



## EFFECTO DEL ALFA TOCOFEROL SOBRE LOS NIVELES SERICOS DE MARCADORES INFLAMATORIOS EN ESTUDIANTES DE LA REGIÓN VALLES, JALISCO, MÉXICO

Franco-Avila T<sup>a</sup>, Gálvez-Gastelum F. J.<sup>a</sup>, Castro-Gamboa S<sup>a</sup>, Yáñez-Sánchez I<sup>b</sup>.

<sup>a</sup>Departamento de Microbiología y Patología, Centro Universitario de Ciencias de la Salud, Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco, México. taliafranco@ajanut.org, galvez1975@hotmail.com, castrosandra11@gmail.com

<sup>b</sup>Departamento de Ciencias Naturales y Exactas, Centro Universitario de los Valles, Universidad de Guadalajara, Jalisco, México. irineay@yahoo.com.mx

### RESUMEN

*Introducción:* Las isoformas de la vitamina E como el alfa tocoferol, actúan de forma coordinada con otras moléculas, para la defensa de las células frente a los efectos nocivos provocados por los radicales libres. Así, el poder antioxidante del alfa tocoferol previene el daño a macromoléculas y el incremento de marcadores inflamatorios como las interleucinas proinflamatorias (IL) y la Proteína C Reactiva (PCR). *Objetivo:* Evaluar el efecto del alfa tocoferol sobre los niveles séricos de marcadores inflamatorios en estudiantes de la Región Valles de Jalisco. *Metodología:* Ensayo clínico simple ciego controlado con placebo conformado por 31 sujetos sanos asignados aleatoriamente al grupo control o al grupo de tratamiento con 400 UI de acetato de alfa tocoferol por vía oral por 30 días. Se valoraron las concentraciones séricas basales y finales de TNF- $\alpha$  e IL-6 por ELISA, PCR por Inmunoensayo Enzimático Heterogéneo en Sandwich y glucosa en ayuno, colesterol total, cHDL, cLDL, cVLDL y triglicéridos por química seca. El análisis de los datos se realizó en el programa SPSS versión 20. Se utilizó la prueba Shapiro Wilk para determinar el comportamiento normal de las variables. Para el análisis estadístico realizado intra e intergrupos se utilizaron las pruebas Wilcoxon y U de Mann Whitney respectivamente. Valores de  $p < 0.05$  fueron considerados como estadísticamente significativos. *Resultados:* Las variables basales de ambos grupos no difieren de forma significativa ( $p \geq 0.05$ ). El tratamiento con alfa tocoferol disminuyó significativamente los niveles de PCR ( $18.94 \pm 7.61$  vs  $7.38 \pm 5.58$  mg/L,  $p \leq 0.001$ ). No se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones basales y finales de las citocinas proinflamatorias y pruebas bioquímicas, sin embargo se encontró una ligera disminución de la glucosa en ayuno y triglicéridos. *Conclusiones:* La vitamina E es eficaz en el tratamiento de la inflamación sistémica previniendo el daño oxidativo, sin embargo es necesario investigar a fondo su interacción con las interleucinas proinflamatorias.

### 1. INTRODUCCIÓN

Las Especies Reactivas de Oxígeno (EROs) son producidas por los seres vivos como resultado del metabolismo normal celular y factores ambientales (Birben, 2012). En concentraciones moderadas, los EROs tienen funciones fisiológicas, sin embargo a concentraciones mayores, pueden tener efectos perjudiciales a la salud (Valko, 2006). La sobreproducción de EROs, ocurre en los sitios de inflamación activa contribuyendo a la afección de los tejidos. El subsecuente estrés oxidativo predomina cuando la producción de EROs excede la capacidad de la defensa antioxidante celular. Así, debido a su alta reactividad, los EROs son potencialmente causantes del daño a biomoléculas como ADN, lípidos y proteínas (Peake, 2007).



Lo anterior contribuye en la etiología de varias enfermedades como cáncer, desórdenes neurológicos, aterosclerosis, hipertensión, diabetes, fibrosis pulmonar idiopática, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y asma, las cuales se encuentran vinculadas a la inflamación crónica de bajo grado y a la sobreproducción de EROs y especies reactivas de nitrógeno (ERNs) (Abbas, 2014; Birben, 2012).

Por otro lado, las citocinas son moléculas de comunicación intercelular, las cuales exhiben diversas funciones en diferentes sistemas y procesos orgánicos; particularmente, ejercen una acción importante en los mecanismos que producen inflamación. Específicamente, las concentraciones de interleucina 6 (IL-6) son elevadas en sitios de inflamación activa (Saavedra, 2011). Actualmente la IL-6 es la principal estimuladora de la producción de la mayoría de las proteínas de fase aguda como la Proteína C Reactiva (PCR) (Scheller, 2006).

Ante esto, la vitamina E se ha considerado como el principal antioxidante que rompe la cadena de propagación del estrés oxidativo, especialmente en membranas. Así, se ha reportado que la vitamina E, específicamente el alfa tocoferol, es capaz de modular la transducción de señales y la expresión génica debido a sus propiedades antioxidantes y no antioxidantes (Zingg, 2007). Adicionalmente, se ha demostrado que la vitamina E posee funciones inmunoregulatoras durante la inflamación, reduciendo el daño DNA y apoyando la división celular normal (Makpol 2011).

Existen varias teorías acerca de la función de la vitamina E en el organismo, siendo la más aceptada que la vitamina E actúa de forma coordinada con otras moléculas y enzimas para la defensa de las células (especialmente glóbulos rojos, células musculares y células nerviosas) frente a los efectos nocivos producidos por los radicales libres, considerándose actualmente un importante antioxidante que aporta sustanciales beneficios al organismo (Sayago, 2007). Así, estudios en humanos han demostrado que el alfa tocoferol, disminuye de manera significativa los biomarcadores de estrés oxidativo e inflamación (Jialal, 2005). Por lo tanto, debido a su biofuncionalidad e importancia en la dieta, el alfa tocoferol pudiera ser analizado en diferentes situaciones de estrés oxidativo e inflamación.

## 2. TEORÍA

De manera general, el estrés puede ser definido como un estado de amenaza a la homeostasis y puede ser provocado por factores psicológicos, ambientales o por estímulos fisiológicos (Black, 2002). El estrés puede alterar la respuesta inmune a través de la interacción entre los sistemas nervioso, endocrino y el sistema inmunológico en general (Glaser, 2005). Aunado a lo anterior, se ha descrito que procesos de infección, lesiones o inflamación activa; regulan la producción de citocinas, las cuales estimulan la liberación de glucocorticoides del Eje Pituitario-Adrenal (HPA) (Charmandari, 2005) y que citocinas como Interferones (IFN), Interleucina 1 (IL-1), Interleucina 2 (IL-2) e IL-6 pueden elevar la concentración de la Hormona Adrenocorticotropa (ACTH) y glucocorticoides (Petrovsky, 2001). Así mismo, se ha descubierto que la IL-6 juega un importante rol en la inducción de las reacciones de fase aguda actuando en el hígado y en el eje HPA (Ruzek, 1997).

La IL-6 es la molécula mayormente responsable de activar las proteínas de fase aguda como la PCR. Esta se sintetiza principalmente en el hígado en respuesta a la inflamación y pertenece a la familia de las proteínas pentaxinas involucradas en la respuesta inmune innata. Así mismo, la sobre regulación de la citocina proinflamatoria llamada TNF alfa ( $TNF\alpha$ ), tiene como consecuencia la sobreproducción de IL-6. En general, los niveles plasmáticos de PCR se correlacionan con la



severidad de las enfermedades inflamatorias o daño a tejidos. En estudios *in vitro* se ha demostrado que el control de esta respuesta esta primeramente regulada por IL-6 (Xing, 1998).

Por otro lado, la vitamina E es el nombre genérico con el cuál se designa a las moléculas que muestran actividad biológica incluyendo todos los tocoles y derivados del tocotrienol. Esta se presenta en la naturaleza en ocho formas diferentes: cuatro tocoferoles y cuatro tocotrienoles que difieren unos de otros debido a que los tocotrienoles poseen una cadena lateral insaturada y los tocoferoles una cadena lateral saturada. Algunas fuentes dietéticas de Vitamina E son nueces, granos y aceites vegetales, mientras que algunas fuentes de alfa tocoferol son aceite de germen de trigo, de girasol y de cártamo (Shils, 2002). Una vez atravesado el lumen intestinal, la vitamina E es transportada por las lipoproteínas y por los eritrocitos, encontrándose niveles significativos de esta vitamina en las membranas de estos últimos. El tocoferol circulante es acumulado lentamente por los diferentes tejidos, incorporándose a las membranas de las células junto al colesterol y los fosfolípidos. El tejido adiposo, el hígado y el músculo son áreas importantes para el depósito de esta vitamina (Sayago, 2007).

El mecanismo de acción antioxidante propio de la vitamina e y específicamente del alfa tocoferol, consiste en la interrupción de las etapas de propagación y descomposición del proceso de autoxidación. En la autoxidación, los tocoferoles interrumpen las reacciones en cadena mediante la donación de un hidrógeno al radical peroxilo originando un radical ariloxilo y un hidroperóxido. Los radicales ariloxilos resultantes, se estabilizan por deslocalización electrónica de la estructura fenólica, reaccionando fácilmente con otros radicales peroxilo para formar productos estables, resultando poco probable que atraigan átomos de hidrógeno de moléculas lipídicas intactas. Los múltiples productos de oxidación de los tocoferoles, pueden formarse a partir de los radicales ariloxilo mediante una complicada gama de reacciones, incluyendo reacciones bimoleculares de radicales ariloxilo para formar dímeros (Sayago, 2007).

La vitamina E consta de 2 partes principales: un anillo complejo cromano y una larga cadena lateral. La reactividad de la vitamina E con los radicales orgánicos peroxilos, se asocia con las propiedades redox del anillo cromano que es la responsable de su capacidad antioxidante. Los tocoferoles al reaccionar con los radicales peroxilos lipídicos generan hidroperóxidos lipídicos relativamente estables. Los radicales tocoferilos interrumpen la reacción en cadena de los radicales, por lo que protegen de la peroxidación lipídica. De hecho, en plasma y en eritrocitos, la vitamina E es el principal antioxidante liposoluble que protege los lípidos contra el daño oxidativo. Sumado a lo anterior, existen otras reacciones celulares dependientes de alfa tocoferol, como son la inhibición de la proteína quinasa C y la proliferación celular (Febles, 2002).

De esta manera, las bajas concentraciones de vitamina E se asocian con la desestabilización de las membranas de las células del sistema inmune, la disminución de la hipersensibilidad retardada y con la disminución de la producción de inmunoglobulinas. Se asocia además, con la disminución de la inmunidad mediada por células y la producción de IL-2. Así, la IL-2 se encuentra disminuida, mientras que el incremento de IL-6 ha sido asociado con un aumento del estrés oxidativo, relacionado a su vez con la deficiencia de vitamina E (Febles, 2002). Actualmente, se sabe que la IL-6 es indispensable en la transición de la inflamación aguda a la inflamación crónica debido a su papel en la modificación del infiltrado leucocitario. La inflamación aguda se considera como una respuesta benéfica, principalmente en periodos infecciosos, sin embargo, la inflamación crónica es un fenómeno persistente que puede dar paso a daño de tejidos (Gabay, 2006).



### 3. PARTE EXPERIMENTAL

Ensayo clínico ciego simple controlado con placebo de fase II de investigación clínica. Se conformó por dos grupos de sujetos sanos: el grupo de tratamiento con 400 UI de acetato de alfa tocoferol y el grupo control con placebo, ambos tratamientos administrados por vía oral por 30 días. El grupo de tratamiento se conformó por 20 miembros, mientras que el grupo control por 11 sujetos, teniendo una n total de 31 sujetos. La n fue tomada a conveniencia según lo reportado en investigaciones anteriores.

Los participantes fueron incluidos sin restricción de raza o nivel socioeconómico de acuerdo a los siguientes criterios de inclusión: adolescentes aparentemente sanos, de ambos sexos, con edades comprendidas entre los 15 y 30 años, con un IMC  $\geq 18.5$  y  $\leq 29.9$ , sin exposición a terapias con complementos alimenticios o medicamentos con propiedades antioxidantes 3 meses previos al ingreso del estudio, sin presentar cambios en estilos de vida (alimentación y actividad física) 3 meses previos al ingreso del estudio y presentar firma de consentimiento informado. Los criterios de exclusión incluyen: participación en otras investigaciones, sensibilidad al alfa tocoferol, estar en tratamiento con medicamentos o complementos alimenticios con propiedades antioxidantes, presentar enfermedad hepática, renal o tiroidea, seguir el régimen de una dieta vegetariana o alguna de sus variantes, estar en periodo de embarazo o lactancia o con proyecto de hacerlo durante el periodo de estudio y no firmar el consentimiento informado. Por último, dentro de los criterios de eliminación encontramos: apego al tratamiento  $\leq 80\%$ , ausencia a la visita final, haber consumido medicamentos con propiedades antioxidantes o complementos alimenticios durante el estudio, presentar alguna reacción adversa al tratamiento, juicio médico o de salud que indique un procedimiento extraordinario y retiro del consentimiento informado.

El tamizaje procedió mediante la aplicación de la historia clínica y toma de medidas antropométricas (peso, talla, IMC, porcentaje de grasa corporal, masa magra, porcentaje de agua corporal, puntaje de grasa visceral y edad metabólica.). La medición de la talla se realizó mediante el estadímetro portátil marca Seca modelo 213, mientras que las demás medidas antropométricas se realizaron mediante el monitor de composición corporal Tanita BC-558 Ironman Segmental Body Composition Monitor. Todos los procedimientos se realizaron siguiendo el protocolo establecido por la International Society for the Advancement of Kinanthropometry (ISAK, 2015).

La toma de muestra sanguínea inicial y final se realizó por venopunción en el antebrazo con vacutainer y con tubo sin anticoagulante previa desinfección de la zona y ayuno de 8 horas. Se prosiguió con la separación del suero sanguíneo mediante centrifugación a 3 000 revoluciones por minuto durante 10 minutos. Por último, el suero se almacena a  $-20^{\circ}\text{C}$  para la determinación de citocinas inflamatorias. La determinación basal y final de glucosa en ayuno, colesterol total, cHDL, cLDL, cVLDL y triglicéridos se realizó el mismo día de su obtención por el método de Química Seca. La concentración inicial y final de TNF- $\alpha$  e IL-6 se realizó por medio del Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) (Peprotech 900-K16 para IL-6 y 900-K25 para TNF- $\alpha$ ) mediante la interpolación de la absorbancia obtenida de la muestra en la curva de calibración de absorbancia, versus concentración de la citocina estándar. Se utilizó el lector de ELISAS Sinergy HT Multi-Mode Microplate Reader con el software Gen5 v2.0, Biotek. La concentración basal y final de Proteína C Reactiva se determinó por el método de Inmunoensayo Enzimático Heterogéneo en Sandwich (Vitros Chemistry catálogo 192 6740 809 7990).

El análisis de los datos se realizó en el programa SPSS versión 20. Se utilizó la prueba Shapiro Wilk para determinar el comportamiento normal de las variables. Las variables paramétricas son expresadas en media y desviación estándar, mientras que las variables no



paramétricas en mediana y cuartiles. Para el análisis entre grupos se utilizó la prueba U de Mann Whitney y para el análisis intragrupos se utilizó la prueba Wilcoxon. Valores de  $p < 0.05$  son considerados como estadísticamente significativos.

El proyecto cumple con las normas nacionales e internacionales para realizar investigación en humanos. Según el artículo 17 del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, el presente estudio se encuentra dentro de la Categoría II, "Investigación con riesgo mínimo", debido a que los procedimientos para la obtención de datos y muestras biológicas son rutinarios (Referencia 21). Sumado a lo anterior, el alfa tocoferol es un compuesto Reconocido como Seguro (Generally Recognized As Safe, GRAS) por la Food and Drug Administration (FDA) y la dosis administrada no supera el margen permitido por esta instancia (FDA, 2015). Es necesario mencionar que los procedimientos realizados, cumplen con los principios éticos establecidos en la Declaración de Helsinki. El proyecto cumple con las normas nacionales e internacionales de bioseguridad. La presente investigación sigue la normativa del Título Cuarto "De la Bioseguridad de las Investigaciones" del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud (Referencia 23).

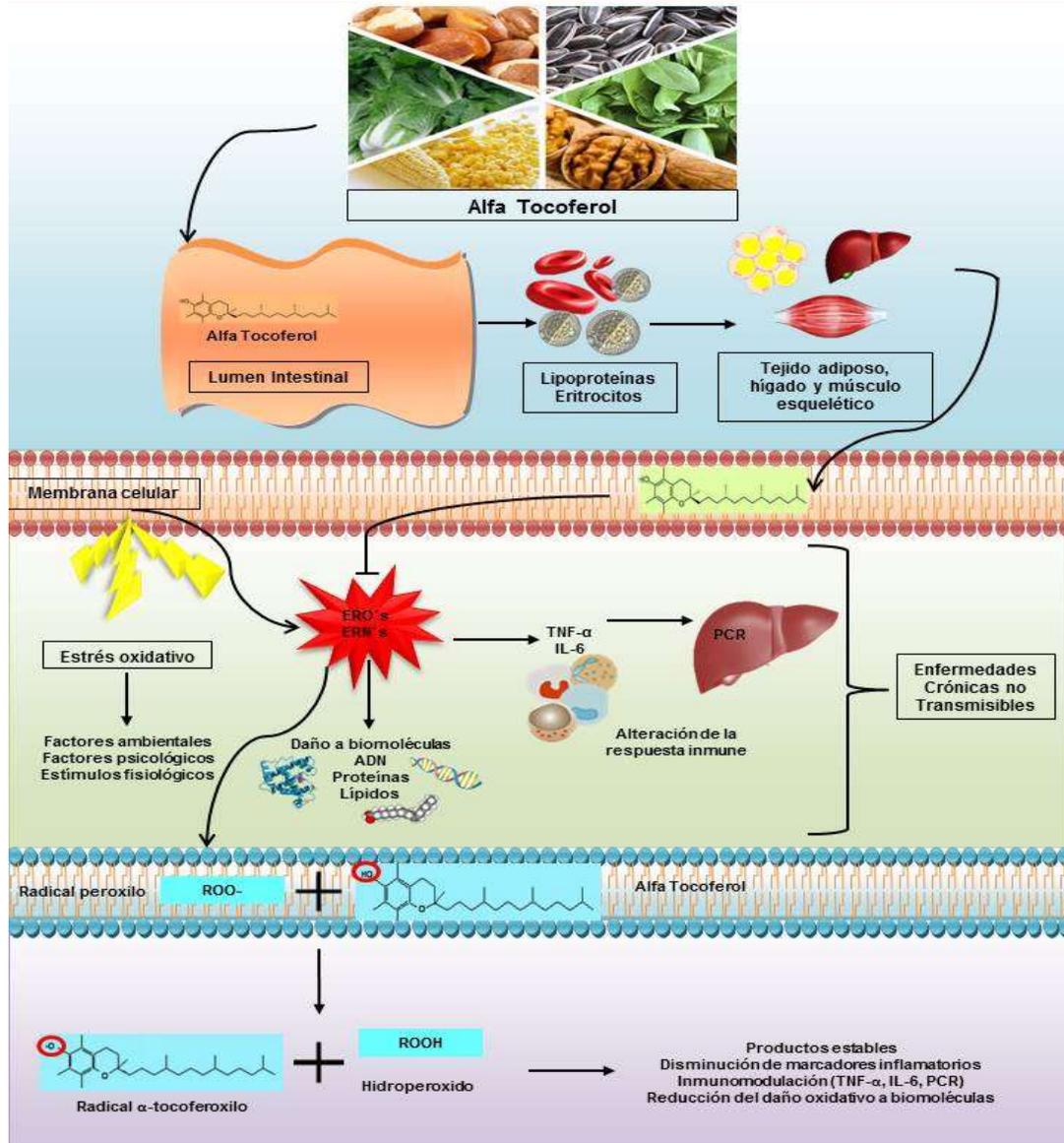
#### 4. CONCLUSIONES

Las características basales de ambos grupos no muestran diferencias estadísticamente significativas ( $p \geq 0.05$ ). La edad de los participantes osciló entre  $18.9 \pm 1.0$  años en el grupo placebo y  $19.8 \pm 1.5$  años en el grupo de alfa tocoferol. Asimismo, el peso presentado en el grupo placebo fue de  $59.1 \pm 12.9$  kg, mientras que en el grupo de tratamiento fue de  $62.2 \pm 12.7$  kg. El IMC y el porcentaje de grasa presentados fueron de  $22.8 \pm 3.4$  kg/m<sup>2</sup> y  $25.9 \pm 7.1$  % en el grupo placebo y de  $23.6 \pm 4.7$  kg/m<sup>2</sup> y  $30.9 \pm 10.5$  % en el grupo de alfa tocoferol. Se tomaron otras variables antropométricas como talla, edad metabólica, porcentaje de agua corporal, puntaje de grasa visceral y masa magra, además de presión arterial; las cuales no presentaron diferencias significativas entre grupos y se mostraron dentro de los rangos ideales.

Los parámetros bioquímicos no mostraron cambios significativos con el tratamiento de 400 UI de alfa tocoferol. Sin embargo, se mostró una disminución de 5% en la concentración de glucosa ( $78.5 \pm 10.8$  mg/dl vs  $74.5 \pm 5.1$  mg/dl) y de 8% en la concentración de triglicéridos ( $105.6 \pm 47.1$  mg/dl vs  $97.2 \pm 28.2$  mg/dl). Igualmente las concentraciones de cHDL y de cVLDL presentaron un ligero decremento. Por el contrario, los niveles de cLDL aumentaron ( $86.4 \pm 19.6$  mg/dl vs  $92.6 \pm 21.4$  mg/dl) y los niveles de colesterol total se mantuvieron estables ( $156.0 \pm 21.4$  mg/dl vs  $156.7 \pm 21.7$  mg/dl). Las variables basales de ambos grupos no difirieron de forma significativa ( $P \geq 0.05$ ).

Respecto a la medición de marcadores inflamatorios, los niveles de PCR disminuyeron de manera estadísticamente significativa de  $18.94 \pm 7.61$  mg/l a  $7.38 \pm 5.58$  mg/L ( $p \leq 0.001$ ), sin embargo los niveles de IL-6 incrementaron significativamente de  $1.06 \pm 0.67$  ng/ml a  $3.00 \pm 1.76$  ng/ml ( $p \leq 0.001$ ). Igualmente, los niveles de TNF- $\alpha$  aumentaron significativamente de  $0.41 \pm 0.24$  ng/ml a  $0.71 \pm 0.17$  ng/ml ( $p \leq 0.001$ ).

El tratamiento con alfa tocoferol es efectivo en la disminución de la concentración de proteínas de fase aguda como la PCR; la cual responde a un estado de inflamación. La producción de PCR es estimulada por la presencia de IL-6, la cual es inducida por la concentración de TNF- $\alpha$ . Sin embargo es necesario investigar a profundidad el mecanismo de acción del alfa tocoferol sobre las citocinas TNF- $\alpha$  e IL.6. En la figura 1 se muestra el mecanismo de acción propuesto del alfa tocoferol en el control del estrés oxidativo e inflamación.



**Figura1. Mecanismo de acción del alfa tocoferol.** El aceite de germen de trigo, de girasol y de cártamo son las principales fuentes dietéticas de alfa tocoferol. Cuando la vitamina E es consumida y una vez que ha atravesado el lumen intestinal, esta es transportada por las lipoproteínas y por los eritrocitos. El tocoferol es acumulado por los tejidos, incorporándose a las membranas de las células junto al colesterol y los fosfolípidos. El tejido adiposo, el hígado y el músculo son áreas de depósito. El mecanismo de acción antioxidante del alfa tocoferol, consiste en la autoxidación, los tocoferoles interrumpen las reacciones en cadena mediante la donación de un hidrógeno al radical peroxilo originando un hidroperóxido. Los radicales resultantes, se estabilizan fácilmente con otros radicales para formar productos estables, lo cual tiene como consecuencia la disminución de marcadores inflamatorios y reducción del daño oxidativo a biomoléculas.



## BIBLIOGRAFÍA

1. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O, "Oxidative stress and antioxidant defense", *World. Allergy. Organ. J.*, Vol. 5, 1, 2012, pp. 9-19. doi: 10.1097/WOX.0b013e3182439613.
2. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M, "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer", *Chem. Biol. Interact.*, Vol. 160, 1, 2006, pp. 1-40.
3. Peake JM, Suzuki K, Coombes JS, "The influence of antioxidant supplementation on markers of inflammation and the relationship to oxidative stress after exercise", *J. Nutr. Biochem.*, Vol. 18, 6, 2007, pp. 357-371.
4. Abbas SS, Schaalan MF, Bahgat AK, El-Denshary ES, "Possible potentiation by certain antioxidants of the anti-inflammatory effects of diclofenac in rats", *ScientificWorldJournal.*, 2014. doi: 10.1155/2014/731462.
5. Saavedra-Ramírez PG, Vásquez-Duque G, González-Naranjo LA, "Interleucina-6: ¿amiga o enemiga? Bases para comprender su utilidad como objetivo terapéutico", *IATREIA.*, Vol. 24, 2, 2011, pp. 157-166.
6. Scheller J, Grötzinger J, Rose-John S, "Updating interleukin-6 classic- and trans-signaling", *Signal. Transduction.*, Vol. 6, 4, 2006, pp. 240-259.
7. Zingg JM, "Modulation of signal transduction by vitamin E", *Mol. Aspects. Med.*, Vol. 28, 5-6, 2007, pp. 481-506.
8. Makpol S, Durani LW, Chua KH, Yusof YAM, Ngah WZW, "Tocotrienol-rich fraction prevents cell cycle arrest and elongates telomere length in senescent human diploid fibroblasts", *J. Biomed. Biotechnol.*, 2011; 2011: 506171.
9. Sayago A, Marín MI, Aparicio R, Morales MT, "Vitamina E y aceites vegetales", *Grasas y Aceites.*, Vol. 58, 1, 2007, pp. 74-66.
10. Jialal I, Devaraj S, "Scientific evidence to support a vitamin E and heart disease health claim: research needs", *J. Nutr.*, Vol. 135, 2, 2005, pp. 348-353.
11. Black PH, "Stress and the inflammatory response: A review of neurogenic inflammation", *Brain. Behav. Immun.*, Vol. 16, 6, 2002, pp. 622-653.
12. Glaser R, Kiecolt-Glaser JK, "Stress-induced immune dysfunction: Implications for health", *Nat. Rev. Immunol.*, Vol. 5, 3, 2005, pp. 243-251.
13. Charmandari E, Tsigos C, Chrousos G, "Endocrinology of the stress response", *Annu. Rev. Physiol.*, Vol. 67, 2005; pp. 259-284.
14. Petrovsky N, "Towards a unified model of neuroendocrine-immune interaction", *Immunol. Cell. Biol.*, Vol. 79, 4, 2001, pp. 350-357.
15. Ruzek MC, Miller AH, Opal SM, Pearce BD, Biron CA, "Characterization of early cytokine responses and an interleukin-6-dependent pathway of endogenous glucocorticoid induction during murine cytomegalovirus infection", *J. Exp. Med.*, Vol. 185, 7, 1997, pp. 1185-1192.
16. Xing Z, Gaudie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, Achong MK, "IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses", *J. Clin. Invest.*, Vol. 101, 2, 1998, pp.311-320.
17. Shils EM, Olson AJ, Shike M, Ross CA, "Vitamina E," in *Nutrición en salud y enfermedad* (McGraw-Hill Interamericana., México, DF, 2002), Chapter 19, pp. 401-420.
18. Febles FC, Soto FC, Saldaña BA, García TBE, "Funciones de la vitamina E, Actualización", *Rev. Cubana. Estomatol.*, Vol. 40, 1, 2002, pp. 28-32.
19. Gabay C, "Interleukin-6 and chronic inflammation", *Arthritis. Res. Ther.*, Vol. 8, Suppl 2:S3, 2006.
20. International Society for the Advancement of Kinanthropometry (ISAK). Consultado en la w.w.w. el 12 de abril de 2015 en: <http://www.isakonline.com/>



21. Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud. Consultado en la w.w.w. el 22 de marzo de 2015 en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/compi/rlgsmis.html>
22. Food and Drug Administration (FDA). Consultado en la w.w.w. el 22 de marzo de 2015 en: <http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/SCOGS/ucm260987.htm>
23. Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud. Consultado en la w.w.w. el 22 de marzo de 2015 en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/compi/rlgsmis.html>