

Artículo Original

Sistema antioxidante enzimático e indicadores de daño oxidativo en pacientes diabéticos tipo 2

Danay Heredia R.^{1,a}, Douglas Fernández C.^{1,b}, Jesús Alfonso R.^{1,c},
Elba Rodríguez V.², Lucy Santana G.^{2,d} y Margarita Rodríguez P.^{1,e}

Antioxidant enzymatic system and oxidative damage indicators in patients with type 2 diabetes

^{1a-c}Licenciados, Másteres e Investigadores Agregados (no médicos) de la Unidad de Investigaciones Biomédicas.

²Médico General Integral del Centro de Educación y Atención al Paciente Diabético de Villa Clara.

^{2d}Licenciada en Laboratorio Clínico del Centro de Educación y Atención al Paciente Diabético de Villa Clara.

^{1e}Técnico de Laboratorio de la Unidad de Investigaciones Biomédicas.

Institución rectora: Unidad de Investigaciones Biomédicas. Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara. Cuba.

Conflicto de intereses y Financiación: Durante la investigación no se produjo ningún conflicto de interés por parte de los autores y/o las autoridades competentes. Tampoco hubo financiamiento para la ejecución de la misma.

Correspondencia a:

Danay Heredia Ruiz

Edificio 109 Apto. 9 entre 6ta y Doble Vía. Reparto Vigía Sur. Santa Clara. Villa Clara. Cuba.

Teléfonos: 273436 (trabajo), 274434 (casa)

E-mail: danayhr@ucm.vcl.sld.cu

Recibido: 03-03-2014

Aceptado: 23-06-2014

Introduction: Several biological processes are involved in the oxidative stress present in Diabetes Mellitus; among them we can find glucose autooxidation, proteins glycation and decreased antioxidant defenses. Free radicals yielded at mitochondrial level could be a trigger to unchain the vicious circle of the oxidative stress in Diabetes Mellitus.

Aims: To determine antioxidant system's alterations and indicators of oxidative damage on lipids and proteins in patients with type II Diabetes and a control group. **Materials and Methods:** It was analyzed 120 serum samples; 60 from patients that suffer type II diabetic from endocrinology surgery belonging "Casa de Atención al Paciente Diabético" in Santa Clara, Villa Clara and 60 samples from healthy individuals used as control group. Spectrofotometric techniques were used to assess levels of Superoxide dismutase and Catalase activity as well as concentrations of reduced Glutathione, Malondialdehyde and Advanced Products of Proteins Oxidation. Results were compared using the statistical software SPSS. **Results:** Diabetes type 2 patients showed decreased of Superoxide Dismutase and Catalase enzymatic activity ($p = 0,003$) and ($p = 0,013$) respectively as well as reduced Glutathione levels ($p = 0,038$). Malondialdehyde and Advanced Products of Proteins Oxidation were increased ($p = 0,000$) in diabetics patients compared with control group. **Conclusions:** It was found redox alterations in patients that suffer type 2 Diabetes. These alterations are evidenced by a reduced antioxidant enzymatic system and damage on macromolecules such as lipids and proteins.

Key words: Antioxidant system, oxidative stress, mellitus diabetes, free radicals.

Introducción

El estrés oxidativo (EO) es un estado que se caracteriza por un desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO) y la capacidad antioxidante de las células.

En múltiples patologías se producen cambios en indicadores bioquímicos que evidencian desequilibrio oxidativo por varias razones; disminución en las concentraciones plasmáticas de vitaminas antioxidantes como la A y E, incremento de la peroxidación lipídica, incremento de la susceptibilidad de las lipoproteínas de baja densidad a la oxidación, menor capacidad antioxidante total del plasma y por consiguiente daño al material genético¹.

Existen varios mecanismos implicados en el incremento

del EO en la Diabetes mellitus (DM), entre los que se encuentran: la autooxidación de la glucosa, la glucación de proteínas, la activación de la vía de los polioles y la disminución de las defensas antioxidantes. La glucosa, al igual que otros alfa-hidroxi aldehídos, es capaz de autooxidarse a enodioses (enolizarse) en solución acuosa y en presencia de metales de transición, como el Fe^{+3} , reacción en la cual se producen cetoaldehídos intermediarios oxidados y radicales libres (RL) con un alto poder oxidante como el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Se ha demostrado que la hiperglucemia inducida por la generación de este radical a nivel mitocondrial es el desencadenante inicial del círculo vicioso del EO en la DM^{1,2}. En condiciones normales, este elemento es inmediatamente eliminado por los mecanismos de defensa naturales³.

Independientemente del tipo de diabetes, diferentes investigadores han comunicado que el EO se asocia a la presencia de complicaciones microangiopáticas, macroangiopáticas y neuropáticas de la DM⁴⁻⁶. De forma tal que conocer con certeza la existencia de alteración redox en esta patología sería de gran utilidad para el desarrollo de intervenciones terapéuticas con agentes antioxidantes, con el propósito de evitar o al menos postergar la aparición y/o progresión de las complicaciones de la diabetes.

En Cuba la DM es la octava causa de muerte, habiendo incrementado sus tasas de prevalencia y mortalidad en las últimas décadas. Tal auge podría estar motivado por factores que van desde los hábitos alimentarios y de vida, hasta factores genéticos presentes en nuestra población.

Debido a esta situación y dado que en la provincia de Villa Clara los estudios de EO en la DM han sido escasos, nos trazamos como propósito determinar la existencia de alteración del sistema de defensa antioxidante a través de los niveles séricos de actividad enzimática Superóxido dismutasa (SOD) y Catalasa (CAT), así como los niveles de Glutathion reducido (GSH). De igual forma determinar las concentraciones de Malondialdehído (MDA) y Proteínas Oxidadas (PAOP) con el fin de verificar daño oxidativo en macromoléculas como lípidos y proteínas respectivamente.

Materiales y Métodos

Se realizó una investigación analítica de casos y controles en el Laboratorio de Química Sanguínea perteneciente a la Unidad de Investigaciones Biomédicas ubicada en la Universidad de Ciencias Médicas de Villa Clara, con el fin de determinar la existencia de alteración redox en adultos diabéticos tipo 2 que acudieron al servicio de Endocrinología del Centro de Atención y Educación al Paciente Diabético de la provincia de Villa Clara, Cuba en el año 2013.

Selección de las muestras

Se realizó un muestreo intencional partiendo de los siguientes criterios:

Criterios de inclusión

- Grupo de estudio: Pacientes con criterio diagnóstico de Diabetes mellitus tipo 2, mayores de 19 años y menores de 70, de ambos sexos y que otorgaron el consentimiento informado para la investigación.
- Grupo control: Individuos aparentemente sanos, de ambos sexos, con edades comprendidas entre 19 y 70 años y que emitieron su consentimiento.

Criterios de exclusión

- Pacientes con Diabetes mellitus tipo 2 que padecían de otra patología crónica que pudiera interferir en el análisis y que no dieron su consentimiento.
- Muestras de suero con interferentes analíticos como lipemia, ictericia o hemólisis.

Las determinaciones de los parámetros estudiados se realizaron en 120 muestras de suero: 60 de pacientes diabéticos tipo 2 y 60 de individuos aparentemente sanos provenientes de un estudio de pesquiasaje tomados como control.

Fueron empleados métodos espectrofotométricos (Genesys 10 UV®), con reactivos suministrados por la firma Merck KGaA 64271 Damstadt. Germany (www.merck.de).

Determinaciones

La actividad enzimática SOD extracelular se determinó mediante la aplicación del método de Marklund (1990)⁷, el cual se basa en el principio de la auto-oxidación del Pirogalol o ácido pirogálico que es un agente reductor muy activo en soluciones alcalinas. La actividad es expresada en unidades de actividad enzimática (UAE=U/ml/min).

El nivel de actividad enzimática CAT en suero se determinó mediante el método descrito por Aebi (1974)⁸, basado en las características oxidoreductasas de esta enzima que es capaz de catalizar la descomposición del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) a agua y oxígeno. La actividad de la enzima es expresada en UAE.

El GSH se determinó por el método de Beutler (1968)⁹, donde el péptido reacciona con el colorante DTNB [5, 5'-Dithiobis (ácido 2-nitrobenzoico)] y rinde un compuesto coloreado, el TNB (ácido 5-tio-2-nitrobenzoico) que se lee a una longitud de onda de 412 nm. La concentración es expresada en μmol/L (μM).

La técnica para la determinación MDA (Esterbauer H. 1990)¹⁰ se basó en la reacción de dos moléculas del reactivo cromogénico N-metil-2-fenil indol con una molécula de MDA a 45 °C, conduciendo a la formación de un cromóforo estable con un máximo de absorbancia a 586 nm. La concentración de MDA se expresa en μM.

Los PAOP se determinaron por el método de Witko-Sarsat (1998)¹¹, donde las proteínas susceptibles al daño por radicales libres dan lugar mediante reacciones de agregación, entrecruzamiento y fragmentación a los PAOP. La concentración de estos es expresada como equivalentes de Cloramina T (patrón) en condiciones ácidas a 340 nm en presencia de yoduro de potasio, siguiéndose la transformación de iones yodo a yodo diatómico que provocan estos PAOP. La concentración es expresada en μM.

Análisis de datos

Los datos obtenidos fueron sometidos al programa estadístico SPSS versión 18 para Windows. Se realizaron análisis descriptivos para todas las variables en estudio. Al aplicar pruebas de normalidad se comprobó que no existía una distribución gaussiana ($p < 0,05$) en los resultados de SOD, CAT, GSH y MDA, por lo que se aplicaron pruebas no paramétricas para la comparación entre grupos, específicamente el test de Mann-Whitney. Los datos de PAOP mostraron distribución normal por lo que se aplicó para la comparación de medias pruebas paramétricas, específicamente *t de student*. En todos los casos se tuvo en cuenta un nivel de confiabilidad del 95% y en algunos casos el 99%.

Artículo Original

Tabla 1. Estadísticos descriptivos y significación de las actividades enzimáticas SOD y CAT en individuos sanos y pacientes diabéticos tipo 2 de la provincia de Villa Clara en el año 2013

Enzimas antioxidantes	Grupos de estudio	n	Media	Desviación típica	Percentiles		p
					2,5	97,5	
SOD (UAE)	Sanos	60	4,414	1,81	1,455	9,243	0,003**
	Diabéticos	60	3,500	1,89	0,872	7,824	
CAT (UAE)	Sanos	60	26,399	15,61	3,474	59,829	0,013*
	Diabéticos	60	19,491	10,83	5,970	58,520	

**nivel de significación al 99% ($p < 0,01$). *nivel de significación al 95% ($p < 0,05$).

Tabla 2. Estadísticos descriptivos y significación de las concentraciones séricas de GSH, MDA y PAOP en individuos sanos y pacientes diabéticos tipo 2 de la provincia de Villa Clara en el año 2013

Biomoléculas	Grupos de estudio	n	Media	Desviación típica	Percentiles		p
					2,5	97,5	
GSH (μM)	Sanos	60	29,594	19,83	6,550	89,187	0,038*
	Diabéticos	60	21,116	8,41	4,525	35,000	
MDA (μM)	Sanos	60	1,168	0,44	0,488	2,559	0,000**
	Diabéticos	60	4,376	2,35	0,714	10,592	
PAOP (μM)	Sanos	60	60,628	19,384	20,033	96,430	0,000**
	Diabéticos	60	178,196	95,382	17,825	429,375	

**nivel de significación al 99% ($p < 0,01$). *nivel de significación al 95% ($p < 0,05$).

Aspectos éticos

La investigación fue diseñada teniendo en cuenta los aspectos éticos para el trabajo en humanos, teniéndose en cuenta la Declaración de Helsinki¹². Fue valorada por el Comité Científico y aprobada por el Comité de Ética del centro. El equipo multidisciplinario de investigadores dio las explicaciones reales y objetivas del estudio a los individuos incluidos en el mismo, los cuales emitieron su autorización por escrito¹³, respetándose el principio de autonomía.

Resultados

La edad de los participantes involucrados en el estudio estuvo comprendida entre los 30 y 70 años. Los pacientes diabéticos tipo 2 mostraron un promedio de 47,9 años y el grupo de individuos tomados como control presentó una edad promedio de 43,8 años.

Se analizaron muestras de ambos sexos; en el grupo de diabéticos: 32 mujeres y 28 hombres y en el grupo control: 35 mujeres y 25 hombres. En ninguno de los casos se evidenció diferencias entre los sexos por lo que la muestra se tomó como única permitiendo la comparación entre los grupos.

Las Tablas 1 y 2 muestran los estadísticos descriptivos de las variables estudiadas en el grupo de pacientes diabéticos y grupo control, así como la significación obtenida al comparar los grupos.

Las variables que no mostraron distribución normal (SOD, CAT, GSH y MDA) se contrastaron mediante el Test de Mann-Whitney. En todos los casos existieron diferencias significativas ($p < 0,05$). Las actividades de SOD y CAT, así como las concentraciones de GSH disminuyeron significativamente en el grupo de diabéticos. Por otra parte, el MDA aumentó de manera muy significativa en los pacientes diabéticos.

Las concentraciones de PAOP resultaron tener una distribución normal por lo que se compararon ambos grupos mediante la prueba *t de student*, el cual evidenció un aumento altamente significativo ($p < 0,01$) de este indicador en los pacientes diabéticos.

Discusión

La disminución marcada que tuvo la actividad de la enzima SOD en los pacientes diabéticos involucrados en el estudio, podría deberse a un aumento en la formación de O_2^- . El aumento en la generación de esta ERO debido al estado de estrés provocado por la hiperglucemia en un principio estimula la actividad de la enzima SOD, sin embargo, una intensa producción de estos radicales por un tiempo prolongado agota la estimulación de la actividad de esta enzima, puesto que el producto de la reacción, el H_2O_2 , puede inhibirla. Este elemento ha sido descrito como un inhibidor de la enzima a

través de un mecanismo de retroalimentación negativa^{14,15}.

La glucosa sanguínea puede enolizarse y, por tanto, reducir el oxígeno molecular bajo condiciones fisiológicas, catalizado por metales de transición, produciendo cetoaldehidos e intermediarios oxidados. Las evidencias sugieren que los radicales libres y el H₂O₂ producidos lentamente por la “autoxidación” de la glucosa, son una causa sustancial de daño estructural de proteínas expuestas *in vitro* a la glucosa. En la actualidad se acepta que los productos avanzados de la glicosilación desempeñan un papel importante en la patogenia de las complicaciones de la DM¹⁶. La glicación de proteínas no sólo ocurre con la hemoglobina, sino también con proteínas que participan en el sistema antioxidante, como SOD y GPx que actúan frente a los pro oxidantes, así mismo la albúmina, las lipoproteínas, el colágeno; procesos que tienen mucha implicancia en la evolución de la diabetes¹⁷⁻²⁰.

Por otro lado, los altos niveles de O₂⁻ hacen inevitable su interacción con óxido nítrico (ON) provocando la aparición del peroxinitrito (OONO⁻). Este elemento es capaz de reaccionar con proteínas que contienen iones metálicos como hierro, cobre y manganeso, provocando así modificaciones que pueden inducir cambios conformacionales en la estructura tridimensional de proteínas trayendo consigo la pérdida de la función biológica. Mediante la exposición de proteínas purificadas a OONO⁻, se ha determinado que esta especie es capaz de inactivar una gran variedad de enzimas entre las que se encuentra la SOD^{1,14}.

La actividad de la enzima CAT también mostró disminución, lo cual podría estar dada por el hecho de que la enzima SOD tiende a disminuir su actividad y, por tanto, la reacción de formación de H₂O₂ se ve desplazada por la formación de OONO⁻. El H₂O₂ es utilizado como sustrato por las enzimas catalasa y GSH peroxidasa. La catalasa tiene una Km alta para el H₂O₂, por tanto, su efecto es limitado y sólo puede ejercer su función bajo condiciones donde los niveles de H₂O₂ están particularmente elevados. La baja actividad de la catalasa, unida a la disminución de la concentración del GSH, sugiere la existencia de bajos niveles de esta especie reactiva. A este hecho se suma el efecto del OONO⁻ como agente inhibidor de metaloproteínas como es el caso de esta enzima²¹⁻²³.

La disminución del GSH en los pacientes diabéticos involucrados en el estudio puede ser evidencia del aumento de su utilización en reacciones de reducción en comparación con su síntesis. Este antioxidante no enzimático es considerado como un barrador de O₂⁻ que protege a los lípidos de las membranas así como los grupos tioles proteicos de la peroxidación. Su papel principal es en la restitución de otros antioxidantes como la vitamina E y el ácido ascórbico a su estado reducido²⁴. Existen numerosos reportes que indican que el daño a tejidos inducido por diversos estímulos está acompañado de un agotamiento del GSH. Esta disminución apoya la teoría del EO en estos pacientes con actividad antioxidante disminuida y el consecuente aumento de la generación de ERO²⁵.

Niveles decrecientes de GSH en la diabetes pueden ser

causado por diferentes vías las que incluyen: 1) incremento de la síntesis del sorbitol causando depleción del NADPH y deficiencia en la reducción del GSSG a GSH catalizado por la GRd; 2) disminución en la actividad de hexosas monofosfato (HMP) como una lanzadera enzimática las cuales generan NADPH y, 3) el transporte de GSSG llevado a cabo en las membranas eritrocitarias debido al estrés oxidativo induciendo daño a membrana^{24,26}. De manera que una diabetes mal controlada con un sistema del glutatión dañado por inactivación de la GPx y GRd, (constituyentes críticos en el ciclo redox del glutatión) puede contribuir en la iniciación y/o progresión de complicaciones.

Algunas complicaciones de la diabetes están asociadas con el incremento de la peroxidación lipídica, proceso relacionado con los RL, los cuales son potencialmente nocivos causando descontrol y disrupción de membranas.

Las células betas del páncreas y el endotelio vascular son altamente susceptibles al EO, debido al hecho de que muchas vías bioquímicas estrictamente asociadas con hiperglicemia pueden incrementar la producción de RL. Teniendo en cuenta que las células endoteliales expuestas a altos niveles de glucosa también conllevan a incremento en la producción de O₂⁻.

Los niveles elevados de MDA en los pacientes diabéticos estudiados evidencian un importante daño a lípidos, lo cual se traduce como aumento de la peroxidación lipídica. Esto concuerda con diferentes investigaciones^{27,28} donde se ha mostrado incremento de EO por depleción de enzimas antioxidantes, vitaminas y aumento de la peroxidación lipídica, hecho que se ha descrito en ambos tipos de diabetes.

La peroxidación lipídica altera los fosfolípidos, produciendo modificaciones a nivel de la homeostasis y la estructura celular con la consecuente rotura de la bicapa constitutiva de todas las membranas celulares, lo que lleva a la destrucción de las mismas. De igual forma es un proceso que tiene una naturaleza característica de reacción en cadena, de manera que cuando un lípido está alterado, éste puede promover la peroxidación de los lípidos adyacentes. Todos estos procesos están íntimamente relacionados con la etiopatogenia de la aterosclerosis^{29,30}.

Otro resultado importante del estudio es el aumento de los niveles de proteínas oxidadas²⁷ en los pacientes diabéticos. Generalmente las proteínas se modifican oxidativamente al ser uno de los blancos principales de las ERO, lo que conlleva a modificaciones estructurales que, en general, suponen la pérdida total o parcial de su función.

Muchos residuos de aminoácidos son susceptibles a la oxidación por varias ERO, las cuales pueden causar modificaciones en las proteínas. Habitualmente este tipo de modificaciones tienen la función de proteger ante el daño oxidativo irreversible o de modular la función de las proteínas (regulación redox), que por lo general no pueden ser reparadas, de forma que las proteínas inactivas se acumulan o son degradadas³¹.

De manera general, el incremento de RL causa daño a proteínas celulares, lípidos de membrana, ácidos nucleicos y

Artículo Original

eventualmente muerte celular. Los factores que afectan grandemente el riesgo de complicaciones en la diabetes están relacionados con el grado y duración de la enfermedad^{30,31}. De tal forma, la hiperglicemia e hiperlipidemia en la DM tipo 2 están asociadas con disfunción endotelial y EO.

Referencias bibliográficas

- Maldonado SO, Jiménez VEN, Guapillo VMRB. Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. Rev Med UV 2010. Disponible en: http://www.uv.mx/rm/num_antteriores/revmedica_vol10_num2/articulos/radicales.pdf. (Consultado en octubre de 2013).
- Orasanu G, Plutzky J. 2009. The pathologic continuum of diabetes vascular disease. J Am Coll Cardiol 53 (5): 35.
- Cuerda C, Luengo LM, Valero MA, Vidal A, Burgos R, Calvo FL, et al. 2011. Antioxidantes y diabetes mellitus: revisión de la evidencia. Nutr Hosp 26 (1): 68-78.
- Piarulli F, Sartore G, Ceriello A, Ragazzi E, Reitano R, Nollino L, et al. 2009. Relationship between glyco-oxidation, antioxidant status and microalbuminuria in type 2 diabetic patients. Diabetologi; 52 (7): 1419-1425.
- Singhania N, Puri D, Madhu SV, Sharma SB. 2008. Assessment of oxidative stress and endothelial dysfunction in Asian Indians with type 2 DM with and without macroangiopathy. QJM 101: 449-455.
- Sarah A, Srikanth B, Helen RG. 2011. Dietary antioxidant interventions in type 2 diabetes patients: a meta-analysis. British Journal of Diabetes & Vascular Disease 11: 62-68.
- Marklund S, Marklund G. 1990. Involvement of the superoxide anion radical in autoxidation of pyrogallol as convenient assay for superoxide dismutase. Eur J Biochem 47: 469-474.
- Aebi H. 1974. Catalase Methods of Enzymatic Analysis II. Academic Press, New York. NY 673-683.
- Sedlak J, Lindsay RH. 1968. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. Anal Biochem 25 (1): 192-205.
- Esterbauer H, Cheeseman KH. 1990. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. Meth. Enzymol 186: 407-421.
- Witko-Sarsat V, Friedlander M. 1998. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocytes activation in chronic renal failure. J Immunol 161: 2524-2532.
- Manzini JL. 2003. Declaración de Helsinki: Principios éticos para la investigación médica sobre sujetos humanos. Análisis de la 5° Reforma, aprobada por la Asamblea general de la Asociación Médica Mundial en octubre del año 2000 en Edimburgo. En: Lolas F, Quezada A, (eds.) Pautas éticas de investigación en sujetos humanos: nuevas perspectivas. Chile: Serie Publicaciones: 21-34.
- Rodríguez E. 2003. El consentimiento informado en el uso de muestras biológicas humanas y de registros médicos. En: Lolas F, Quezada A, (eds.) Pautas éticas de investigación en sujetos humanos: nuevas perspectivas. Chile: Programa Regional de Bioética OPS/OMS 45-55.
- Lu M, Daret K. 2009. St. Clair. Regulation of superoxide dismutase genes: Implications in disease. Free Radical Biology and Medicine 47 (4): 344-356.
- Hisalkar PJ, Patne AB, Fawade MM. 2012. Assessment of plasma antioxidant levels in type 2 diabetes patients. Int J Biol Med Res 3 (2): 1796-1800.
- Kennedy LA, Lyons TJ. 1997. Glycation, oxidation, and lipoxidation in the development of Diabetic Complications. Metabolism 46 (12): 14-21.
- Brownlee M. 1994. Glycation and diabetic complications. Diabetes 43: 836-941.
- Hunt JV, Dean RT, Wolff SP. 1988. Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and aging. Biochem J 256: 205-212.
- Al-Rawi NH. 2011. Oxidative stress, antioxidant status and lipid profile in the saliva of type 2 diabetics. Diabetes & Vascular Disease Research 8: 22-28.
- Lapolla A, Piarulli F, Sartore G. 2007. Advanced glycation end products and antioxidant status in type 2 diabetic patients with and without peripheral artery disease. Diabetes Care 30: 670-676.
- Peter CL, Martin GK, Daniel JH. 2007. Catalase an "old" enzyme that continues to surprise us. ASM News 66: 76-82.
- Madhur MG, Anjan B. 2010. Human catalase: looking for complete identity. Protein Cell 1 (10): 888-897.
- Putnam CD, Arvai AS, Bourne Y, Tainer JA. 2008. Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. J Mol Biol 296: 295-309.
- Dickinson DA, Forman HJ. 2006. Cellular glutathione and thiols metabolism. Biochem. Pharmacol 64: 1019-1026.
- Hisalkar PJ, Patne AB, Fawade MM, Karnik AC. 2012. Evaluation of plasma superoxide dismutase and glutathione peroxidase in type 2 diabetic patients. Biology and Medicine 4 (2): 65-72.
- Lugo AV. Variaciones del metabolismo oxidativo mediante niveles de glutatión, peroxidación lipídica, ácido úrico y actividad de la catalasa en pacientes con diabetes tipo 2 atendidos en la unidad de diabetes del Hospital Dr. Julio Rodríguez. Cumaná, Estado Sucre. 2011. Disponible en: <http://hdl.handle.net/123456789/1666>. (Consultado en septiembre de 2013).
- Čolak E. 2008. New markers of oxidative damage to macromolecules. JMB 27: 1-16.
- Soliman GZ. 2008. Blood lipid peroxidation (superoxide dismutase, malondialdehyde, glutathione) levels in Egyptian type 2 diabetic patients. Singapore Med J 49 (2): 129
- Likidililid A, Patchanans N, Peerapatdit T. 2010. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in erythrocytes of type 2 diabetic patients. Journal of the Medical Association of Thailand 93: 682-693.
- Lodovici M, Bigagli E, Bardini G, Rotella CM. 2009. Lipoperoxidation and antioxidant capacity in patients with poorly controlled type 2 diabetes. Toxicology and Industrial Health 25: 337-341.
- Bigagli E, Raimondi L, Mannucci E, Colombi C, Bardini G, Rotella CM, et al. 2012. Lipid and protein oxidation products, antioxidant status and vascular complications in poorly controlled type 2 diabetes. The British Journal of Diabetes & Vascular Disease 12: 33-39.