

## El estrés oxidativo. ¿Es necesario medirlo en el paciente diabético?

Leonel Villa-Caballero,\* \*\*, Alejandro A. Nava-Ocampo,\*\* Alberto C. Frati-Munari,\*\*\* Héctor Ponce-Monter\*\*

Recepción versión modificada 14 de julio de 1999; aceptación 21 de julio de 1999

### Resumen

*El estrés oxidativo es definido como pérdida del equilibrio entre la producción de radicales libres o de especies reactivas de oxígeno y los sistemas de defensa antioxidante, y que tiene efectos deletéreos sobre los carbohidratos, los lípidos y las proteínas. Además, ha sido relacionado con la progresión de diferentes enfermedades crónicas y con la apoptosis.*

*Se ha demostrado que la diabetes mellitus es una enfermedad que cursa con estrés oxidativo, a través de diferentes mecanismos bioquímicos como la glucosilación excesiva de proteínas, la autooxidación de la glucosa y la activación de la vía de los polioles; estos mecanismos son desencadenados por la presencia de hiperglicemia. Este estado de estrés oxidativo pudiera estar implicado tanto en la patogenia de la aterosclerosis como de las complicaciones crónicas no aterosclerosas del diabético.*

*La medición del estrés oxidativo puede ser útil para investigar su papel en la aparición y el desarrollo de las complicaciones crónicas diabéticas, así como de las maniobras para prevenirlas, incluyendo la administración de antioxidantes. Se han utilizado diferentes pruebas de laboratorio con el fin de obtener un método práctico, sensible, específico y accesible para la determinación de este estado en la práctica clínica. A pesar de que dicho método no se encuentra disponible aún, y de que la utilidad de los existentes necesita ser confirmada en la práctica diaria con el paciente diabético, se recomienda cuantificar los niveles de glutatión oxidado y reducido (GSSG/GSH) y de los compuestos reactivos al ácido tiobarbitúrico (TBARS).*

**Palabras clave:** *Diabetes mellitus, estrés oxidativo, radicales libres, antioxidantes*

### Summary

*Oxidative stress has been defined as a loss of counterbalance between free radical or reactive oxygen species production and the antioxidant systems, with negative effects on carbohydrates, lipids, and proteins. It is also involved in the progression of different chronic diseases and apoptosis.*

*Diabetes mellitus is associated to a high oxidative stress level through different biochemical pathways, i.e. protein glycosylation, glucose auto-oxidation, and the polyol pathway, mainly induced by hyperglycemia. Oxidative stress could also be involved in the pathogenesis of atherosclerotic lesions and other chronic diabetic complications.*

*Measurement of oxidative stress could be useful to investigate its role in the initiation and development processes of chronic diabetic complications and also to evaluate preventive actions, including anti-oxidative therapy.*

*Different attempts have been made to obtain a practical, accurate, specific, and sensitive method to evaluate oxidative stress in clinical practice. However, this ideal method is not currently available to date and the usefulness of the current methods needs to be confirmed in daily practice. We suggest quantifying oxidated and reduced glutation (GSSG/GSH) and the thiobarbituric reactive substances (TBARS) with currently alternatives. Currently available alternative methods while we await better options.*

**Key words:** *Diabetes mellitus, oxidative stress, free radicals, antioxidants*

\*Medicina Interna, Hospital General del Centro Médico "La Raza", IMSS.

\*\*Unidad de Investigación Médica en Farmacología, Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional "Siglo XXI", IMSS.

\*\*\* Académico Numerario y Jefe de Prestaciones Médicas de la Delegación 2 Noreste "La Raza", IMSS.

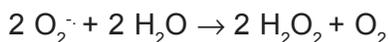
Correspondencia y solicitud de sobretiros: Alejandro A. Nava-Ocampo, Unidad de Investigación Médica en Farmacología, Hospital de Especialidades, C.M.N. "Siglo XXI", AP 73032, Ciudad de México 03020, México. Fax: +(52 5) 761 09 52.

## El estrés oxidativo y su participación en los procesos patológicos

La producción aumentada o acelerada de radicales libres (RL) y de especies reactivas de oxígeno (EROs) conocida como estrés oxidativo en diversas condiciones fisiológicas y fisiopatológicas, así como su relación con el desarrollo de diversas enfermedades, como en la diabetes mellitus, el cáncer, la aterosclerosis, la enfermedad de Parkinson y la artritis reumatoide, han adquirido importancia en forma reciente.<sup>1-4</sup>

En el organismo existe un equilibrio entre las moléculas pro-oxidantes y los sistemas de "defensa" antioxidante.<sup>5-7</sup> Los pro-oxidantes, como el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), son producidos por la liberación de electrones de alta energía a lo largo de la cadena de transporte electrónico mitocondrial y por las reacciones enzimáticas catalizadas por la xantina oxidasa, el citocromo  $P_{450}$  y la fosfolipasa  $A_2$ .

Mientras que el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) se produce a nivel de la cadena mitocondrial de transporte electrónico por la auto-oxidación de algunas moléculas de bajo peso molecular y por la dismutación del anión superóxido mediada por la enzima superóxido dismutasa (SOD). La siguiente reacción química ilustra el proceso:



El peróxido de hidrógeno, como tal, no es muy reactivo. Sin embargo, en presencia de metales reducidos, como el hierro 2 ( $Fe^{2+}$ ) y el cobre ( $Cu^+$ ), se convierte en el radical libre hidroxilo ( $HO\cdot$ ), altamente reactivo, de acuerdo a un proceso conocido como reacción de Fenton:

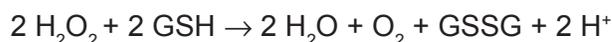


Donde M es cualquier ión metálico y n+ representa la valencia.

El anión peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) se forma por la reacción entre el óxido nítrico (NO) con el  $O_2^{\cdot-}$ . Este ión es también una molécula altamente reactiva que se rompe para formar  $HO\cdot$ , de acuerdo a la ecuación química siguiente:



Por otra parte, existe un sistema de defensa celular contra estas especies reactivas de oxígeno, al que contribuyen mecanismos enzimáticos y no enzimáticos. Dentro de los primeros se encuentran enzimas como la catalasa (CAT), la superóxido dismutasa (SOD) y la glutatión peroxidasa (GSH-Px). La SOD se presenta en tres formas, una extracelular, otra intracelular dependiente de cobre y zinc, y una mitocondrial dependiente de manganeso. Estas tres formas de la SOD convierten al  $HO\cdot$  en  $H_2O_2$ , el cual es removido en su mayor parte por la GSH-Px, que utiliza el  $H_2O_2$  para que el glutatión reducido (GSH) sea oxidado (GSSG), de acuerdo a la siguiente ecuación química:



Posteriormente, el GSSG se convierte nuevamente a la forma reducida en una reacción adicional, dependiente de N-adenosin difosfato reducido (NADPH), catalizada por la glutatión reductasa (GSH-Red). La CAT también contribuye a la eliminación de  $H_2O_2$ .

Otros componentes del sistema de defensa celular son las vitaminas hidrosolubles (como la vitamina C) y liposolubles (como la vitamina E y los tocoferoles) y ciertas proteínas plasmáticas, como la transferrina (que une  $Fe^{2+}$  y, por lo tanto, reduce su participación en los procesos de formación de radicales libres), la ceruloplasmina (oxida el  $Fe^{2+}$  sin liberación de EROs), el ácido úrico (que une  $Fe^{2+}$  y  $Cu^+$ , capta radicales libres e inhibe la peroxidación lipídica), y la metalotionina y la hemo oxigenasa 1 (Figura 1).

El estrés oxidativo conduce a cambios bioquímicos sobre algunas moléculas fundamentales, como los carbohidratos, los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos, los cuales pueden producir daño tisular.<sup>8-10</sup> Estos cambios se han relacionado con el daño vascular en la progresión de la aterosclerosis, e incluso en la apoptosis.<sup>11</sup> Igualmente, se ha demostrado que el  $O_2^{\cdot-}$  producido por las células endoteliales disminuye la actividad vasomoduladora del Factor Relajante Derivado del Endotelio (FRDE) u óxido nítrico, que el  $HO\cdot$  puede ser citotóxico en las células endoteliales.<sup>12</sup> Al  $O_2^{\cdot-}$  también se le ha implicado en el daño tisular resultante en los procesos de isquemia reperusión

y en la aterosclerosis.<sup>13</sup> Por el contrario, la adición experimental de la SOD a anillos de aorta animal produce un incremento en la actividad del FRDE y en la relajación vascular.<sup>14</sup>

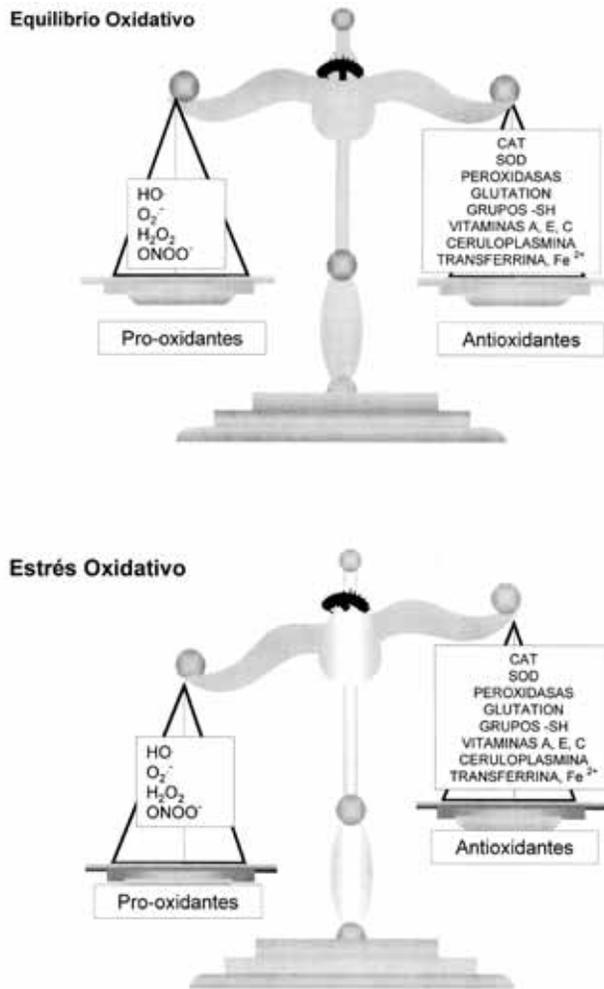


Figura 1. En condiciones fisiológicas, el organismo se encuentra en un estado de equilibrio oxidativo, donde existe un balance entre moléculas pro-oxidantes y los sistemas antioxidantes de defensa, como se ilustra en el nivel superior de la gráfica. Cuando este equilibrio se pierde, ya sea por incremento de los pro-oxidantes, disminución de los anti-oxidantes o a la combinación de ambos eventos, se produce el estrés oxidativo, ilustrado en el nivel inferior de la figura. Las abreviaturas utilizadas en esta figura se encuentran definidas en el texto o en el cuadro II.

### Participación del estrés oxidativo en la diabetes mellitus

El estrés oxidativo es reconocido como un elemento fundamental en el desarrollo de diversos cambios fisiopatológicos relacionados con algunas de las complicaciones crónicas en el paciente diabético.<sup>8-10</sup>

Se reconocen principalmente tres mecanismos fisiopatológicos como responsables de un incremento del estrés oxidativo en estos pacientes:

1. La vía de los polioles, a través de la participación del potencial de óxido-reducción de la enzima aldosa reductasa, con acumulación intracelular de sorbitol y fructosa;<sup>15</sup>
2. La glucosilación exagerada de proteínas, con la formación de productos de glucosilación intermedia y avanzada, por ejemplo la carboximetilisina y la hidroximetilisina;<sup>16</sup> y
3. La auto-oxidación de la glucosa (a partir de la enolización de la glucosa con formación de productos intermedios como la 3-desoxiglucosona).<sup>15-17</sup>

La hiperglicemia es el elemento fundamental en estos mecanismos, los cuales son capaces de condicionar cambios en la estructura bioquímica tisular, provocando alteraciones en las características fisicoquímicas de estructuras básicas como la colágena; éstas, a su vez, están relacionadas con la aparición de complicaciones tardías, características de la enfermedad (Figura 2).<sup>17</sup>

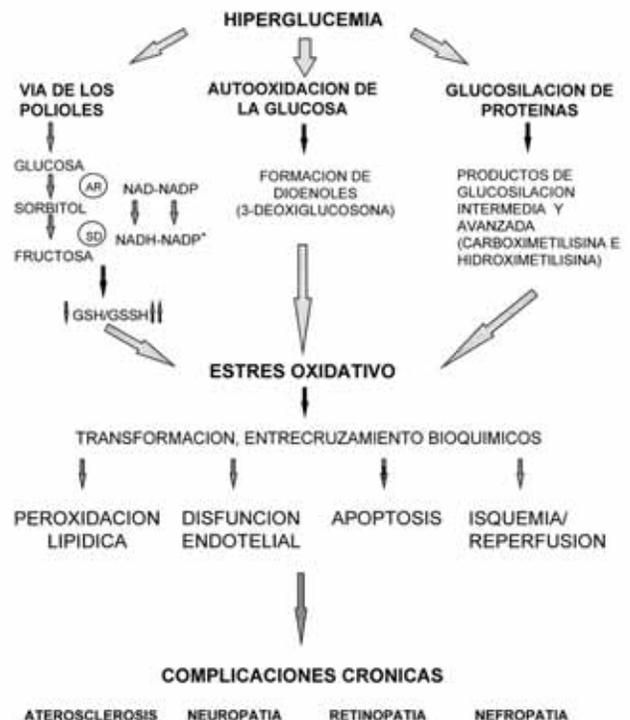


Figura 2. Esquema de la participación del estrés oxidativo en la diabetes mellitus, teniendo como evento central a la hiperglicemia. La secuencia de eventos que se desarrollan conduce a un estrés oxidativo que, a su vez, participa en las complicaciones crónicas de los diabéticos.

Por otra parte, la aterosclerosis, que favorece la elevada morbilidad y mortalidad en la diabetes mellitus a través del incremento en el riesgo de enfermedad cardiovascular y cerebral,<sup>18</sup> tiene una mayor velocidad de presentación en el paciente diabético comparada con la población general.<sup>18,19</sup> Se ha relacionado a la aterosclerosis con la participación de procesos y moléculas pro-oxidantes,<sup>20</sup> como el incremento de la peroxidación lipídica a partir de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL-Ox).<sup>21</sup> Estas LDL-Ox, a diferencia de las LDL nativas, tienen una gran capacidad de estimulación de factores quimiotácticos,<sup>19</sup> evitan la migración de macrófagos, inducen la respuesta inmune,<sup>22,23</sup> y son fácilmente fagocitadas formando las llamadas “células espumosas”. Estas LDL-Ox son depositadas en el espacio subendotelial vascular, favorecen una mayor producción de radicales libres,<sup>24</sup> y son los componentes más importantes de la estría grasa, cuya formación es un paso fundamental en el desarrollo de la placa aterosclerótica.<sup>21,25</sup> Así mismo, los procesos de peroxidación lipídica, capaces de producir alteraciones en las membranas celulares, han sido observados en un grado mayor en los diabéticos que en la población normal.<sup>26,27</sup> La oxidación de las LDL pudiera tener un efecto deletéreo sobre la función vascular y la actividad del endotelio microvascular.<sup>28</sup> La alteración endotelial, proceso fundamental en el desarrollo de la enfermedad vascular del diabético,<sup>29</sup> se ha relacionado con aumento en la actividad de algunos pro-oxidantes como el ONOO<sup>-</sup> (a partir de la catálisis del óxido nítrico por la enzima óxidonitrato sintetasa) y del radical O<sub>2</sub><sup>-</sup>,<sup>30-32</sup> los cuales interfieren con la relajación vascular.<sup>32-34</sup> Esto ha sido demostrado de manera experimental y clínica.<sup>33-36</sup>

Se ha relacionado también a la actividad de los RL con el control metabólico del diabético. Aguirre y cols,<sup>37</sup> demostraron una relación significativa entre los niveles elevados de glucemia, los productos de glucosilación y la disminución del potencial antioxidante en el plasma de los pacientes diabéticos tipo II. Paolisso y cols.,<sup>38,39</sup> propusieron que el descontrol metabólico se debe a la disminución en la producción insulínica, por efecto de los RL sobre la actividad de la célula β pancreática, a través de mecanismos como:

- a) Cambios en la fluidez lipídica de las membranas celulares;
- b) Incremento del GSSG con respecto al GSH;

- c) Producción de aldehídos tóxicos provenientes de ácidos grasos poli-insaturados; y
- d) Disminución de antioxidantes como la vitamina E.<sup>38-40</sup>

La asociación entre el estrés oxidativo, las complicaciones crónicas características de la diabetes mellitus (como la neuropatía, la retinopatía y la nefropatía diabética) y un estado procoagulante ha sido demostrada tanto experimental como clínicamente (Cuadro I).<sup>41-45</sup> Sin embargo, aún no se ha precisado si el estrés oxidativo es un reflejo del estado de óxido-reducción resultante de las complicaciones en la diabetes, o bien si el aumento de los niveles del estrés oxidativo es el que las determina. Para contestar estas preguntas será necesario identificar y cuantificar estas sustancias oxidantes en diferentes etapas de la evolución de la enfermedad, por ejemplo durante la intolerancia a la glucosa, en la diabetes mellitus temprana o avanzada, y en la diabetes con o sin complicaciones.

### La cuantificación del estrés oxidativo en la diabetes mellitus

El estrés oxidativo se ha determinado a través de la cuantificación:

1. directa de radicales libres,
2. indirecta, del efecto de los radicales libres,
3. de las enzimas de los sistemas antioxidantes, y
4. de vitaminas y proteínas con actividad antioxidante.

La determinación de la actividad de los RL o de las EROs es difícil debido a la alta reactividad de estos fragmentos moleculares y a su breve vida media, que llega a ser de milisegundos, o incluso nanosegundos (Cuadro II).<sup>45</sup> Algunos métodos cuantifican en forma indirecta la actividad de estos fragmentos moleculares y su efecto sobre los carbohidratos, los lípidos y las proteínas celulares. En el caso de la peroxidación lipídica se miden algunos intermediarios del metabolismo de los lípidos y de las lipoproteínas, a través de la cuantificación, por ejemplo, del malondialdehído, el pentano exhalado, los dienos conjugados y las especies reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS).<sup>46</sup>

El estrés oxidativo se ha medido también a través de la determinación de la actividad de enzimas como

**Cuadro I. Evidencia de participación del estrés oxidativo de las complicaciones crónicas de diabetes mellitus**

| Autor                  | Año  | Ref. No. | Casos          | Tipo de estudio                                       | Complicaciones      | Parámetro o prueba de laboratorio                                |
|------------------------|------|----------|----------------|---|---------------------|--|
| Ceriello A. et al      | 1995 | 44       | 9              | Clínico Controlado (9 DM II y 7 controles)            | Hipercoagulabilidad | Fragmentos de protrombina (F1+2) y niveles de GSH                |
| Low P et al.           | 1997 | 41       | Animal (Ratas) | Modelo Experimental con STZ y ácido $\alpha$ -lipoico | Neuropatía          | GSH  |
| Horie K et al.         | 1997 | 43       | 19             | Clínico (13 DM II, 3 NCM, y 3 NIgA)                   | Nefropatía          | Acumulación de productos de glucosilación en mesangio            |
| Ceriello A et al       | 1997 | 54       | 46             | Clínico controlado (46 DM II y 47 controles)          | Hipercoagulabilidad | Parámetro de capacidad total antioxidante (TRAP)                 |
| Samiec PS et al.       | 1998 | 42       | 73             | Clínico (73 DM II y 46 controles)                     | Retinopatía         | GSH y GSSH   |
| Grattagliano I. et al. | 1998 | 59       | 19             | Clínico controlado (19 DM II y 21 controles)          | Retinopatía         | Malondialdehído (MDA) Proteínas carbonil y sulfhidril Vitamina E |

DM II= pacientes con diabetes mellitus tipo II; IgA= pacientes con nefropatía por IgA, NCM= pacientes con nefropatía por cambios mínimos, STZ= estreptozotocina.

**Cuadro II. Principales radicales libres y especies reactivas de oxígeno**

| Símbolo                       | Especie Reactiva de Oxígeno | Vida Media (seg) |
|-------------------------------|-----------------------------|------------------|
| HO                            | Hidroxilo                   | 10-9             |
| RO                            | Alcoholes                   | 10-6             |
| ROO                           | Peroxilo                    | 7                |
| NO                            | Oxido Nítrico               | 1 a 10           |
| O <sub>2</sub> <sup>-</sup>   | Superóxido                  | *                |
| ONOO                          | Peroxinitrito               | 0.05-1.0         |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | Peroxido de hidrógeno       | *                |
| Q <sup>-</sup>                | Semiquinona                 | días             |

\* catalizado por enzimas específicas, y su vida media depende de su presencia.

las del sistema del glutatión (la GSH-Px y la GSH-Red). El GSH es un tiol de bajo peso molecular (gamma-glutamilcisteínilglisina), representa la principal reserva citoplasmática de cisteína y tiene múltiples funciones celulares, pero principalmente actúa como antioxidante intracelular.<sup>47</sup> Al glutatión se le ha medido en diversos estudios de tipo experimental

y clínico,<sup>38,39</sup> tanto en poblaciones de diabéticos como en sujetos sanos, y se expresa como un índice de glutatión reducido/oxidado (GSH/GSSG).<sup>48,49</sup> Otros métodos utilizan la cuantificación de otras actividades enzimáticas, como la de la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT),<sup>4,50,51</sup> así como la medición de las concentraciones plasmáticas de vitamina E y C, de ácido úrico, de proteínas, como la ceruloplasmina y la transferrina,<sup>52</sup> y la cuantificación de productos de degradación nuclear como la 8-oxo-desoxiguanosina y la fragmentación del DNA.<sup>53</sup>

Algunos autores han propuesto la determinación de un parámetro total de captura antioxidante o "TRAP" (Total Radical Trapping Antioxidant Parameter). Este parámetro es considerado aceptable, ya que proporciona información adecuada sobre la capacidad sérica antioxidante; de hecho, en pacientes diabéticos se han descrito niveles bajos del TRAP.<sup>54</sup>

Sin embargo, la mayor parte de los métodos requieren de la utilización de equipo sofisticado, reactivos de elevado costo y personal capacitado;

características que dificultan su disponibilidad en laboratorios convencionales. Y, aunque es cuestionable la utilidad de estos métodos en su aplicación clínica, la evidencia actual de la participación del estrés oxidativo en los procesos fisiopatológicos de la diabetes mellitus hace necesario cuantificar el perfil pro-oxidante/antioxidante en estos pacientes.

El conocer el estado de "oxidación" del diabético ofrece una serie de interesantes oportunidades para explorar la asociación entre pro-oxidantes, el descontrol metabólico y su participación en las complicaciones, así como investigar si el estricto control glucémico pudiera mejorar este perfil oxidativo. También resultaría conveniente determinar si el tratamiento dietético, la actividad física, el tratamiento farmacológico de la diabetes o la administración de fármacos hipocolesterolemiantes tienen algún efecto sobre la producción de RL o de EROs en estos pacientes, y si es recomendable la utilización o no de medicamentos antioxidantes.

Si bien los métodos, como se mencionó anteriormente, presentan algunas dificultades en los estudios clínicos, existe predominio en la tendencia a cuantificar la relación GSSG/GSH y los TBARS,<sup>55-57</sup> para los cuales existen métodos relativamente sencillos, que han demostrado su utilidad tanto en sujetos sanos como en diversas patologías, así como en condiciones basales y en diversas situaciones de estrés, como el ejercicio físico.<sup>58</sup>

Finalmente, será necesario continuar investigando con el fin de contar con un método de laboratorio útil y práctico que permita la medición del estrés oxidativo en la valoración clínica del paciente diabético.

**Agradecimientos:** El presente trabajo fue realizado con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyecto No. 29188-M) y del Fondo de Fomento a la Investigación del Instituto Mexicano del Seguro Social No. FP0038/441.

## Referencias

- Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 1994;344:721-724.
- Maxwell SRJ. Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs* 1995;49:345-361.
- Jacob RA, Burri BJ. Oxidative damage and defense. *Am J Clin Nutr* 1996;63:985s-90s.
- Casado A, De la Torre R, López-Fernández E. Niveles de superóxido dismutasa y catalasa en enfermedades del anciano. *Gac Méd Méx* 1998;134:539-544.
- Sies H, Stahl W. Vitamins E and C, B-carotene and other carotenoids as antioxidants. *Am J Clin Nutr* 1995;62 (Suppl) 131:55-215.
- Stahl W, Sies H. Antioxidant defense: vitamins E and C and carotenoids. *Diabetes* 1997;46:514-518.
- Sies H. Introductory remarks. In: *Oxidative stress*. Sies H (Ed). Academic Press, London, 1985, PP 1-8.
- Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 1991;40:405-412.
- Schleicher ED, Wagner E, Nerlich A. Increased accumulation of the glycoxidation product Nε-carboxymethyllysine in human tissues in diabetes and aging. *J Clin Invest* 1997;99:457-468.
- Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 1996;19:257-267.
- Kinscherf R, Claus R, Wagner M. Apoptosis caused by oxidized LDL is manganese superoxide dismutase and p53 dependent. *FASEB J* 1998;12:461-467.
- Todoaki K, Okabe E, Kiyose T. Oxygen free radical mediated selective endothelial dysfunction in isolated coronary artery. *Am J Physiol* 1992;262:H806-812.
- Smith C, Mitchinson MJ, Auroma OI. Stimulation of lipid peroxidation and hydroxyl radical generation by the contents of human atherosclerotic lesions. *Biochem J* 1992;285:901-905.
- Rubanyi GM, Vanhoutte PM. Superoxide anions and hypoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 1986;250:H822-827.
- Bravi MC, Pietrangeli P, Laurenti O. Polyol pathway activation and glutathione redox status in non insulin dependent diabetic patients. *Metabolism* 1997;46:1194-1198.
- Taniguchi N, Kaneto H, Asahi M. Involvement of glycation and oxidative stress in diabetic macroangiopathy. *Diabetes* 1998;46:581-583.
- Ceriello A, Giugliano D, Quattraro A. Vitamin E reduction of protein glycosylation in diabetes. *Diabetes Care* 1991;14:68-72.
- Kennedy AL, Lyons TJ. Glycation, oxidation and lipoxidation of the development of diabetic complications. *Metabolism* 1997;46:14-21.
- Zimmet PZ, Alberti KGMM. The changing face of macrovascular disease in non insulin dependent diabetes mellitus: an epidemic in progress. *Lancet* 1997;350:1-4.
- Semenkovich CF, Heinecke JW. The mystery of diabetes and atherosclerosis. *Diabetes* 1997;46:327-334.
- Diaz NN, Frei B, Vita JA. Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *N Engl J Med* 1997;337:408-416.
- Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest* 1991; 88:1785-1792.
- Witztum JL. Role of modified lipoproteins in diabetic macroangiopathy. *Diabetes* 1997;46:S112-S113.
- Bellomo G, Maggi E, Poli M. Autoantibodies against oxidatively modified low density lipoproteins in NIDDM. *Diabetes* 1995;44:60-66.
- Libby P. Atheroma: more than mush. *Lancet* 1996;348:S4-S7.
- Santini SA, Marra G, Giardina B. Defective plasma antioxidant defenses and enhanced susceptibility to

- lipid peroxidation in uncomplicated IDDM. *Diabetes* 1997;46:1853-1858.
27. **Reaven P.** Dietary and pharmacologic regimens to reduce lipid peroxidation in non insulin dependent diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr* 1995;62:1483S-9S.
  28. **Hein TW, Kuo L.** LDLs impair vasomotor function of the coronary microcirculation. *Cir Res* 1998;83:404-414.
  29. **Pinkey JR, Stehouwer CDA, Coppack SW.** Endothelial dysfunction: cause of insulin resistance syndrome. *Diabetes* 1997;46:S9-S13.
  30. **Miller FJ, Gutterman David D, Rios CD.** Superoxide production in vascular smooth muscle contributes in oxidative stress and impaired relaxation in atherosclerosis. *Cir Res* 1998;82:1298-1305.
  31. **Vergheze M, Hasdal D, Lerman A.** The role of endothelin in coronary atherosclerosis. *Mayo Clin Proc* 1996;71:769-777.
  32. **Tesfamarian B, Brown ML, Deykin D.** Elevated glucose promotes generation of endothelium derived vasoconstrictor prostanoids in rabbit aorta. *J Clin Invest* 1990;85:929-932.
  33. **Tesfamarian B, Cohen R.** Free radicals mediate endothelial cell dysfunction caused by elevated glucose. *Am J Physiol* 1992;263:H321-H326.
  34. **Tagami S, Kondo T, Yoshida K.** Effects of insulin on impaired antioxidant activities in aortic activities in aortic endothelial cells from diabetic rabbits. *Metabolism* 1992;41:1053-1058.
  35. **Johnstone MT, Creager SJ, Scales KM.** Impaired endothelium dependent vasodilation in patients with insulin dependent diabetes mellitus. *Circulation* 1993;88:2510-2516.
  36. **Ting HH, Timirni FK, Boles KS.** Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with non insulin dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1996;97:22.
  37. **Aguirre F, Martin I, Grinspon D.** Oxidative damage, plasma antioxidant capacity, and glucemic control in elderly NIDDM patients. *Free Rad Biol Med* 1998;24:580-585.
  38. **Paolisso G, D'Amore A.** Evidence for a relationship between free radicals and insulin action in the elderly. *Metabolism* 1993;42:659-663.
  39. **Paolisso G, D'Amore A, Volpe C.** Evidence for a relationship between oxidative stress and insulin action in non insulin dependent diabetic patients. *Metabolism* 1994;43:1426-1429.
  40. **Paolisso G, D'Amore A, Giugliano D.** Pharmacologic doses of vitamin E improve insulin action in healthy subjects and non insulin dependent diabetic patients. *Am J Clin Nutr* 1993;57:650-656.
  41. **Low PA, Nickander KK, Tritscher HJ.** The roles of oxidative stress and antioxidant treatments in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes* 1997;46:s38-s42.
  42. **Samiec P, Drews-Botsch C, Flagg KW.** Glutathione in human plasma: decline in association with aging age related macular degeneration and diabetes. *Free Rad Biol Med* 1998;24:699-704.
  43. **Horie K, Miyata T, Maeda K.** Immunohistochemical colocalization of glycoxidation products and lipid peroxidation products in diabetic renal glomerular lesions. *J Clin Invest* 1997;100:2995-3004.
  44. **Ceriello A, Giacomello R, Stel G.** Hyperglycemia-induced thrombin formation in diabetes. *Diabetes* 1995;44:924-928.
  45. **Sies H, Stahl W.** Vitamins E and C,  $\beta$ -carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am J Clin Nutr* 1995;62:1315S-21S.
  46. **Evans RW, Orchard T.** Oxidized lipids in insulin dependent diabetes mellitus A sex -diabetes interaction? *Metabolism* 1993;43:1196-1200.
  47. **Viña J, Sastre J, Asensi M, Packer L.** Assay of blood glutathione oxidation during physical exercise. *Met Enzymol* 1995;251:237-243.
  48. **Leeuwenburgh C, Fiebig R, Chandwaney R.** Aging and exercise training in skeletal muscle: responses of glutathione and antioxidant enzyme systems. *Am J Physiol* 1994;267:R439-445.
  49. **Atalay M, Laaksonen DE, Niskanen L.** Altered antioxidant enzyme defenses in insulin dependent diabetic men with increased resting and exercise induced oxidative stress. *Acta Physiol Scand* 1997;161:195-201.
  50. **Winterbourn CC, Metodieva D.** reaction of superoxide with glutathione and other thiols. *Met Enzymol* 1995;251:81-86.
  51. **Kundu SC, Willson RL.** Thiol(sulfhydryl/thiol) free radical reactions, vitamins,  $\beta$ -carotene, and superoxide dismutase in oxidative stress: design and interpretation of enzymatic studies. *Met Enzymol* 1995;251:69-81.
  52. **Motchnik PA, Frei B, Ames BN.** Measurement of antioxidants in human blood plasma. *Met Enzymol* 1994;234:269-279.
  53. **Colljns AR, Raslova K, Somorovska M.** DNA damage in diabetes: correlation with a clinical marker. *Free Rad Biol Med* 1998;25:373-377.
  54. **Ceriello A, Bortolotti N, Pirisi M.** Total plasma antioxidant capacity predicts thrombosis-prone status in NIDDM patients. *Diabetes Care* 1997;20:1589-1593.
  55. **Woodall AA, Britton G, Jackson MJ.** Dietary supplementation with effects on  $\alpha$ -tocopherol levels susceptibility of tissues to oxidative 1996;76: 307-317.
  56. **Tessier F, Margaritis I, Richard MJ.** Selenium and training effects on the glutathione system and aerobic performance *Med Sci Sports Exerc* 1995;27:390-396.
  57. **Packer L, Colman C.** The antioxidant miracle. J. Wiley and Sons, Inc., New York, 1999.
  58. **Laaksonen DE, Atalay M, Niskanen A.** Increased resting and exercise-induced oxidative stress in young IDDM men. *Diabetes Care* 1996;19:569-574.
  59. **Grattagliano I, Vendemiale G, Boscia F.** Oxidative retinal products and ocular damages in diabetic patients *Free Rad Biol Med* 1998;25:369-372.

## **Instituto Nacional de Salud Pública / The Johns Hopkins University**

### **Quinto Programa Anual de Verano en Salud Pública y Epidemiología**

*31 al 25 de agosto del 2000*

#### **Segunda Convocatoria**

#### **Informes**

Coordinación Ejecutiva del Programa de Verano. Instituto Nacional de Salud Pública. Av. Universidad No. 655, primer piso, cubículo 132, Col. Sta. María Ahuacatitlán, C.P. 062508, Cuernavaca Mor. Tel/Fax: +52 (7) 311-01-11 ext. 3010 y 2610.

e-mail verano@insp3.insp.mx  
jlvalen@insp3.insp.mx