

## ENZIMAS ANTIOXIDANTES Y MARCADORES DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2.

ANTIOXIDANT ENZYMES AND LIPIDIC PEROXIDATION MARKERS IN PATIENTS WITH DIABETES MELLITUS TYPE 2 .

Gregoria González-Mayo;<sup>1,2</sup> Ledia Triana;<sup>2</sup> Merry Smith;<sup>1</sup> Albany Tovar;<sup>1</sup> Román Cabello;<sup>1</sup> Carmen Teresa Uceró;<sup>3</sup> María del P. Navarro;<sup>1</sup> Marqjuly Camacho;<sup>1</sup> Hember Vicci;<sup>1</sup> María. Lizardo;<sup>1</sup> Mariela López<sup>1</sup>

### ABSTRACT

*Oxidative Stress is a process characterized by a biochemical imbalance between excessive production of reactive oxygen species and deficiencies of the antioxidant mechanisms. In patients with type 2 diabetes mellitus, it has been associated with constant hyperglycemia that characterizes this disease. Oxidative stress state through the determination of antioxidant enzymes: Superoxide Dismutase, Glutathione Peroxidase and 8-Isoprostane and malondialdehyde as a lipid peroxidation marker, In 70 patients with diabetes type 2 and 71 subjects without diabetes (control group), was evaluated in this investigation. There was evidence that the Superoxide Dismutase and Glutathione Peroxidase enzymes were found to be significantly lower in patients with diabetes type 2 compared to the control group ( $p < 0.05$ ). The levels of 8-Isoprostane and malondialdehyde were found to be significantly higher in patients with diabetes type 2 compared to the control group ( $p = 0.0038$ ). A significant correlation between the activity of Superoxide Dismutase, 8-Isoprostane and malondialdehyde with the values of glycemia, glycosylated hemoglobin and lipid profile were observed. These results suggest that the continued exposure of the cell to free radicals leads to the increase of lipid peroxidation and a decrease in the antioxidant enzymes Superoxide Dismutase and Glutathione Peroxidase which rises the oxidative stress status in these patients. In conclusion, the determination of the antioxidant enzymes, 8-Isoprostane and malondialdehyde allows the integral evaluation of the state of oxidative stress, the early diagnosis and prevention of the most frequent complications, contributing to improve the well-being and quality of life in these patients.*

**KEY WORDS:** diabetes mellitus type 2, oxidative stress, superoxide dismutase, glutathione peroxidase.

### RESUMEN

*El Estrés Oxidativo es un proceso caracterizado por un desequilibrio bioquímico entre una excesiva producción de especies reactivas de oxígeno y deficiencias de los mecanismos antioxidantes. En los pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2, se ha asociado con la hiperglicemia constante que caracteriza esta enfermedad. En esta investigación se evaluó el estado de estrés oxidativo a través de la determinación de las enzimas antioxidantes: Superóxido Dismutasa, Glutatión Peroxidasa y como marcador de peroxidación lipídica el 8-Isoprostano y malonildialdehído, en 70 pacientes con diabetes tipo 2 y 71 sujetos sin diabetes (grupo control). Se evidenció que las enzimas Superóxido Dismutasa y Glutatión Peroxidasa resultaron ser significativamente inferiores en los pacientes con diabetes tipo 2 comparados con el grupo control ( $p < 0,05$ ). Los niveles de 8-Isoprostano y de malonildialdehído resultaron ser significativamente superiores en pacientes con diabetes tipo 2 comparados con el grupo control ( $p = 0,0038$ ). Se observó una correlación significativa entre la actividad de Superóxido Dismutasa, 8-Isoprostano y malonildialdehído con los valores de glicemia, hemoglobina glicosilada y perfil lipídico. Estos resultados sugieren que la continua exposición de la célula a radicales libres conlleva al aumento de la peroxidación lipídica y una disminución de las enzimas antioxidantes Superóxido Dismutasa y Glutatión Peroxidasa que aumenta el estado de estrés oxidativo en estos pacientes. En conclusión la determinación de las enzimas antioxidantes, 8-Isoprostano y malonildialdehído permite la evaluación integral del estado de estrés oxidativo, el diagnóstico precoz y prevención de las complicaciones más frecuentes, contribuyendo a mejorar el bienestar y calidad de vida en estos pacientes.*

**PALABRAS CLAVE:** diabetes mellitus tipo 2, estrés oxidativo, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa.

Recibido: Marzo/2017 Aprobado: Mayo/2017

<sup>1</sup>Unidad de Investigación en Lípidos y Lipoproteína (INLIP). Facultad de Ciencias de la Salud-Sede Aragua. Universidad de Carabobo. <sup>2</sup>Instituto de investigación de Ciencias Biomédicas "Francisco Javier Triana" (BIOMED) Facultad de Ciencias de la Salud-Sede Aragua. Universidad de Carabobo. <sup>3</sup>Laboratorio de Investigaciones humanistas aplicadas a la educación odontológica (LIH-FO). Facultad de Odontología. Universidad de Carabobo.

Correspondencia: gonzalezmayogregoria@gmail.com

### INTRODUCCIÓN

El estrés oxidativo (EOx) es un proceso caracterizado por un desequilibrio bioquímico entre una excesiva producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y deficiencias de los mecanismos antioxidantes, lo cual conlleva a la alteración de la homeostasis oxidoreducción intracelular, conduciendo así al deterioro celular.<sup>1,2</sup> Para equilibrar la respuesta oxidante el organismo dispone de una serie de sistemas antioxidantes que contrarrestan la generación de radicales libres (RL).<sup>2</sup> Estas defensas antioxidantes, en

ocasiones, no son capaces de contrarrestar las concentraciones de RL, ya sea por un aumento exagerado en la producción de estos últimos o por una disminución de las primeras, lo cual generará el estado metabólico de estrés oxidativo (EOx), que en última instancia puede llevar a la muerte celular. Este estrés oxidativo puede ser amplificado y propagado por un ciclo auto catalítico de estrés metabólico, y producir daño tisular y muerte celular, lo que conduce a su vez a un aumento simultáneo en la producción de RL y compromete los mecanismos de remoción de éstos, con la consiguiente exacerbación de los procesos patológicos.<sup>2</sup>

Los sistemas de defensa antioxidantes son, micro y macromoléculas con capacidad antioxidante y también enzimas antioxidantes endógenas y exógenas o enzimas asociadas constituidas por una serie de moléculas, a través de las cuales la célula anula la reactividad y/o inhibe la generación de RL.<sup>3</sup> Entre los enzimáticos tenemos superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GT) y catalasa (CAT)<sup>2,3</sup> y otras enzimas no vinculadas directamente como lo son: los sistemas de transporte y de renovación de lípidos y proteínas: dentro los cuales se encuentran las proteasas celulares, que son las encargadas de la eliminación de las proteínas alteradas oxidativamente, que son, a su vez, fuente generadora de más RL; entre estas enzimas se encuentran la proteasa multicatalítica y la ubiquitina. Los sistemas de reparación de ADN, incluidos entre los llamados antioxidantes terciarios y los sistemas regeneradores de NADPH, Glutatión reductasa: gracias a ella se regenera glutatión reducido una vez que éste se ha oxidado. Las transferasas, quinonas reductasas, metionina sulfoóxido reductasa y hemoxigenasa, que pueden prevenir la formación de RL mediante el ciclado de electrones.<sup>3</sup>

La enzima SOD pertenece a las metaloenzimas que cataliza la reacción de destrucción de los radicales superóxido mediante su transformación en oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno, el cual puede ser destruido a su vez, por las enzimas CAT o GPx.<sup>2</sup> A su vez, la GPx, se encarga de eliminar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La GPx y la glutatión reductasa (GRd) se encuentran formando parte de un sistema antioxidante (GPx/GRd). La GPx comparte su sustrato con la catalasa, pero además puede reaccionar de manera efectiva con lípidos y otros hidroperóxidos orgánicos, catalizando la reducción de diferentes hidroperóxidos (ROOH y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) usando glutatión reducido (GSH), contribuyendo a la protección de las células del daño oxidativo.<sup>3</sup> Sin embargo, la evaluación de estos biomarcadores ha sido dispersa y estudiado de manera estática, interpretando al EOx como el incremento de las biomoléculas oxidadas o la disminución de los

componentes antioxidantes intracelulares y extracelulares; sin tomar en cuenta que el EOx integra el efecto a la exposición a oxidantes acoplado con los mecanismos protectores de manera dinámica.

Las ERO son sustancias evanescentes por lo que su estimación dentro de los sistemas integrados como modelos animales y humano es muy compleja, por ende, para determinar el daño causado por estas, se han propuesto marcadores biológicos de EOx. Uno de los marcadores utilizados se refiere a la determinación de la peroxidación lipídica, a través de la cuantificación de productos intermedios y finales de peróxidos de lípidos como el malondialdehído (MDA) e isoprostanos, donde se considera al 8-isoprostano como el mejor indicador oxidante; ya que son productos activos, derivados del metabolismo del ácido araquidónico; siendo su formación un indicador de peroxidación lipídica *in vivo*.<sup>4</sup> Otro marcador para medir EOx, es la determinación de la actividad de las enzimas antioxidantes como: SOD, GPx, y CAT, además de componentes no enzimáticos por medio de la capacidad antioxidante total.<sup>3,4</sup> Recientemente se ha empleado para determinar la capacidad total oxidante, la determinación en sangre de metabolitos de ERO, por sus siglas en inglés (ROMs), que es capaz de detectar una producción moderada del anión hidroperóxido.<sup>5</sup>

El EOx se ha relacionado con numerosas enfermedades crónicas y degenerativas, tales como: aterosclerosis, Alzheimer, procesos inflamatorios, diversos tipos de cáncer, diabetes mellitus (DM),<sup>6</sup> entre otros; ya que las ERO y los RL tienen la habilidad de oxidar y dañar directamente al DNA, proteínas y lípidos, favoreciendo la presencia o las complicaciones de estas enfermedades.<sup>2,7</sup> La DM tipo 2, es una enfermedad multifactorial producida por la deficiencia absoluta o relativa de la secreción de insulina o por una insensibilidad de los tejidos periféricos a la acción insulínica, lo cual trae como consecuencia una hiperglicemia constante.<sup>8</sup> Se ha demostrado que la hiperglicemia inducida por la generación del radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) a nivel mitocondrial es el desencadenante inicial del círculo vicioso del EOx en la DM.<sup>1,2</sup>

La DM es una condición sinequanon para que exista EOx. Los radicales oxidantes, como el O<sub>2</sub><sup>-</sup> o hidroxilo (OH<sup>-</sup>) están aumentados de forma constante en la diabetes, a través de varios mecanismos como el aumento de prostanoïdes, el aumento de la NADH sintetasa, por el mecanismo de la pseudohipoxia, la autooxidación de la glucosa y la falta de algunos de los sustratos o cofactores normales de la sintetasa que

ocasionan el funcionamiento anormal de ésta; trayendo como consecuencia la producción excesiva de O<sub>2</sub><sup>-</sup>, que hace que estos pacientes estén más propensos a sufrir de EOX y potencialmente éste sea, la causa de las complicaciones macro y microvasculares, que contribuyen a desarrollar enfermedades degenerativas.<sup>6,9</sup> Así mismo se ha señalado que el EOX está implicado en la patogénesis de la DM y las alteraciones metabólicas que caracterizan a la DM tipo 2, como hiperglicemia, dislipidemia y resistencia a la insulina; estas complicaciones producen aumento del EOX, activación de la proteína Kinasa C (PKC) y activación de los receptores de los productos de glicosilación avanzada, lo que ocasiona excesiva producción de RL y la disminución de la actividad antioxidante de las enzimas SOD, GPx, y CAT.<sup>10,11</sup>

Estudios realizados por Ozdemir y cols.,<sup>11</sup> reportan una disminución significativa en la actividad de la enzima CAT ( $p < 0,005$ ) en los pacientes con diabetes en comparación con los del grupo control, y valores de MDA aumentados en las muestras de los pacientes con diabetes; no obstante la disminución de la SOD no fue significativa en los pacientes con diabetes; ( $p > 0,05$ ), evidenciando estos resultados un estado de EOX en los pacientes con DM que conlleva a la peroxidación lipídica y a la disminución de los niveles de antioxidantes, ya que un mayor nivel de glucosa en plasma representa un aumento de la peroxidación lipídica mediada por RL. Así mismo autores como Guerra y cols.,<sup>12</sup> y Kasapoglu y cols.,<sup>13</sup> coinciden en que, los pacientes con DM exhiben un aumento del EOX, posiblemente por una alteración en los sistemas antioxidantes, lo que sugiere un defecto en la capacidad de eliminar las ERO. Sin embargo, otros autores difieren que los niveles de antioxidantes estén disminuidos.<sup>14, 15</sup>

Ciertamente no está totalmente claro como está el EOX en estos pacientes, y la DM en Venezuela es una de las enfermedades crónicas más frecuentes, de acuerdo a datos suministrados por el Ministerio Popular para la Salud (MPPS)<sup>16</sup> está clasificada como la séptima causa de muerte, con una prevalencia de 6,5-10%. Debido a esta situación y dado que en Venezuela y el estado Aragua los estudios de EOX en pacientes DM tipo 2 son pocos, se planteó como objetivos evaluar el comportamiento de los sistemas oxidantes-antioxidantes y el estado de EOX en pacientes con DM tipo 2, mediante indicadores enzimáticos antioxidantes como GPx y SOD, así como, marcadores de peroxidación lipídica, el 8-isoprostano y MDA, y correlacionar la actividad de las enzimas SOD, GPx, los niveles de 8-isoprostano y MDA con los parámetros de control metabólico: glicemia, HbA<sub>1c</sub> y perfil lipídico en pacientes con DM tipo 2 y en

sujetos sin diabetes (grupo control). Valorar mediante marcadores biológicos el EOX, aportando información importante para la evaluación integral del paciente con diabetes.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación de tipo descriptiva, correlacional y de corte transversal, fue llevada a cabo en las instalaciones del Instituto de Investigaciones Biomédicas "Francisco Javier Triana" (BIOMED-UC). Se determinó y analizó la actividad enzimática de la GPx, SOD y los niveles de 8-isoprostano y MDA a 70 pacientes diagnosticados clínicamente con DM tipo 2 (según los criterios de ADA y OMS)<sup>17</sup> de ambos géneros, (femenino y masculino) con edades comprendidas entre 57±6 años y un tiempo de evolución de la DM de 3-14 años (Grupo 2) y 71 sujetos sin diabetes (sin patologías aparente) de ambos géneros (femenino y masculino), con edades comprendida entre 42±8 años (Grupo 1), que asistieron a consulta de medicina interna en el Ambulatorio de Santa Rita, Municipio Linares Alcántara del Estado Aragua, en el período Enero-Agosto del año 2014.

Para la selección de la muestra se tomaron en cuenta los siguientes criterios de inclusión: los sujetos sin diabetes seleccionados debieron presentar: glicemia <120mg/dL y HbA<sub>1c</sub> ≤6,5%; sin infecciones agudas con conteo leucocitario <9000cel/mm<sup>3</sup> y PCR ultra-sensible <10mg/dL; sin diagnóstico de enfermedad cardiovascular, enfermedades hepáticas y/o renales; consumo de cigarrillo (< a 10 cigarrillos al día); no consumidor crónico de alcohol; sin tratamiento con antioxidantes y de ácido acetilsalicílico (Aspirina); sin dislipidemia (Colesterol <200mg/dL, HDLc >40mg/dL y Triglicéridos <150mg/dL).

Una vez seleccionada la muestra a todos los sujetos seleccionados se les informó y explico acerca de los objetivos del estudio, así como los beneficios y posibles riesgos a los cuales pudieran estar sometidos y sobre la confidencialidad de todos los exámenes que se realizarían en este estudio, según lo establecido en el Código de Ética para la Vida, del Ministerio de Ciencia y Tecnología de la República Bolivariana de Venezuela.<sup>18</sup> y la Declaración de Helsinki.<sup>19</sup> Aquellos pacientes y sujetos sin diabetes que aceptaron formar parte de la investigación se les entregó un formato de consentimiento informado que fue previamente avalado por el comité de bioética del BIOMED-UC. Se les solicitó la firma, respetándose el principio de autonomía y anonimato.<sup>18</sup> Además, se les realizó una evaluación clínica por un médico internista, se efectuó una entrevista

estructurada conformada por una serie de preguntas donde se registraron datos, tales como, antecedentes familiares con diabetes, hábitos, tipo de tratamiento y tiempo de evolución de la DM.

Posteriormente, se llevó a cabo la toma de muestra sanguínea a los pacientes (12 horas de ayuno). Se realizaron pruebas para determinar los niveles de: glucosa, hemoglobina glicosilada, hematología completa, colesterol total y fraccionado, triglicéridos; creatinina, ácido úrico. El análisis correspondiente se efectuó en la Unidad de Investigación de Lípidos y Lipoproteínas (INLIP) y posteriormente se procedió a la entrega de los resultados de laboratorio.

La determinación de glucosa, colesterol y triglicéridos en sangre se realizó por métodos enzimáticos colorimétricos, del estuche de la casa comercial Biosciencie. Para la determinación de lipoproteína de alta densidad (HDLc), se utilizó la precipitación diferencial de las lipoproteínas con soluciones de polianiones que a su vez, fueron determinadas mediante el mismo método utilizado para colesterol total. La concentración de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y las lipoproteínas de baja densidad (LDL) en sangre se obtuvieron por la aplicación del método indirecto de la fórmula de Friedewald,<sup>20</sup> que solo es utilizada para las muestras que no presenten quilomicrones y con concentración de triglicéridos inferior a 400 mg/dL.

La determinación de hemoglobina glicada (HbA1c) se realizó a través del método de cromatografía de baja presión, utilizando un analizador DiaSTAT hemoglobin.<sup>21</sup>

Para la determinación de la actividad de SOD en suero se utilizó un kit de ensayo inmunoenzimático (ELISA) de la casa comercial Cayman Chemycal,<sup>22</sup> el cual usa sal tetrasódica para la detección de radicales superóxido generados por la xantina oxidasa e hipoxantina en suero. El ensayo de SOD midió los tres tipos de SOD (Cu/Zn, Mn y FeSOD) a 440-460nm.

La determinación de la actividad de GPx en suero, se midió indirectamente por una reacción acoplada con la glutatión reductasa (GR). Glutatión oxidado (GSSG), producida en la reducción de hidroperóxido de GPx, donde se recicla a su estado reducido por los recursos genéticos y NADPH. La oxidación de NADPH a NADP acompañada por una disminución en la absorbancia que fue medida 340nm.<sup>23</sup>

La determinación de 8-isoprostano, se realizó mediante un método enzimático competitivo, de la casa comercial Cayman Chemycal.<sup>24</sup>

La determinación de malondialdehído (MDA) se realizó por el método para determinación de peroxidación lipídica de Esterbauer y Cheeseman.<sup>25</sup>

#### Análisis de datos

Para el análisis de los datos se emplearon métodos estadísticos descriptivos, expresados en valores promedios y desviación estándar ( $X \pm DS$ ). Al aplicar pruebas de normalidad se comprobó que no existía una distribución normal ( $p < 0,05$ ) en los resultados de SOD, GPx, 8-Isoprostano y MDA, por lo que se aplicó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney, para la comparación entre grupos y para las variables que cumplieron con distribución normal se empleó la prueba de "t" student para dos muestras independientes. Para correlacionar la actividad de las enzimas SOD, GPx, MDA y 8-isoprostano con parámetros de control metabólico: glicemia, HbA1c y perfil lipídico, se utilizó la prueba de correlación de Pearson y para las variables cualitativas se realizó una correlación de Spearman. Los datos fueron analizados a través de la aplicación del programa estadístico computarizado Statistix versión 10.0, con un nivel de significancia  $p < 0,05$  y grado de confianza de 95%.

#### RESULTADOS

El análisis de las variables antropométricas de los pacientes con DM tipo 2 y sujetos sin diabetes (Tabla 1), muestran que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de pacientes con diabetes y el grupo control, en cuanto a peso y talla ( $p > 0,05$ ); con respecto al índice de masa corporal e índice cintura-cadera si hubo diferencias estadísticamente significativa para ambos grupos ( $p < 0,05$ ), lo que refleja que los mismos eran comparables en cuanto las variables peso y talla.

Con el fin de conocer las características clínicas de los pacientes con DM tipo 2 y sujetos sin diabetes (Tabla 1), se les llenó una ficha, en donde se describen las variables que tenían mayor relación clínica en los pacientes con DM tipo 2 en comparación con los individuos del grupo control; de acuerdo a este registro, 76,9% de los pacientes con DM tipo 2, tienen antecedentes familiares de diabetes, mientras que en el grupo control sólo 33% presenta antecedentes familiares de diabetes. En los pacientes con diabetes, 69% eran del género femenino, menopáusicas, con una evolución de la enfermedad de tres hasta catorce años; 92% de los pacientes con DM tipo 2 se encontraban en tratamiento con hipoglicemiantes orales y 8% sin tratamiento.

Los parámetros bioquímicos y metabólicos de los pacientes con DM tipo 2 y los sujetos del grupo

**Tabla 1.** Características antropométricas y clínicas de los pacientes con DM tipo 2 y sujetos sin diabetes (grupo control)

<b>Variab</b> les	<b>Grupo 1</b> (n=71) ( $\bar{X} \pm DS$ )	<b>Grupo 2</b> (n=70) ( $\bar{X} \pm DS$ )	<b>p valor</b>
<b>Peso (Kg.)</b>	63±8,7	68±11,8	0,0967(NS)
<b>Talla (m<sup>2</sup>)</b>	1,63±0,08	1,61±0,07	0,3191(NS)
<b>ICC</b>	0,86±0,01	0,91±0,1	0,0115*
<b>TEV(años)</b>	-	9±6	0,0071*
<b>Menopausia</b>	1	18	-
<b>Antecedentes familiares con diabetes</b>	6	20	-
<b>Edad</b>	42±8	57±6	0,001*
<b>Género (F:M)</b>	12:6	18:8	-
<b>Tratamiento con hipoglicemiantes</b>	-	24	-
<b>CC</b>	-	8	-

Grupo 1: Grupo Control Grupo 2: Pacientes con DM tipo 2; ICC: Índice cintura-cadera IMC: Índice de masa corporal, TEV: tiempo de evolución de la Diabetes Mellitus tipo 2; Tto: Tratamiento; CC: Complicaciones crónicas. F: Femenino. M: Masculino. NS: no significativo (p>0,05) \*: significativo (p<0,05)

**Tabla 2.** Parámetros bioquímicos y metabólicos de los pacientes con DM tipo 2 y sujetos sin diabetes.

<b>Variab</b> les	<b>Grupo 1</b> (n=71) ( $\bar{X} \pm DS$ )	<b>Grupo 2</b> (n=70) ( $\bar{X} \pm DS$ )	<b>p valor</b>
<b>Glicemia( mg/dL)</b>	74±11	168±89	0,0001 ***
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	0,8±0,2	0,8±0,1	0,0642(NS)
<b>Acido úrico(mg/dL)</b>	3,1±0,9	3,3±1,4	0,0334 *
<b>Colesterol (mg/dL)</b>	154±23	214±85	0,0004 ***
<b>HDL (mg/dL)</b>	42±10	31±10	0,0025 **
<b>LDL (mg/dL)</b>	95±24	146±86	0,0034 ***
<b>Triglicéridos (mg/dL)</b>	86±30	186±170	0,0002 ***
<b>HbA<sub>1c</sub> (%)</b>	5,3±0,4	8,9±1,8	0,0003 ***

Grupo 1: Grupo Control; Grupo 2: Pacientes con DM tipo 2; NS: no significativo (p>0,05) \*: significativo (p<0,05)

control (Tabla 2), fueron significativamente diferentes ( $p<0,05$ ) al ser comparados ambos grupos para todas las variables en estudio, excepto para la creatinina. Estos resultados demuestran que los individuos que conformaban el grupo control no presentaban ninguna alteración metabólica, basándonos en los valores pre-establecidos como referenciales para dichas determinaciones; así mismo demuestra que los pacientes con DM tipo 2 presentan un mal control metabólico por presentar valores elevados para las variables glicemia, HbA1c, colesterol total y fraccionado y triglicéridos. Todos los pacientes con diabetes, tenían concentraciones significativamente más altas ( $p<0,05$ ) de triglicéridos, colesterol total, LDL colesterol y una menor concentración de HDL colesterol que en los individuos del grupo control.

La actividad de SOD, es un mecanismo de defensa antioxidante primario, enzima que se encarga de dismutar al RL superóxido; en el presente trabajo la actividad de la enzima SOD (Figura 1), resultó ser significativamente inferior en los pacientes con DM tipo 2 ( $0,0569\pm 0,0548$ U/min/mL) comparados con el grupo control ( $0,0570\pm 0,035$ U/min/mL;  $p=0,007$ ). La actividad de la enzima GPx (Figura 2), se encontró disminuida en el grupo de pacientes con DM tipo 2 en comparación con el grupo control ( $1,89\pm 0,90$ ;  $2,22\pm 143$  nmol/min/mL,  $p=0,018$ ).

En esta investigación se evaluó indirectamente la generación de ERO en los pacientes con diabetes y sujetos sin diabetes, con la determinación de los niveles de 8-isoprostano (Figura 3) y MDA (Figura 4) como marcadores de peroxidación lipídica. Los niveles de 8-isoprostano resultaron ser significativamente superiores ( $p<0,005$ ) en los pacientes con DM tipo 2 ( $117\pm 57$  vs  $67\pm 47$ pg/mL;  $p=0,0038$ ) comparados con el grupo control. De igual forma se encontró que los niveles de MDA (Figura 4) fueron altamente significativos ( $p<0,005$ ), en los pacientes con diabetes ( $5,4731\pm 1,1522$ mg/L) en comparación con el grupo control ( $2,4278\pm 0,6066$ mg/L;  $p=0,042$ ).

Los niveles de 8-isoprostano al ser relacionados con las variables estudiadas y las determinaciones de laboratorio clínico que evalúan el control metabólico en los pacientes con diabetes (tabla 3), se observó que están asociados positivamente con la edad, tensión arterial, glicemia, HbA1c, complicaciones crónicas y menopausia., de igual manera se encontró una correlación positivamente de los niveles de MDA con las diferentes variables estudiadas (tabla 4), edad, valores de índice cintura cadera (ICC), tensión arterial diastólica (TAD), tensión arterial sistólica

(TAS), glicemia, triglicéridos, colesterol, hemoglobina glicosilada, complicaciones crónicas (CC), menopausia, y tratamiento y una correlación negativa significativa con HDL ( $p<0,05$ ). En el presente trabajo se evidencian correlaciones positivas altamente significativas entre niveles MDA y 8- Isoprostanos con las diferentes determinaciones de laboratorio que evalúan el control metabólico en los pacientes con DM tipo 2.

## DISCUSIÓN

Al evaluar en esta investigación el estado de estrés oxidativo en los pacientes con diabetes tipo 2 a través de la determinación de las enzimas antioxidantes: SOD, GPx (figura 1 y 2) y de los niveles de 8-Isoprostano y MDA (figura 3 y 4) como marcador de peroxidación lipídica, se encontró que en los pacientes con DM tipo 2 existe un aumento del EROx. Las altas concentraciones de 8-isoprostano y MDA están relacionados con el aumento de generación de ERO, que disminuyen la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y GPx, aumentando más el estado de EROx en estos pacientes y este pudiera afectar la función endotelial y contribuir al desarrollo y mantenimiento de las complicaciones en los pacientes con DM tipo 2.

La actividad de las enzimas antioxidantes, SOD (Figura 1) y GPx (Figura 2) resultaron ser significativamente inferior en los pacientes con DM tipo 2, comparados con el grupo control ( $p<0,005$ ). Estos resultados se relacionan con los reportados por Bravo y cols.,<sup>26</sup> y Vergaray y cols.,<sup>27</sup> quienes señalan que los pacientes con diabetes presentaron una actividad de SOD significativamente inferior al grupo control ( $p<0,05$ ). La SOD se inhibe cuando se expone a altas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En tal sentido Guerra y cols.,<sup>28</sup> describen que la actividad de las enzimas GPx y SOD en los pacientes con diabetes estaban disminuidas (SOD= $140\pm 7$ ; GPx= $3184\pm 222$ ) en comparación con el grupo de individuos sanos (SOD= $198\pm 24$ ; GPx= $6595\pm 1225$ ,  $p<0,05$ ). Otros investigadores han reportado disminución de la actividad GPx en eritrocitos, tal es el caso de los trabajos realizados por Kikidillid y cols.,<sup>14</sup> donde la actividad eritrocitaria de GPx disminuyó en los pacientes con diabetes en comparación con el grupo control.

El incremento de la actividad de SOD es reflejo de una elevada generación de anión superóxido en la célula y de eliminación por esta enzima. Sin embargo, una intensa producción de este radical por un tiempo prolongado agota la estimulación de la actividad de esta enzima, puesto que el producto de la reacción puede inhibirla, por otro lado la glicación no enzimática de la SOD hace que la enzima se inactive; esto explicaría la

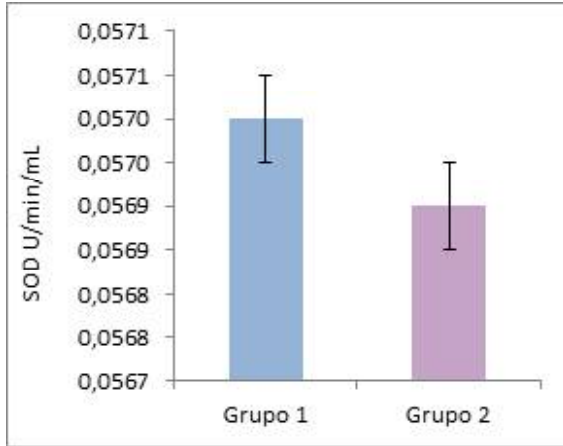


Figura 1. Actividad de la enzima SOD en grupo control (Grupo 1) y pacientes con DM tipo 2 (Grupo 2)

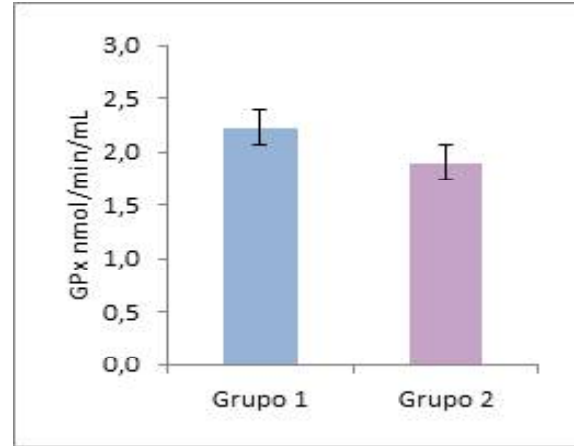


Figura 2. Actividad de la enzima GPx en grupo control (Grupo 1) y pacientes con DM tipo 2 (Grupo 2)

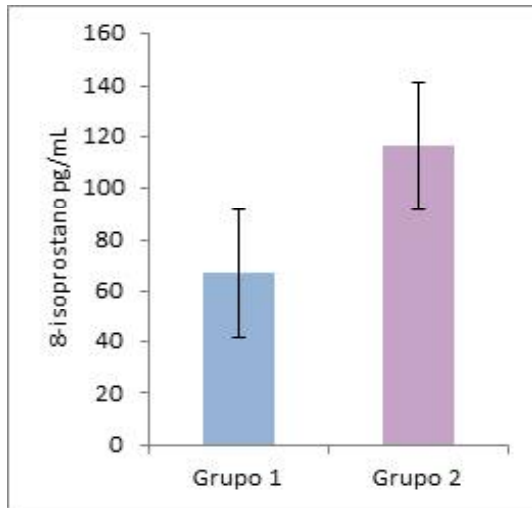


Figura 3. Niveles de 8-isoprostano en grupo control (Grupo 1) y pacientes con DM tipo 2 (Grupo 2)

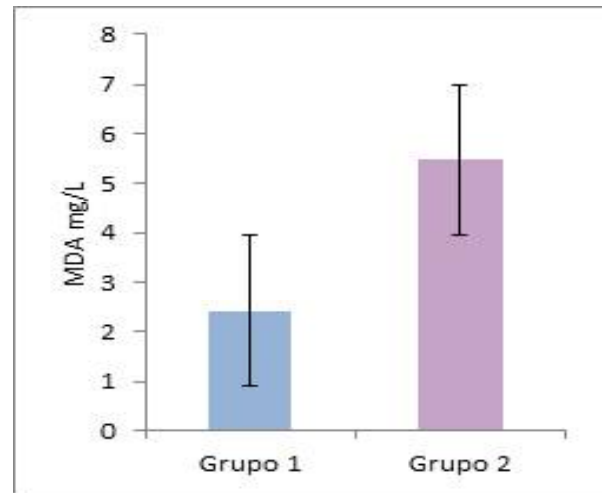


Figura 4. Niveles de MDA en grupo control (Grupo 1) y paciente con DM tipo 2 (Grupo 2)

relativa disminución de la actividad de SOD en los pacientes con diabetes en este estudio.

Los resultados en esta investigación sobre la disminución de la actividad de las enzimas SOD y GPx en pacientes con DM tipo 2, reflejan el incremento de ERO en estos pacientes. Todo esto sugiere que una exposición a elevadas concentraciones de glucosa sanguínea puede generar un incremento de ERO, que reaccionan con los sistemas antioxidantes primarios del organismo, provocando su disminución en concentración. Además sugiere que las ERO generadas ante tal estímulo son capaces de inducir la síntesis de

otras barreras defensivas como las enzimas antioxidantes Cu/Zn-SOD, CAT y GPx. No obstante, cuando la exposición a altas concentraciones de glucosa es mantenida durante mucho tiempo, la actividad de las enzimas disminuye en los pacientes con diabetes. Esto pudiera deberse a que la hiperglicemia crónica mantiene un ERO crónico, capaz de dañar múltiples moléculas de importancia biológica entre las que se pueden encontrar el ADN celular y las enzimas anteriormente señaladas.<sup>27</sup>

La determinación de los lipoperóxidos y el estado de antioxidantes son importantes para elucidar los efectos que ejercen los RL de oxígeno en los sistemas

**Tabla 3.** Relación del 8-isoprostano con las variables estudiadas en pacientes con diabetes mellitus tipo 2.

Variables	Coeficientes de correlación	
	r	P
Edad (años)	0,3689	0,0142*
TAS (mmHg)	0,3411	0,0239*
Glicemia (mg/dL)	0,3933	0,0087 *
HbA <sub>1c</sub> (%)	0,4048	0,0068*
TEV (años)	0,3940	0,0085 *
CC	0,3356	0,0264 *
Menopausia	0,3850	0,0103 *

TAS: Tensión arterial sistólica, TEV: Tiempo de evolución de la DM tipo 2  
 CC: Complicaciones crónica. NS: no significativo (p>0,05) \*: significativo (p<0,05).

**Tabla 4.** Relación de los niveles de MDA con las variables estudiadas en pacientes con diabetes mellitus tipo 2..

Variables	Coeficientes de correlación	
	r	P
Edad (años)	0,6628	0,0002*
ICC	0,4369	0,0023*
TAD (mmHg)	0,3573	0,0177*
TAS (mmHg)	0,3705	0,0137*
Glicemia (mg/dL)	0,0764	0,0001*
Triglicéridos (mg/dL)	0,5448	0,0002*
Colesterol (mg/dL)	0,3582	0,0174*
HbA <sub>1c</sub> (%)	0,8810	0,0004*
HDL (mg/dL)	-0,4264	0,0042*
LDL (mg/dL)	0,3357	0,0269*
CC	0,3590	0,0172*
TEV(años)	0,7776	0,0000*

ICC: Índice cintura-cadera, TAD: Tensión arterial diastólica; TAS: Tensión arterial sistólica, CC: Complicaciones crónicas, TEV: tiempo de evolución de la DM tipo 2, Tto: Tratamiento. NS: no significativo (p>0,05) \*: significativo (p<0,05)..



biológicos.<sup>2</sup> Si bien el MDA es el producto final más abundante de los aldehídos resultantes de la lipoperoxidación, la reacción del TBARS con otros grupos aldehídos productos de reacciones redox es evidente; razón por la cual actualmente la evaluación de la peroxidación lipídica se puede realizar a través de la determinación de 8-isoprostano; es por ello que esta investigación se evaluó la producción de ERO a través de la determinación de la concentración de 8 isoprostano (figura 3); evidenciándose que los valores de 8-Isoprostanos en los pacientes con diabetes son significativamente más elevados en comparación con el grupo control ( $p < 0,05$ ). Esos resultados son similares a los reportados por Gopaul y cols.,<sup>29</sup> quienes encontraron que los valores de isoprostano en los pacientes con DM tipo 2 están incrementados ( $0,93 \pm 0,07 \text{ nM}$ ) en comparación con el grupo de sujetos sanos ( $0,28 \pm 0,04 \text{ nM}$ ;  $p < 0,05$ ).

Resultados semejantes fueron observados en esta investigación en relación con los valores de MDA en los pacientes con DM tipo 2, el valor medio de ácido tiobarbitúrico (TBARS) en el grupo de pacientes con DM tipo 2 (figura 4), resultó significativamente mayor que el grupo control ( $p < 0,05$ ), confirmando la sobreproducción de RL y la existencia de una elevada tasa de EOX; que podría afectar al 50-70% de las proteínas celulares. Estos resultados son similares a los reportados en el trabajo realizados por Solliman y cols.,<sup>30</sup> donde el aumento de los niveles de peróxidos lipídicos (TBARS) fue significativo en los pacientes con diabetes en comparación con los controles ( $p < 0,05$ ). Los resultados del aumento de los valores de 8-Isoprostanos y MAD en los pacientes con diabetes tipo 2, apoyan las primeras evidencias experimentales;<sup>31</sup> de la asociación entre el EOX y la hiperglucemia, las cuales muestran que los sujetos con diabetes tienen mayores niveles de sustancias reactivas al TBARS y los hidroperóxidos lipídicos como Isoprostanos. Esto indica que en los pacientes con DM hay una mayor generación de RL mediada por la producción de isoprostanos a partir del ácido araquidónico en los fosfolípidos de membrana y de las lipoproteínas y un alto de nivel de estrés oxidativo.

Evidentemente los isoprostanos están surgiendo como una nueva clase de productos biológicamente activos de gran interés para la evaluación tanto de la DM y sus complicaciones como de las enfermedades vasculares humana. Su formación in vivo refleja el proceso no enzimático de la peroxidación lipídica y se correlaciona con el control de la glicemia alterada; por lo que su determinación sería importante como un marcador bioquímico, abriendo la posibilidad de realizar investigaciones futuras que estudien inhibidores naturales y sintéticos de la peroxidación lipídica.

Al relacionar los niveles del 8-isoprostano con las determinaciones de laboratorio clínico que evalúan el control metabólico en los pacientes con diabetes (tabla 5). Se observó que estos están asociados positivamente con la edad, tensión arterial, glicemia, HbA1c, complicaciones crónicas y menopausia. Estos hallazgos sustentan los resultados de Likidilid y cols.,<sup>14</sup> que encontraron una correlación positiva estadísticamente significativa entre la edad, los niveles de MDA y la glucosa plasmática en ayunas; concluyendo que los pacientes con diabetes son susceptibles al EOX y a mayor nivel de glucosa mayor es la asociación con la peroxidación lipídica mediada por RL.

Los hallazgos en esta investigación sugieren que la edad, la menopausia, niveles elevados de glicemia, HbA1c incrementan su vulnerabilidad hacia el EOX y este contribuye posiblemente con las complicaciones crónicas en los pacientes con DM tipo 2. La hiperglicemia induce la producción excesiva de RL de oxígeno y por lo tanto aumenta la oxidación de las proteínas y de lípidos; condicionando a los pacientes de edad avanzada a sufrir una variedad de anomalías metabólicas,<sup>2</sup> dentro de las cuales destacan resistencia a la insulina, obesidad, dislipidemia, hipertensión, factores protrombóticos aumentando así el riesgo de enfermedades vasculares en estos pacientes. Indudablemente, la formación de isoprostanos en la bicapa lipídica por un mecanismo de RL como consecuencia de la hiperglicemia, puede contribuir de manera importante en las alteraciones e integridad de las membranas celulares, especialmente en las células del músculo liso, a través de la interacción con tromboxano A2, siendo éste un potente vasoconstrictor que puede alterar la función plaquetaria, también la unión del isoprostano con la LDL oxidada puede dar lugar a su adopción por macrófagos creando así placas ateroscleróticas.<sup>9</sup> Sin embargo todavía se discute, si la hiperglicemia per-se tiene alguna relación causal con las enfermedades cardiovasculares en los pacientes con DM. El EOX como una consecuencia de la hiperglucemia, ha sido considerado como un mecanismo potencial para la enfermedad vascular, la cual se encuentra aumentada en los pacientes con diabetes. La asociación establecida entre la aterosclerosis y la peroxidación de lípidos en el plasma dentro de la pared vascular, ha llevado a una renovación del interés en el EOX y su relación con la hiperglucemia, como un mecanismo potencial para la enfermedad cardiovascular aterosclerótica en pacientes con diabetes.<sup>9</sup>

La actividad antioxidante de las enzimas SOD y GPx y los niveles de 8-isoprostano, MDA y están relacionadas con las variables de control metabólico (Tabla 6). Encontrándose una correlación positiva

significativa entre: SOD y Triglicéridos ( $r=0,5829$ ;  $p=0,00002$ ). Estos resultados coinciden con los reportados por Vergara y cols.,<sup>27</sup> quienes determinaron los niveles HbA1c, SOD, GPx y MDA en pacientes con DM tipo 2, comparado con un grupo control, a fin de observar posibles diferencias entre ellos y correlaciones respectivas. Evidenciando en su trabajo una correlación positiva entre los niveles de Hb1Ac y SOD ( $r=0,164$ ;  $p<0,05$ ) y Hb1Ac y MDA ( $r=0,432$ ;  $p<0,05$ ). Se deduce que el elevado nivel de MDA está asociado con las complicaciones de la DM tipo 2, debido a la alta generación de RL conduciendo a un desbalance del sistema antioxidante, generando niveles bajos de GPx, niveles normales o ligeramente elevados de SOD frente al grupo control.

Una explicación puede estar dada por el hecho de que la insulina resistencia incrementa la actividad de la enzima acil CoA grasa oxidasa, la cual inicia la beta oxidación de los ácidos grasos con mayor producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La disminución en la actividad de la SOD provoca que se acumulen sustancias como el radical O<sub>2</sub><sup>-</sup>, y queda disponible para reaccionar con el Fe<sup>+3</sup>, y lo reduce al ion ferroso. De esta manera se inicia la reacción de Fenton, al combinarse el Fe<sup>+2</sup> con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y así contribuir a incrementar el daño al formar especies más dañinas como el radical ion hidroxilo (OH<sup>-</sup>), con el consiguiente daño a proteínas, lípidos y ADN.<sup>2</sup>

El aumento de RL, produce modificaciones en el factor de transcripción nuclear (NFκB), que es desfosforilado y se une a regiones promotoras del gen de la SOD (sod2), aumentando la expresión de la enzima SOD. Sin embargo; cuando hay un exceso de RL, los enzimas son insuficientes para frenar su proceso de propagación y estos son capaces de aumentar la concentración de marcadores proinflamatorios como la interleuquina 6 y el factor de necrosis tumoral alfa, los cuales son capaces de inhibir la expresión de la enzima lipoprotein lipasa (LPL) y por consiguiente una disminución de la captación de los ácidos grasos libres por los tejidos.<sup>33</sup> La asociación significativa entre los triglicéridos y SOD, indican que al incrementarse los niveles de triglicéridos disminuye la actividad de SOD, lo cual implica una menor capacidad antioxidante, y resulta en un mayor desbalance redox que expone aun más a las lesiones relacionadas con el Eox. De acuerdo a este hallazgo, puede considerarse que los triglicéridos constituyeron unas de las variables más fuertemente correlacionada con el Eox.

La actividad de la enzima GPx, no se asoció con ninguna de las variables de valoración de control metabólico de los pacientes con DM ( $p>0,05$ ). No

obstante se encontró una relación negativa significativa de la GPx con la concentración de creatinina sérica ( $r=-0,4782$ ;  $p=0,0012$ ). Lo que refleja que tienen una asociación inversamente proporcional, evidenciando que al aumentar Eox y disminuir las enzimas antioxidantes existe mayor posibilidad de aumentar la concentración de creatinina y de esta manera contribuir con las complicaciones a nivel renal en estos pacientes; en tal sentido Bequer y cols.,<sup>34</sup> señalan en su estudio realizados en ratas Wistar diabéticas, que la alteración de la determinaciones bioquímicas de perfil renal y marcadores de Eox, están relacionados en el estadio de evolución de la enfermedad, aun en estados incipientes de la diabetes las ratas diabéticas mostraban un daño renal, los valores séricos de creatinina y urea se encontraron aumentados significativamente respecto a los controles. Es ampliamente conocido que las complicaciones metabólicas y microvasculares de la DM se asocian con múltiples efectos sobre la función renal y, especialmente, el metabolismo de la creatinina. La elevación del parámetro se debe al complejo mecanismo de aumento de la tasa de filtración glomerular, para el cual se han planteado diversas causas aún no bien dilucidadas.<sup>35</sup> Dado que la creatinina es un marcador de evaluación renal, que aumenta sólo cuando se ha perdido en más de un 50 % de la función renal; sería de relevante interés la evaluación de la actividad de las enzimas antioxidantes, estado de Eox y su relación con la función renal en estos pacientes .

Finalmente, los resultados de este trabajo de investigación sugieren que en los pacientes con DM tipo 2 existe un aumento del Eox, dado que, las altas concentraciones de 8-isoprostano y MDA están relacionados con el aumento de generación de ERO, que a su vez disminuyen la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y GPx, aumentando más el estado de Eox en estos pacientes que ponen de manifiesto una serie de cambios que permiten un incremento en la formación de RL, entre los que cabe destacar: a) una disminución de concentraciones plasmáticas e intracelulares de antioxidantes, posiblemente como un resultado de su mayor consumo, producto de una mayor generación de RL; b) aumento de la concentración de sustancias plasmáticas que reaccionan con el TBARS, derivadas de la reacción de RL con lípidos; c) una mayor susceptibilidad de las lipoproteínas a oxidarse. Así pues se producen numerosos cambios que de forma indirecta permiten indicar que en la diabetes existe un marcado Eox.

Se concluye que la determinación de las enzimas antioxidantes SOD y GPx, y los marcadores de peroxidación lipídica 8-Isoprostano y MDA permiten la

evaluación integral del estado de estrés oxidativo en los pacientes con diabetes tipo 2. Favoreciendo el diagnóstico precoz y la prevención de las complicaciones más frecuentes como son las enfermedades cardiovasculares, nefropatías, neuropatías, retinopatías, entre otras; contribuyendo de esta manera a mejorar el bienestar y calidad de vida en estos pacientes.

Se recomienda evaluar el estado de oxidación del paciente con DM tipo 2, ya que, este ofrece una serie de interesantes oportunidades para explorar la asociación entre pro-oxidantes/antioxidantes, el descontrol metabólico y su participación en las complicaciones. De igual forma, es necesario realizar estudios a futuro donde se considere el comportamiento de los sistemas oxidante/antioxidante según el tiempo de retorno a su normalidad, para una mejor evaluación del control metabólico de los pacientes con DM.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Heredia N, Fernández D, Alfonso J, Rodríguez E, Santana L, y Rodríguez M. Sistema antioxidante enzimático e indicadores de daño oxidativo en pacientes diabéticos tipo 2. *Rev. chil. endocrinol. Diabetes.* 2014; 7 (3): 94-98.
- 2) Ullah A, Khan A, Khan I. Diabetes mellitus and oxidative stress-A concise. Review. *Saudi Pharmaceutical Journal.* 2016; 24:547-553.
- 3) Hernandez J, Hernández C, Licea M, García P, Abraham E, Yanes M. Estrés oxidativo y diabetes mellitus. *Rev Mex Patol Clin.* 2011; 58(1) 4-15.
- 4) Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem.* 2006; 52:601-23.
- 5) Ohara M , Fukui T , Ouchi M , Watanabe K, Suzuki T , Yamamoto S , Yamamoto T, Hayashi T , Oba K, Hirano T. Relationship between daily and day-to-day glycemic variability and increased oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes research and clinical practice* 122. 2016; 6 2 -7 0.
- 6) Gutiérrez-Salmerón M, Chocarro-Calvo N, García-Martínez, De la Vieja A, García-Jiménez C. Bases epidemiológicas y mecanismos moleculares implicados en las asociaciones de obesidad y diabetes con cáncer. *Revista Endocrinología, Diabetes y Nutrición.* 2017. 64( 2), 109-117.
- 7) Calderón J, Muñoz E, Quintanar M. Estrés oxidativo y diabetes. *REB.* 2013;32(2): 53-66
- 8) American Diabetes Association. Diagnosis and clasification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2017; volume 40 suppl 1:S4-S5.
- 9) Keaney J, Larson M, Vasan R, Wilson P, Lipinska I, Corey D. y cols. Atherosclerosis and Lipoproteins: Obesity and systemic oxidative stress. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2003; 23(3), 434-439.
- 10) Ceriello A. Oxidative stress and glycemic regulation. *Metabolism.* 2000; 49(2) Suppl. 1: 27-29.
- 11) Ozdemir G, Ozden M, Maral H, Kuskay S, Cetinalp P. y Tarkun Y. Malondialdehyde, glutathione, glutathione peroxidase and homocysteine levels in type 2 diabetic patients with and without microalbuminuria. *Annals Clinic Biochemistry.* 2005; 42(2), 99-104.
- 12) Guerra M, Avarado M, Librado D. y Torres A. Relación entre la hemoglobina glicosilada, antioxidantes totales y la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx) en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 controlados y no controlados en Bogotá. *Universitas Scientiarum.* 2005; 10: 91-97.
- 13) Kasapoglu M. y Ozben T. Las alteraciones de las enzimas antioxidantes y marcadores de estrés oxidativo en el envejecimiento. *Experimental Gerontology.* 2010; 36(2): 209-220.
- 14) Likidilid A, Patchanans N, Peerapatdit T y Sriratana-sathavorn C. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity in erythrocytes of type 2 diabetic patients. *Journal of Medical Association of Thailand.* 2010; 93(6):682-693.
- 15) Delgado L, Martínez G. y Díaz A. Determinación de marcadores de estrés oxidativo en Pacientes con enfermedades cardiovasculares. *Acta bioquímica clínica latinoamericana.* 2009; 43(3): 307-313.
- 16) Ministerio del Poder Popular para la Salud .Portal de información sobre estadísticas. 2014. Disponible: en [www.msds.gov.ve](http://www.msds.gov.ve). [Consulta: febrero 20, 2017]
- 17) American Diabetes Association. Diagnosis and clasification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2014; 37 suppl1:S81-S90.
- 18) Ministerio de Ciencia y Tecnología /Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología .2012. Código de ética para la vida, Caracas, segunda edición.
- 19) Manzini L. Declaración de Helsinki: Principios éticos para la investigación médica sobre sujetos humanos. *Series Publicaciones.* 2000: 21-34
- 20) Friedewald T, Levy R, y Son F. Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge, *Clinic Chemistry.* 1982; 18: 1114-1119.
- 21) Manual de instrucciones DiaSTAT .Hemoglobin A1C program, 2003:pp 1
- 22) Alvarez J, Storey B. Role of superoxide dismutase in protecting rabbit spermatozoa from Otoxicity due to lipid peroxidation. 1983 28, 1129-1136pp.
- 23) Becker K, Krebs B, Schirmer R. Protein-chemical standardization of the erythrocyte glutathione reductase activation test (EGRAC test). Application to hypothyroidism. *Int J Vitam Nutr Res* 1991;61:180-7.
- 24 ) Morrow J, y Jackson L. The isoprostanos: their roles as an index of oxidant stress status in human pulmonary disease. *American Journal of respiratory and critical care medicine.* 2002; 166: 25-30.
- 25) Esterbauer H y Cheeseman K. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal *Methods in Enzymology.* 1990; 186: 407-421
- 26) Bravo A, Araujo S, Vargas M, Mesa J, Souki A, Bermúdez V y cols. Actividad de la enzima antioxidante superóxido dismutasa y niveles de cobre y zinc en pacientes con diabetes mellitus tipo 2. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica.* 2007; 26(1), 37-41.
- 27) Vergaray L, Flores E. y Suarez S. Correlación entre los niveles de hemoglobina glicada y las enzimas antioxidantes, en pacientes con diabetes mellitus tipo 2. *Ciencia e Investigación.* 2000; 13(9): 145-150.

- 28) Guerra M, Avarado M, Librado D. y Torres A. Relación entre la hemoglobina glicosilada, antioxidantes totales y la actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx) en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 controlados y no controlados en Bogotá. *Universitas Scientiarum*.2005; 10:91-97.
- 29) Gopaul N, Anggard E, Mallet A, Betteridge D, Wolff S, y Nourooz-Zadeh J. Plasma 8-epi-PGF2 levels are elevated in individuals with non-insulin dependent diabetes mellitus. *Federation of European Biochemical Societies Letters*.1995; 368(2): 225-229.
- 30) Soliman G. Blood lipid peroxidation superoxide dismutase, malondialdehyde, glutathione levels in Egyptian type 2 diabetic patients. *Singapore Med J*. 2008; 49 (2): 129
- 31) Nishigaki I, Hagihara M, Tsunekawa H, Maseki M. y Yagi K. Lipid peroxide levels of serum lipoprotein fractions of diabetic patients. *Biochem. Med*. 1981; 25(3): 373-378.
- 32) Loza H, Rodríguez N, Torres M, Flores M y Hernández D. Glycine reduce the oxidative stress in metabolic syndrome patients. *Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2007; 21(1B): 185.
- 33) Greenberg A, Nordan R, McIntosh J, Calvo J, Scow R y Jablons D. Interleukin 6 reduces Lipoprotein lipase activity in adipose tissue of mice in vivo and in 3T3-L1 adipocytes: a possible role for interleukin 6 in cancer cachexia. *Cancer Research*. 1992; 52: 4113-4116.
- 34) Bequer L, Gómez T, Molina JL, López F, Gómez CL, Clapés S. Inducción de hiperglicemias moderadas en ratas wistar por inoculación neonatal de estreptozotocina ¿Inyección subcutánea o intraperitoneal? *Rev Argent Endocrinol Metab*. 2014; 51(4):178-184.
- 35) Álvarez A, Béquer L, Gómez T, Molina J, Lavastida M; Clapés S. Daño renal por hiperglucemias moderadas en un modelo animal de diabetes. *Medicentro Electrónica versión On-line ISSN* 1029-3039.