principales enzimas antioxidantes por lo cual la determinación de su actividad es una medida de los sistemas antioxidantes defensivos del organismo contra la acción deletérea de estas especies reactivas.²⁴⁻²⁹

Una infección viral puede causar aumento en la producción de RLOx, que puede generar un estrés oxidativo como parte de los mecanismos fisiopatológicos de daño por la infección. Al respecto, ha sido documentado el desarrollo de un estrés oxidativo en infecciones causadas por el virus de la hepatitis C, el VIH, y el retrovirus, entre otros.^{19,20,31} Sin embargo, no se ha documentado este aspecto en niños con infección activa por CMV.

El propósito del presente trabajo es determinar los niveles séricos de malondialdehído así como la actividad

de las enzimas antioxidantes catalasa, glutatión peroxidasa y SOD como indicadores de estrés oxidativo de niños con infección por CMV identificada por sus niveles séricos de IgM.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron siete muestras de suero provenientes del Laboratorio de Virología (adscrito al Laboratorio de Pruebas Especiales), suministradas por diversos servicios del CMN “20 de Noviembre” del ISSSTE recolectados durante enero-abril del 2008.

Las muestras de suero corresponden a igual número de niños con edad promedio de 2.63 ± 2.30 años en un periodo de 0.3 a 5 años. Hubo seis niñas (Cuadro 1). Las muestras de suero fueron elegidas por ser positivas para anticuerpos IgM contra CMV, lo cual define una infección activa por este virus.^{5,15-18} La concentración de IgM se midió por la técnica indirecta de quimioluminiscencia con micropartículas paramagnéticas unidas a antígeno específico; la detección se hizo en un aparato de análisis automático robotizado con detector de destello (“flash”) modelo Liaison (DiaSorin S.p.A., Vercelli, Italia), empleando el equipo de reactivos correspondientes (Liaison CMV-IgM, DiaSorin S.p.A., Vercelli, Italia). La concentración de IgM fue expresada en U/mL tomando los siguientes puntos de corte para definir la presencia de una infección por CMV: <20 U/mL = negativo; 20 a 29 U/mL = dudoso; ≥30 U/mL = positivo (este último valor indica una infección activa por CMV).^{5,15-18} Para efectos de este estudio, todos los sujetos positivos se denominan grupo CMV-positivo.

Un grupo control fue con muestras de suero de siete niños (promedio de edad 3.14 ± 2.28 años, intervalo 1 a 7 años; relación femenino/masculino: 5/2; Cuadro 1) de la Consulta Externa de nuestra institución, cuyos padres autorizaron por escrito la toma de una muestra de sangre. Los niños de este grupo eran aparentemente sanos y su análisis serológico dio resultado negativo (< 20 U/mL) de IgM anti-CMV. Todos los procedimientos fueron avalados por el Comité de Ética de nuestra institución siguiendo las Normas y Procedimientos Generales de Laboratorio para el Análisis de Muestras Humanas.

Determinación de malondialdehído

La concentración de malondialdehído (MDA) se determinó en las muestras de suero con el método de Gutiérrez-

Salinas³²; de acuerdo con Ramírez-Farías y cols.³³ basado en Ohkawa y cols.³⁴ Se incubaron muestras de 200 µL de suero con 1 mL de amortiguador de Tris (Tris-HCl, 0.15 M, pH 7.0) a 37 °C por 30 minutos. Al término de la incubación, se agregaron 1.5 mL de ácido acético (5% v/v) y 1.5 mL de ácido tiobarbitúrico (0.8% p/v) y se incubó por 60 minutos a 90 °C. Al término de la incubación se agregó 1 mL de KCl (2% p/v) y 3 mL de una mezcla de butanol/piridina (1:10 v/v). La mezcla se centrífugó a 2500 rpm por 10 minutos y la interfase superior fue leída en un espectrofotómetro (Jenway 6300, Cielovista, Cal. USA) a 532 nm calculando la concentración de MDA a partir de su coeficiente de extinción ($1.54 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).³²⁻³⁴

Determinación de la actividad de enzimas antioxidantes

Las enzimas antioxidantes fueron determinadas en las muestras de suero con equipos de reactivos de marcas comerciales expresando su actividad en U/mg proteína.

La actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) se determinó con un equipo de reactivos (Calbiochem; EMD Biosciences, Inc La Jolla Cal, USA) que se basa en el método espectrofotométrico descrito por Bannister y Bannister³⁵. En resumen se procedió como sigue: a una muestra de suero (10 µL) se le agregaron 200 µL de solución de reacción (Tris-HCl 50 mM; sal de tetrazolium 0.1 mM; pH 8) y 20 µL de xantina oxidasa (incluida en el equipo). La muestra se incubó 20 minutos a temperatura ambiente y fue leída a 450 nm en un lector de ELISA; se obtuvo la actividad de la enzima mediante una curva de calibración de actividad enzimática incluida en el equipo.

La actividad de la catalasa fue determinada con el procedimiento de Aebi³⁶ en una muestra de suero (100 µL) incubada cinco minutos con un amortiguador salino de fosfatos (PBS, pH 7.0) a 37 °C; se inició la reacción agregando 10 mM de H₂O₂, que fue seguida por 45 segundos a una longitud de onda de 240 nm en un espectrofotómetro Jenway 6300 (Cielovista Cal. USA).

La actividad de la enzima glutatión peroxidasa se determinó por espectrofotometría con el método de Paglia y Valentine³⁷ y un equipo de reactivos (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA). Se procedió como sigue: Se incubó una muestra de suero (50 µL) a temperatura ambiente con 800 µL de solución amortiguadora de ensayo (Tris-HCl 50 mM; EDTA 0.5 mM; pH 8) y 50 µL de solución de NADPH; se inició la reacción con 10 µL de ter-butil

hidroperóxido (30 mM). La reacción fue seguida por 90 segundos a una longitud de onda de 340 nm y se calculó la actividad de la enzima con el estándar de actividad incluido en el equipo.

La cantidad de proteína total en las muestras de suero se determinó con el procedimiento de Lowry³⁸ usando albúmina sérica bovina como estándar.

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como promedios ± D.E. El análisis estadístico se efectuó con el programa GraphPad Prism V-4 (GraphPad Software Inc., San Diego Cal. USA). Se calculó la diferencia de medias entre grupos usando la prueba U de Mann-Whitney; para todos los casos una $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativa.

RESULTADOS

El Cuadro 1 contiene las características generales (servicio de procedencia, edad y género) y la concentración sérica de IgM de cada niño del grupo CMV-positivo cuyo suero fue analizado; también muestra las características del grupo control.

En el grupo CMV-positivo predomina el género femenino con relación de 6/1.

El cuadro 1 muestra que el Servicio de Hematología aportó al estudio cuatro pacientes (57.14%); entre ellos,

al de menor edad (tres meses) y a los tres niños de mayor edad (cinco años). Dos muestras (28.57%) provenían del Servicio de Consulta Externa. Sólo una muestra (14.28%) del Servicio de Infectología.

Los expedientes de cada niño, todos CMV-positivos al diagnóstico de “fiebre de origen desconocido”, sin ninguna otra patología.

La concentración promedio de IgM del grupo CMV-positivo fue de 64.30 ± 21.81 con límites de 33.30 a 103 U/mL (Cuadro 1). Este promedio representa un incremento del 114.33% comparado con el valor límite de 30 U/mL que se tomó como punto de corte para definir una infección activa por CMV.^{17,18} En los sujetos del grupo control, los niveles de IgM anti-CMV fueron < 20 U/mL y se consideraron negativos (Cuadro 1) de acuerdo a la metodología previamente descrita.^{17,18}

La Figura 1 muestra la distribución de la concentración de MDA en los grupos control y CMV-positivo. El grupo control tuvo un promedio de MDA de 0.5974 ± 0.13 nmol/mL; el grupo CMV-positivo tuvo un promedio de 1.62 ± 0.66 nmol/mL lo que representa un incremento estadísticamente significativo del 171.18% ($p < 0.05$) sobre el valor del grupo control.

La actividad de la enzima SOD en el grupo CMV-positivo fue un promedio de 568.4 ± 33.06 U/mg de proteína lo que representa una disminución significativa del 21.89% ($p < 0.05$) respecto al grupo control, cuyo promedio de

Cuadro 1. Características generales de los sujetos del grupo control y del grupo CMV-positivo. Los datos se presentan en orden creciente de acuerdo a la edad de los sujetos

Sujeto	Servicio	Control			CMV-positivo			
		Género (F/M)	Edad (años)	IgM (U/mL)	Servicio	Género (F/M)	Edad (años)	IgM (U/mL)
1	CEX	F	1	neg.	HEM	F	0.3	76.9
2	CEX	F	1	neg.	CEX	F	0.4	54.7
3	CEX	M	2	neg.	INF	F	0.7	56.5
4	CEX	M	2	neg.	CEX	M	2	33.3
5	CEX	F	4	neg.	HEM	F	5	56.5
6	CEX	F	5	neg.	HEM	F	5	69.2
7	CEX	F	7	neg.	HEM	F	5	103
Relación o promedio ± D.E. (límite)	-	-	5/2	3.14 ± 2.28 (1-7)	-	-	6/1	2.63 ± 2.30 (0.3 - 5) 64.30 ± 21.81 (33.30 - 103)

CEX: consulta externa; HEM: hematología; INF: infectología; neg: negativo; F: femenino; M: masculino.

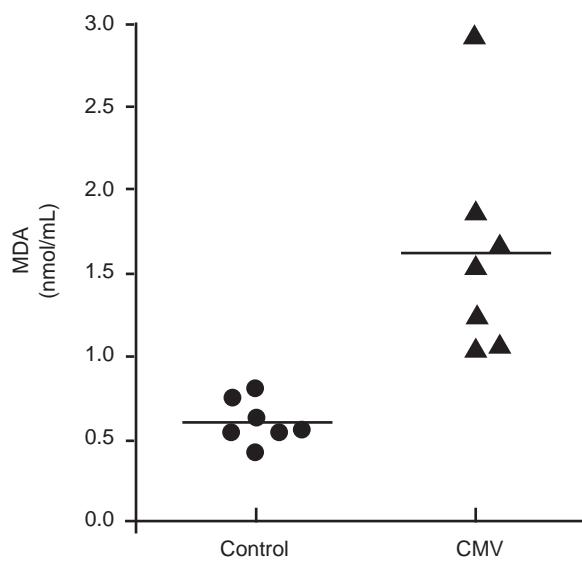


Figura 1. Distribución de la concentración de MDA en cada uno de los integrantes del grupo control con CMV-positivo (CMV). Las líneas continuas horizontales representan el valor promedio en cada grupo.

actividad para esta enzima fue de 727.7 ± 29.51 U/mg de proteína (Figura 2-A).

En contraste, en el grupo CMV-positivo, la actividad de las enzimas catalasa y glutatión peroxidasa tuvo un incremento respecto al grupo control; la actividad de la catalasa fue estadísticamente significativa del 18.77% respecto al grupo control (769.6 ± 60.79 vs 612.8 ± 18.76). El grupo control tuvo un promedio de actividad en la enzima glutatión peroxidasa de 59.4 ± 2.75 U/mg de proteína mientras

que en el grupo CMV-positivo la actividad fue de 97.05 ± 7.69 U/mg de proteína es decir, un incremento del 63.38% respecto al grupo control (Figura 2-C).

DISCUSIÓN

Nuestros resultados muestran que los niños con niveles de inmunoglobulina tipo IgM que indican una infección por CMV, desarrollan un estrés oxidativo que se expresa por el incremento de los niveles séricos de MDA así como por los cambios en la actividad de las enzimas antioxidantes catalasa, glutatión peroxidasa y SOD.

Estudios previos señalan que un alto nivel sérico de anticuerpos IgM anti-CMV indican una infección activa por este virus.^{5,15-18} Con nuestra metodología de detección para determinar la concentración de esta inmunoglobulina, el valor de corte para definir una infección es de ≥ 30 U/mL y en nuestra población de estudio hubo un promedio del doble: 64.30 U/mL.

Una infección viral eleva la producción de RLOx y provoca estrés oxidativo, que es parte importante de los mecanismos de daño a las células, tejidos y el organismo en general.^{19-23,31,39} Se ha descrito un incremento en los niveles séricos de MDA aunada a una alteración en la actividad de enzimas antioxidantes en pacientes con infección por VIH, por el virus de la hepatitis C, por retrovirus y por dengue, entre otros, lo que indica un estrés oxidativo.^{19,22,23,39}

Debido a que en una situación de estrés oxidativo se elevan los niveles séricos de MDA, que indica un daño importante a los ácidos grasos poliinsaturados de las

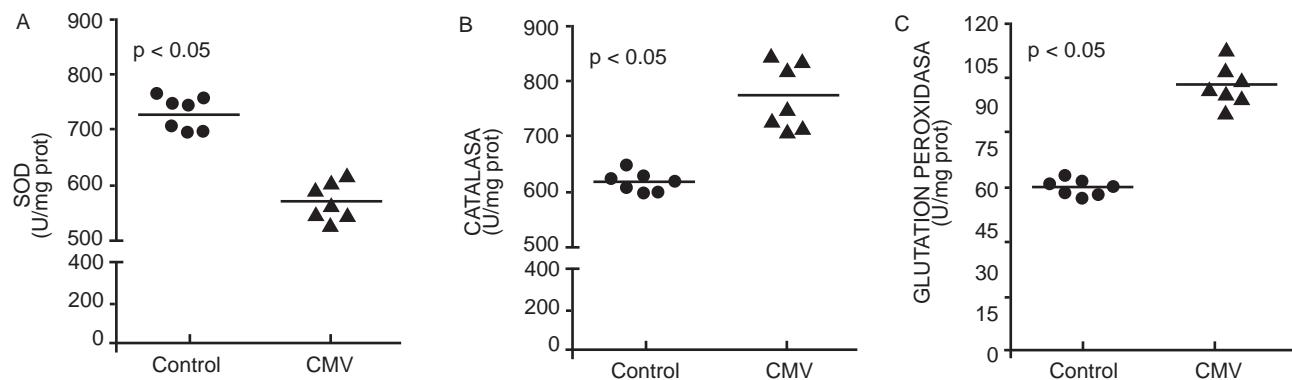


Figura 2. Distribución de la actividad de las enzimas SOD (A), catalasa (B) y glutatión peroxidasa (C) en cada uno de los sueros provenientes de los sujetos del grupo control con CMV-positivo (CMV). Las líneas continuas horizontales representan el valor promedio para cada grupo de su respectiva gráfica.

membranas celulares causado por los RLOx, en los niños del grupo CMV-positivo existe dicho estrés oxidativo inducido por este virus (Figura 1).

Por otro lado, se ha observado que durante el estrés oxidativo, el organismo promueve modificaciones en los mecanismos antioxidantes (sobre todo enzimáticos) como defensa ante el ataque de RLOx, durante una infección viral aguda o crónica.^{19,20,22,23,28,31,39} El incremento en la actividad de las enzimas antioxidantes catalasa y glutatión peroxidasa en los niños del grupo CMV-positivo concuerda con lo anteriormente señalado (Figura 2). Por su parte, la disminución en la actividad de la enzima SOD en el grupo CMV-positivo puede explicarse por el hecho de que, ante un aumento importante en la generación de RLOx (sobre todo de la especie superóxido que es el sustrato de esta enzima), se puede “saturar” a la enzima SOD, como ocurre en cualquier mecanismo enzimático de saturación por sustrato y de esta forma, disminuye su actividad como respuesta a un exceso en la producción de RLOx generados durante la infección viral.⁴⁰⁻⁴³

El estrés oxidativo provocado por una infección viral es parte de los mecanismos generales de respuesta inflamatoria del organismo ante una infección viral, bacteriana o parasitaria.^{19-23,28,39,40} Se ha sugerido que el estrés oxidativo generado por estos agentes, se debe a la activación de los leucocitos y de las células encargadas de la respuesta inmune en todos los órganos de la economía ya que son ellos los mayores productores de RLOx cuando son activados como parte de la respuesta inmune que desarrolla el organismo.^{19-23,28,31,39,40,42}

La infección primaria o la reactivación de la misma causada por CMV en niños puede ser asintomática; sin embargo, en pacientes immunocomprometidos puede ser fatal. Para otro tipo de infecciones virales, se ha propuesto que la generación de RLOx durante un estrés oxidativo es un mecanismo de daño muy importante para el paciente, sobre todo, de edades tempranas, por lo que su detección y monitoreo puede ser útil para iniciar un tratamiento antioxidant para disminuir el daño. Se ha descrito un aparente beneficio con el uso de complementos antioxidantes para mejorar la salud en pacientes con una infección por parásitos o virus.^{19,21,22,31}

Sin embargo, aún queda mucho por hacer. La muestra de sujetos CMV-positivos presentada es pequeña; en un futuro se pretende ampliar dicho número a fin de establecer con mayor seguridad el daño a los sistemas antioxidantes

provocados por este tipo de infección. Nuestros resultados indican que un estrés oxidativo es parte de los mecanismos desencadenados por una infección de CMV en niños, quienes son más susceptibles a estos ataques y pueden sufrir un mayor daño, con secuelas permanentes. Estas pudieran evitarse si se instala un tratamiento integral. Debe tenerse presente que el CMV, permanece de forma latente en el organismo y cualquier evento que comprometa al sistema inmunológico puede reactivar la infección que dañará irreversiblemente a las células, a los tejidos o ambos y provocar la muerte.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Q.F.B. Ana María González Cardel y a la Q.F.B. Sara R. Juárez Enriquez por su ayuda en la recolección y análisis inmunológico de las muestras de suero. También agradecemos la ayuda del Dr. Eduardo Esponda por la selección y toma de muestras en los niños del grupo control.

REFERENCIAS

1. Taylor GH. Cytomegalovirus. Am Fam Physician 2003;67:519-24.
2. Staras SAS, Dollard SC, Radford KW, Flanders WD, Pass RF, Cannon MJ. Seroprevalence of cytomegalovirus infection in the United States, 1988-1994. Clin Infect Dis 2006;43:1143-51.
3. Colugnati FAB, Staras SAS, Dollard SC, Cannon MJ. Incidence of cytomegalovirus infection among the general population and pregnant women in the United States. BMC Infect Dis 2007;7:71-80.
4. Mustakangas P, Sarna S, Ammala P, Mutilainen M, Koskela P, Koskineni M. Human cytomegalovirus seroprevalence in three socioeconomically different urban areas during the first trimester: a population-based cohort study. Int J Epidemiol 2000;29:587-91.
5. Revollo MG, Gema G. Diagnosis and management of human cytomegalovirus infection in the mother, fetus and newborn infant. Clin Microbiol Rev 2002;15:680-715.
6. Díaz AGM, Valdés MCA, Resik S. Infecciones por citomegalovirus. Rev Cubana Med Gen Integr 1998;14:270-8.
7. Sinclair J, Sissons P. Latency and reactivation of human cytomegalovirus. J Gen Vir 2006;87:1763-79.
8. Rafailidis PI, Mourtzoukou EG, Varbobitis IC, Falagas ME. Severe cytomegalovirus infection in apparently immunocompetent patients: a systemic review. Vir J 2008;5:47-53.
9. Villasis-Keever A, Mosqueta JL. Infecciones en trasplante de médula ósea. Rev Invest Clin 2005;57:381-6.
10. Murphy JR, Souza IE, Dawson JD, Benson P, Petheram SJ, Pfah D, et al. Epidemiology of congenital cytomegalovirus infection: maternal risk factors and molecular analysis of cytomegalovirus strains. Am J Epidemiol 1998;147:940-7.
11. Seale H, MacIntyre CR, Gidding HF, Backhouse JL, Dwyer DE, Gilbert L. National serosurvey of cytomegalovirus in Australia.

- Clin Vaccine Immunol 2006;13:1181-4.
12. Almeida LNB, Azevedo RS, Amaku M, Massad E. Cytomegalovirus seroepidemiology in an urban community of São Paulo, Brasil. Rev Saude Publica 2001;35:124-9.
 13. Echaniz-Avilés G, Tamayo-Legorreta E, Cruz-Valdez A, Rangel-Flores H, Hernández-Nevárez P, Gatica-Marquina R, et al. Prevalencia de anticuerpos contra citomegalovirus en mujeres en edad reproductiva. Salud Pública Mex 1993;35:20-6.
 14. Baptista GHA, Kourchenko RH, Rosenfeld MF, Rizo AS. Estudio de infecciones virales en el lactante menor transfundido en la etapa neonatal. Bol Med Hosp Infant Mex 1998;55:386-92.
 15. Marin J, Kese D, Potocnik M, Butina R. Laboratory diagnosis of herpesviruses. Acta Dermatovenerol APA 2000;9:1-7.
 16. Karden J, Preyer UR. Serum IgG, IgM and IgA antibody response against cytomegalovirus-specific proteins in renal transplant recipients during primary and secondary/recurrent infection as determined by immunoblotting technique. Tx Med 2005;17:61-74.
 17. Juárez-Enriquez SR, González-Cardel AM, Gutiérrez-Salinas J. Correlación de las respuestas de IgG e IgM contra citomegalovirus en una población del Centro Médico Nacional "20 de Noviembre" del ISSSTE. Bioquímica 2008;33(supp 1):79.
 18. González-Cardel AM, Juárez-Enriquez SR, Gutiérrez-Salinas J. Prevalencia de anticuerpos IgG e IgM contra citomegalovirus en el Centro Médico Nacional "20 de Noviembre" del ISSSTE. Bioquímica 2008;33(supp 1):81.
 19. Peterhans E. Oxidants and antioxidants in viral diseases: mechanisms and metabolic regulations. J Nutr 1997;127:962S-965S.
 20. Maeda H, Akaike T. Oxygen free radicals as pathogenic molecules in viral diseases. Proc Soc Exp Biol Med 1991;198:721-7.
 21. D'Souza PV, D'Souza B. Comparative study on lipid peroxidation and antioxidant vitamins E and C in falciparum and vivax malaria. Ind J Clin Biochem 2006;21:103-6.
 22. Jiang Y, Scofield VL, Yan M, Qiang W, Liu N, Reid AL. Retrovirus-induced oxidative stress with neuroimmunodegeneration is suppressed by antioxidant treatment with a refined monosodium alpha-lumino (Galavit). J Virol 2006;80:4557-69.
 23. Gil L, Martínez G, Tápanes R, Castro O, González D, Bernardo L, et al. Oxidative stress in adult dengue patients. Am J Trop Med Hyg 2004;71:652-7.
 24. Gutiérrez-Salinas J, Morales-González JA. Producción de radicales libres derivados del oxígeno y el daño al hepatocito. Med Int Mex 2004;20:287-95.
 25. Gutiérrez-Salinas J. Qué sabe usted acerca de radicales libres?. Rev Mex Cien Farm 2006;37:69-73.
 26. Gutiérrez-Salinas J. Función de los complementos antioxidantes durante el ejercicio. Med Int Mex 2007;23:217-22.
 27. Andersen HR, Nielsen JB, Nielsen F, Grandjean P. Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes. Clin Chem 1997;43:562-8.
 28. Dalle Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. Clin Chem 2006;52:601-623.
 29. Morales-González JA, Bueno-Cardoso A, Marichi-Rodríguez F, Gutiérrez-Salinas J. Programmed cell death (apoptosis): the regulating mechanisms of cellular proliferation. Arch Neurol (Mex) 2004;9:85-93.
 30. Nielsen F, Mikkelsen BB, Nielsen JB, Andersen HR, Grandjean P. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. Clin Chem 1997;43:1209-14.
 31. Beck MA, Levander OA, Handy J. Oxidative stress mediated by trace elements: Selenium deficiency and viral infection. J Nutr 2003;133:1463S-1467S.
 32. Gutiérrez-Salinas J, Morales-González JA. La ingesta de fluoruro de sodio produce estrés oxidativo en la mucosa bucal de la rata. Rev Mex Cien Farm 2006;37:11-22.
 33. Ramírez-Farías C, Madrigal-Santillán E, Gutiérrez-Salinas J, Rodríguez-Sánchez N, Martínez-Cruz M, Valle-Jones I, et al. Protective effect of some vitamins against the toxic action of ethanol on liver regeneration induced by partial hepatectomy in rats. World J Gastroenterol 2008;14:899-907.
 34. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem 1979;95:351-8.
 35. Bannister JV, Bannister WH. Isolation and characterization of superoxide dismutase. En: Lester Packer (eds), Methods in Enzymology. New York: Academic Press: 1984. p. 88-93.
 36. Aebi ABH. Catalase activity. En: Bergmeyer HU, Bergmeyer J, Grabl M. (eds), Methods in Enzymatic Analysis. Florida: Verlag Chemie; 1983. p. 273-82.
 37. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. J Lab Clin Med 1967;70:158-69.
 38. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AI, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 1951;95:351-8.
 39. Osman HG, Gabr OM, Lotfy S, Gabr S. Serum levels of bcl-2 and cellular oxidative stress in patients with viral hepatitis. In J Med Microbiol 2007;25:323-9.
 40. Bandyopadhyay U, Das D, Benerjee RK. Reactive oxygen species: oxidative damage and pathogenesis. Curr Sci 1999;77:658-66.
 41. Cairo G, Castrusini E, Minotti G, Bernelli-Zazzera A. Superoxide and hydrogen peroxide-dependent inhibition of iron regulatory proteins activity: a protective stratagem against oxidative injury. FASEB J 1996;10:1326-35.
 42. Saltman P. Oxidative stress: a radical view. Sem Hematol 1989;26:249-56.
 43. Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol Rev 2002;82:47-95.