



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

ESTRÉS OXIDATIVO, DEPÓSITOS CORPORALES DE HIERRO Y PRESENTACIÓN DE DIABETES MELLITUS TIPO 2

FELIPE ESTEBAN CANALES PANGUI

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Fomento de la
Producción Animal

PROFESOR GUÍA: MIGUEL ARREDONDO OLGUÍN

SANTIAGO, CHILE
2013



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

ESTRÉS OXIDATIVO, DEPÓSITOS CORPORALES DE HIERRO Y PRESENTACIÓN DE DIABETES MELLITUS TIPO 2

FELIPE ESTEBAN CANALES PANGUI

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Fomento de la
Producción Animal

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : MIGUEL ARREDONDO OLGUÍN
PROFESOR CONSEJERO: MARÍA SOL MORALES SILVA
PROFESOR CONSEJERO: HÉCTOR ADARMES AHUMADA

SANTIAGO, CHILE
2013

Dedicatoria

A mi familia y los grandes seres humanos y no humanos que
conocí en esta Universidad.

Agradecimientos

A todos quienes facilitaron la ejecución de este proyecto, profesores Miguel Arredondo y María Sol Morales, y en especial a Valeria y todos quienes me ayudaron siempre y atendieron mis dudas en el laboratorio de Micronutrientes del INTA, no tengo más que agradecimiento y muy buenos recuerdos.

Índice

Introducción.....	1
Revisión Bibliográfica.....	2
Hipótesis, Objetivo general y específico.....	5
Materiales y Métodos.....	6
Resultados.....	12
Discusión.....	18
Conclusiones.....	22
Bibliografía.....	23

Resumen

El hierro se encuentra en la dieta en dos formas principalmente, como hierro hemínico (Fe-Hem) y como hierro no hemínico (Fe-no Hem), de los cuales el Fe-hem se acumula en mayor cantidad y por un tiempo prolongado en el cuerpo humano. Esta acumulación se ha relacionado con enfermedades crónicas como la diabetes mellitus tipo 2, por lo cual nos propusimos estudiar factores que permitirían predecir de manera temprana daños producto de la acumulación de hierro en el cuerpo, en sujetos con predisposición genética.

Objetivo: Determinar indicadores de estrés oxidativo en hijos de pacientes con diabetes mellitus tipo 2, discutiendo la relación entre estos parámetros con los niveles de depósito de hierro corporal y parámetros bioquímicos y la presentación de esta enfermedad.

Materiales y Métodos: Participaron 70 hijos de sujetos diabéticos y 51 hijos de sujetos aparentemente sanos a modo de control, de edades entre 20 a 45 años. Se les realizaron mediciones antropométricas completas y de presión arterial sistólica y diastólica. Además, se midieron niveles séricos de vitamina E, peroxidación de lípidos en el suero, actividad de enzimas hem-oxigenasa, SOD y GSH, junto a otros parámetros bioquímicos de interés, y el estatus de hierro corporal, junto al análisis de proteína C-reactiva para descartar procesos de inflamación concomitantes que pudiesen interferir con este parámetro.

Resultados: Los siguientes parámetros se encontraron significativamente aumentados en hijos de diabéticos: Peso, circunferencia de cintura e índice de masa corporal; Insulinemia basal, GOT, GPT, colesterol total, LDL y triglicéridos; Hierro corporal total, actividad de hem-oxigenasa y SOD. Además, disminuyeron significativamente en hijos de diabéticos los niveles de receptor para transferrina y GSH. Es importante mencionar que todos estos valores se encontraban dentro de rangos fisiológicos y que ningún individuo presentaba signos de enfermedad.

Conclusiones: Los hijos de diabéticos presentaron mayores niveles de hierro corporal y de estrés oxidativo, lo cual sugiere que estos sujetos presentarían una mayor predisposición a tener estos parámetros alterados tempranamente, lo cual podría constituir un factor de riesgo en caso de presentar a futuro alguna enfermedad crónica, como la diabetes mellitus tipo 2 o una patología cardiovascular, o hasta influir en la aparición y desarrollo de estas enfermedades.

Summary

Iron is found in the diet primarily in two forms, as Heme iron (Heme-Fe) and as Non-Heme iron (non-Heme Fe). Heme-Fe accumulates in greater quantity and for a long time in the human body. The Heme-Fe accumulation has been linked to chronic diseases such as diabetes mellitus type 2, so the aim of this research was to study factors that would predict early damages resulting from the accumulation of iron in the body, in subjects with genetic predisposition.

Objective: To determine indicators of oxidative stress in offspring of type 2 diabetes mellitus patients, discussing the relation between these parameters with factors such as levels of body iron stores and biochemical parameters, and the presentation of the disease.

Materials and Methods: Seventy offspring of diabetic patients and 51 offspring of apparently healthy subjects as a control group, aged between 20 and 45 years old were used. Complete anthropometric measures were performed and the systolic and diastolic blood pressure was measured. Also, serum levels of vitamin E, lipid peroxidation in the serum, activity of enzymes heme-oxygenase, SOD and GSH along with other biochemical parameters of interest were determined along with the body iron status and C-reactive protein to rule concomitant inflammatory processes that could interfere with this parameter.

Results: The following parameters were significantly increased in diabetic offspring: weight, waist circumference and body mass index; fasting insulin, GOT, GPT, total cholesterol, LDL and triglycerides; total body iron, heme-oxygenase activity and SOD. In addition, diabetic offspring had significantly decreased transferrin receptor and GSH levels. It is noteworthy that all these values were within physiological ranges and non-offspring (diabetics or controls) showed signs of disease.

Conclusion: The diabetic children had higher levels of total body iron and oxidative stress, suggesting that these subjects would present a greater predisposition to have these parameters altered early in life, which could constitute a risk factor if they have a chronic disease in the future, such as type 2 diabetes mellitus or cardiovascular disease, or even to influence the onset or development of these diseases.

INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus tipo 2 es una enfermedad crónica de gran relevancia en el mundo entero, que se ha relacionado, entre otros factores, con el aumento de los niveles de hierro corporal, y con el daño producido por el estrés oxidativo.

Cuando la actividad oxidante del cuerpo predomina por sobre la actividad antioxidante, se provoca un daño cuantificable a través de la medición de ciertos parámetros, como la peroxidación de lípidos. Por otro lado, este daño puede ser contrarrestado en cierta medida por antioxidantes como la vitamina E, por lo que la medición de estos antioxidantes también ayudaría a estimar el posible daño causado por estas alteraciones.

Existen antecedentes que indican que cuando el hierro corporal está en exceso se relaciona con la presentación de diabetes y que, además, se estimula la actividad oxidativa en el organismo, relacionándose estrechamente esta actividad con la presencia de la enfermedad. Durante el desarrollo de diabetes mellitus en el organismo, la presencia de daño oxidativo se hace evidente, por lo que investigar y medir variables de estrés oxidativo, así como niveles corporales de hierro en individuos que presenten esta patología, sería de gran utilidad para ayudar a esclarecer los mecanismos y fundamentos de esta asociación.

El presente estudio pretende ayudar a aclarar las relaciones entre diabetes mellitus tipo 2, depósitos corporales de hierro y niveles de estrés oxidativo.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Se describe la diabetes mellitus como un desorden metabólico de etiologías múltiples, caracterizado por hiperglicemia crónica con alteración en el metabolismo de carbohidratos, ácidos grasos y proteínas, como resultado de alteraciones en la secreción de insulina, acción de la insulina o ambos. La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es la forma más común de diabetes, y se caracteriza por una anormalidad en la acción y en la secreción de la insulina, pudiendo predominar cualquiera de estos dos factores (American diabetes association & WHO, 1998), y es una enfermedad que afecta a sus órganos blanco debido al aumento crónico de los niveles de glucosa (Evans *et al*, 2003).

Se ha relacionado esta patología con la presencia de daño por estrés oxidativo, el cuál es resultado del aumento de Especies Reactivas al Oxígeno (ROS) y Especies Reactivas al Nitrógeno (RNS) en el organismo (Evans *et al*, 2003). Además, se describe que la formación de ROS sería consecuencia directa de la hiperglicemia (Brownlee, 2001); sin embargo, este aumento se evidenciaría antes de la presentación de la hiperglicemia (Rosen *et al*, 2001).

Los daños causados por ROS son tanto directos sobre lípidos, DNA y proteínas, como indirectos, ya que actúan también como señales moleculares que activan vías que alteran la función celular, y que podrían ser responsables de complicaciones tardías en la diabetes, además de tener relación con la resistencia a la insulina y los niveles bajos de secreción de ella (Evans *et al*, 2003).

La DM2 es una enfermedad multifactorial, donde altos niveles de depósitos corporales de hierro participarían en la generación de estrés oxidativo; postulándose además, que contribuiría inicialmente en la resistencia a la insulina e incluso posteriormente a la disminución de la secreción de insulina (Jiang *et al*, 2004). El hierro es un micronutriente esencial para muchos procesos fisiológicos y su metabolismo es mantenido por diversos mecanismos, regulado por la absorción intestinal, transporte, utilización, almacenamiento y salida desde la célula (Wallander *et al*, 2006). Sobre este punto, es posible mencionar estudios que han sugerido que una disminución en los depósitos de hierro puede incrementar sustancialmente la absorción

de este nutriente, ya que al medir su absorción mediante técnicas radiactivas de marcación, se encontró que ésta era inversamente proporcional al nivel de ferritina sérica, molécula usada como indicador del nivel de hierro en el organismo (Rajpathak *et al*, 2008).

Es importante que el hierro sea transportado y almacenado, cumpliendo la ferritina este papel como proteína de almacenaje o bien quelado a otras proteínas de bajo peso molecular, pues el hierro libre puede participar como cofactor en procesos de óxido reducción, dada su capacidad de existir en 2 formas iónicas: ferrosa (Fe^{+2}) y férrica (Fe^{+3}). La transferrina es una proteína que capta al hierro absorbido y lo transporta hacia los diferentes tejidos, por lo que el hierro circulante se puede encontrar de 2 formas: como hierro ligado a transferrina y como hierro no ligado a transferrina, aunque este último sólo aparece cuando hay una saturación total de la transferrina circulante (Rajpathak *et al*, 2008). Este hierro libre, redox activo, causaría efectos nocivos en el organismo, y entre ellos, uno de los más dañinos para la célula es la lipoperoxidación, que corresponde a una reacción oxidativa en cadena de ácidos grasos poliinsaturados presentes en la membrana celular, llevando a su disfunción y finalmente a muerte celular (McCord, 2004).

Los radicales libres, moléculas que forman parte de los ROS, pueden ser contrarrestados por moléculas antioxidantes, como las vitaminas E y C. Así, la protección ante la lipoperoxidación es altamente dependiente del contenido de vitamina E, considerada un antioxidante liposoluble de primera importancia, que juega un rol principal y crucial en mantener la integridad de la membrana celular y protegiendo tejidos biológicos críticos contra el daño oxidativo, como es el caso de los revestimientos epiteliales (Mezzetti *et al*, 1995). Existe mucha información que demuestra efectos positivos de la suplementación con vitamina E, que incluye el mejoramiento de la actividad del sistema inmune al disminuir la producción de H_2O_2 por parte de los linfocitos, y el aumento de la proliferación de linfocitos T totales y de inductores de T-helper (Lee y Wan, 2000). Además, se ha relacionado la deficiencia de vitamina E con morfologías anormales en la membrana eritrocitaria, debido al estrés oxidativo al que se han sometido, así como a otras patologías neurológicas cuando esta deficiencia es de largo plazo (Clarke, 2008). Por otra parte, en otros estudios se ha observado que, contrario a lo que comúnmente se tiende a pensar y a lo mostrado en estudios de mayor antigüedad, la susceptibilidad a oxidación de las LDL es mayor en individuos suplementados sólo con alfa-

tocoferol, pero presentan mayor resistencia a este efecto cuando son suplementados con Ubiquinol-10 (CoQ₁₀H₂), el cual es la forma reducida de la coenzima Q, que actúa como co-antioxidante para alfa-tocoferol (Clarke, 2008). Además, los resultados de un estudio demostraron que la suplementación sólo con vitamina E no disminuía la concentración aórtica de hidroperóxidos lipídicos (Terasawa *et al*, 2000). Esto se explicaría, al menos en parte, porque al existir bajos niveles de estos antioxidantes, el radical tocoferilo puede actuar transfiriendo electrones, en lugar de atraparlos, lo que favorecería los procesos oxidativos, originando la Peroxidación Mediada por Tocoferol (TMP) (Clarke, 2008). Estos antecedentes contradictorios generan una paradoja que cuestiona el rol de la vitamina E como suplemento antioxidante.

En estados de intolerancia a la glucosa, se ha observado que la actividad oxidativa aumenta, y en esto puede influir la acumulación excesiva de hierro, que es un elemento pro-oxidante, y que puede llevar a patologías en el hígado, corazón, órganos endocrinos y sistema músculo esquelético (Ford y Cogswell, 1999). Algunos estudios han relacionado altos niveles de ferritina sérica con la presentación de diabetes. Sin embargo, no queda claro si esta presentación se debe a altos niveles de hierro corporal (de lo cual la ferritina sérica es el principal indicador) o a una elevada actividad inflamatoria propia de esta condición (Ford y Cogswell, 1999). De todos modos, en la literatura se reporta bastante información que relaciona el acumulo excesivo de hierro corporal con la presentación de diabetes tipo 2, presentando los individuos con diabetes tipo 2 mayores niveles de ferritina sérica comparado con individuos control (Rajpathak *et al*, 2009). Incluso se recomienda considerar cuidadosamente la decisión de suplementar con hierro a mujeres embarazadas o al menos monitorear constantemente la glicemia de mujeres suplementadas, debido al riesgo de que esto lleve a la presentación de diabetes durante el embarazo (Bo *et al*, 2009). Otros antecedentes indican que la sola ingesta de Fe hemínico, contenido en las carnes rojas, se asocia positivamente con el desarrollo de diabetes tipo 2 (Jiang *et al*, 2004). También, la hemocromatosis hereditaria, enfermedad de origen genético donde la regulación en el metabolismo del hierro está alterada, con un consecuente aumento en los niveles de hierro en el organismo, ha sido relacionada con una incidencia del 25 a 60% de DM2 en los individuos afectados con esta enfermedad (Rajpathak *et al*, 2009).

Por los antecedentes indicados, en este trabajo se pretende estudiar la relación existente entre distintos indicadores de estrés oxidativo y la presentación de Diabetes Mellitus tipo 2.

HIPÓTESIS

Hijos de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 presentan niveles de lipoperoxidación aumentados y niveles de vitamina E disminuidos con respecto a hijos de sujetos no diabéticos.

OBJETIVO GENERAL

Analizar indicadores de estrés oxidativo en hijos de pacientes con diabetes mellitus tipo 2, discutiendo la relación entre estos parámetros, en conjunto con otros factores como los niveles de depósito de hierro corporal y parámetros bioquímicos, y la presentación de esta enfermedad.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar los niveles de productos de la lipoperoxidación en hijos de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 y en sujetos controles.
2. Medir los niveles séricos de vitamina E en hijos de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 y en sujetos controles.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Metodología: Estudios de tríos caso-progenitores: estudio de asociación de base familiar que consiste en la selección de casos incidentes (en este caso, hijos de sujetos diabéticos tipo 2) y sus progenitores.

2.- Cálculo del tamaño de la muestra a estudiar y criterios de selección: Este estudio forma parte de una investigación mayor acerca de predictores de diabetes, para la que, al calcular el tamaño de la muestra de tríos-progenitores, se utilizó el software MedCalc versión 9,2; de libre acceso en la Web. Con un poder estadístico de 80% y un 90% de confianza, se obtuvo un tamaño de muestra de 46 tríos. Considerando una pérdida de 10%, la muestra óptima de estudios fue calculada en 50 tríos: es decir 50 tríos caso-progenitores diabéticos y 50 tríos caso-progenitores sano. Es decir, se estudió un mínimo de 300 individuos en total entre casos y controles. El grupo tríos caso-progenitores diabéticos fue obtenido de la Unidad de Diabetes del Hospital San Juan de Dios (Santiago, Chile). Como el objetivo de esta memoria de título es el estudio de indicadores de estrés oxidativo en hijos de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 y establecer relaciones entre estos parámetros, sólo estudiamos indicadores en los hijos de estos tríos, y dado que el software indica el mínimo de muestras a estudiar, y se lograron obtener más que aquello, el tamaño muestral definitivo corresponde a 70 hijos de diabéticos y 51 hijos de sujetos aparentemente sanos, por si hubiese sido necesario eliminar alguna muestra. La diferencia entre hijos de diabéticos e hijos de sujetos aparentemente sanos, se debió a que fue más simple encontrar familias diabéticas.

A) Criterios de selección para los grupos de estudio:

Criterios intolerancia a la glucosa (IG) y diabetes 2 (American Diabetes Association (ADA), 1998).

IG: Glicemia en ayunas: > 100 mg/dl y <126 mg/dl; y Glicemia post sobrecarga >140 mg/dl <200 mg/dl.

Diabetes: Glicemia en ayunas > 126 mg/dl (en al menos dos determinaciones diferentes); Glicemia a las dos horas post carga de glucosa, en dosis de 200 mg/dl.

Criterios para Insulino Resistencia (IR):

Cuociente Glicemia/Insulinemia en ayunas < de 4,5 en adultos (Legro *et al*, 1998).

Insulinemia a los 60 min post-carga de 75 gr de glucosa oral >100uUI/ml y las dos horas > de 60 uU/ml (en adultos).

HOMA (Homeostatic Model Assessment) permite una estimación de la insulino resistencia de acuerdo a la siguiente fórmula: [Insulina en ayunas (U/ml) x Glicemia en ayunas (mmol/l)]/22,4. Valor normal: < 2,5 (Acosta *et al*, 2002).

Índice de sensibilidad a la insulina (ISI_{Composite}): Se obtendrá a partir de la siguiente fórmula: 10000/ [(GA x IA) x (promedio glucosa PTGO x promedio insulina PTGO)] (Matsuda y DeFronzo, 1999); 10000: Constante; GA: glucosa plasmática en ayunas (mg/dl); IA: insulina plasmática en ayunas (uU/ml). Valor Normal > 5.0.

Criterios para Síndrome Metabólico:

Según la American Heart Association (2005), una persona para ser considerada afectada por un síndrome metabólico, debe presentar: una glicemia en ayunas mayor a 110 mg/dl (o tratamiento farmacológico para disminuir la hiperglicemia) y dos o más de los siguientes parámetros alterados:

- *Obesidad abdominal (perímetro de cintura):* Hombres: > 102 cm; Mujeres: > 88 cm.
- *Triglicéridos:* Hombres/Mujeres: \geq 150 mg/dl ó tratamiento farmacológico para los triglicéridos
- *Colesterol HDL:* Hombres: < 40 mg/dl; Mujeres: < 50 mg/dl ó tratamiento farmacológico

- *Presión arterial:* Hombre/Mujeres: $\geq 130/ \geq 85$ mm Hg ó tratamiento farmacológico para la hipertensión arterial.

B) Criterios de inclusión:

Hombres y mujeres *i)* hijos de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 o *ii)* hijos de sujetos no diabéticos aparentemente sanos, todos ellos entre 20-45 años. Los sujetos debían tener examen físico sin historia de sangramiento intestinal, hepatitis o trastornos del ciclo menstrual.

C) Criterios de exclusión:

Sujetos con anemia ferropriiva diagnosticada, definida como concentraciones de hemoglobina < 120 g/dL en mujeres y < 130 g/dL en hombres, se excluyeron. Uso de medicamentos que afecten el metabolismo de hierro y sujetos vegetarianos. Sujetos con manifestación clínica sugerente de procesos de inflamación o infección. Se utilizó como criterio adicional proteína C reactiva de alta sensibilidad. Esta se determinó a través de nefelometría, un test analítico basado en la dispersión de la radiación que atraviesa las partículas de la materia, en donde la luz se dispersa de distintas maneras dependiendo de la concentración y forma de las partículas (Array Protein System); el límite superior para definir un caso positivo fue de 3 mg/dL.

A los sujetos en estudio que cumplieron con los criterios de inclusión, se les entregó información relacionada al proyecto y debieron firmar un consentimiento informado. Se les realizó una encuesta que recogió información *a)* general de salud y *b)* antecedentes familiares de enfermedades. Se les recolectó una muestra sanguínea de 20 ml, cuyo uso fue desglosado de la siguiente manera: 3 mL para perfil hematológico, el que se evaluó en un contador hematológico de Beckman; 7 mL para perfil bioquímico, para lo cual se usaron kits comerciales, midiendo niveles de glucosa, perfil lipídico y perfil hepático, y 10 mL para obtención de linfocitos a través de filtración en gradiente de Ficoll (Sigma-aldrich), con la finalidad de obtener información acerca de posibles infecciones por cryptosporidium o VIH, entre otras, que pudiesen alterar parámetros a medir. En cada muestra se determinó: glucosa por método de glucosa oxidasa e insulina por RIA (Siemens Medical Solutions Diagnostics Los Angeles CA. USA) y en los sujetos no diabéticos, glicemia e insulinemia post carga (Labtest Diagnóstica, Brasil), basado en la reacción de la glucosa oxidasa.

2) Antropometría, composición corporal y presión arterial

Se efectuaron mediciones antropométricas completas: peso, talla, circunferencia de cintura. La composición corporal se estudió a través de mediciones antropométricas (pliegues, índice de masa corporal). Se realizaron mediciones de presión arterial sistólica y diastólica.

3) Mediciones Bioquímicas:

- *Estrés Oxidativo*

- 1) Vitamina E: Para la determinación de Vitamina E se utilizó un protocolo basado en el descrito por Mezzeti *et al* (1995). Esta se llevó a cabo en 600 µl de plasma, al cual se le agregaron 600 µl de etanol absoluto, y se procedió a agitar la mezcla. Luego, se agregaron 1200 µl de heptano y se procedió a agitar nuevamente, para luego centrifugar los tubos por cinco minutos a 1500xg. Enseguida se tomaron 600 µl de sobrenadante, a los cuales se les agregó 120 µl de batofenantrolina al 0,147%. Posterior a ello se añadieron 60 µl de FeC₁₃ al 0,04% y 60 µl de H₃PO₄ al 6,23% y se llevaron 450 µl a una cubeta para proceder a determinar vitamina E a 532 nm, en espectrofotómetro (Shimadzu, modelo UV-1601).
- 2) Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS): Para determinar la lipoperoxidación en el suero, se utilizó el protocolo descrito por Hadi *et al* (2008). En breve, 500 µl de suero se mezclaron con 1000 µl al 0,67% de ácido 2-tiobarbitúrico y 300 µl al 50% de ácido tricloroacético. Después de la incubación por 30 minutos a 90° C, la mezcla se centrifugó a 2500xg durante 15 min. Luego, el sobrenadante fue removido y se midió en una cubeta a 532 nm, en espectrofotómetro (Shimadzu, modelo UV-1601). La curva de calibración se hizo usando un estándar de malondialdehído 60 µM.
- 3) Actividad de enzima hemo oxigenasa (HO): La actividad de esta enzima se midió en las células mononucleares, para ello, 4 mL de sangre de los sujetos fue procesada con Histopaque-1077® (Sigma-Aldrich) para aislar las células mononucleares (PMN). (4 mL de Histopaque más 4 mL de sangre se centrifugaron por 30 minutos a 1500xg). Los PMN obtenidos fueron lavados con 10 mL de buffer fosfato salino (PBS) 1X (8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na₂HPO₄; 0,24 g KH₂PO₄ cantidad suficiente para 1 L de H₂O destilada) y centrifugados por 10 minutos a 1500xg y el pellet fue resuspendido en 500 µL de PBS 1X y centrifugado por 10 minutos a 1500xg. Luego, el precipitado fue resuspendido bajo

campana (SterilGARD VBM-600) en una placa estéril con 1 mL de medio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) y 100 μ L de H₂O₂ 900 μ M e incubado por 18 hrs (toda la noche) (Incubador CO₂ Shel lab). Posteriormente, el precipitado de PMN se centrifugó por 10 minutos a 1500xg y homogeneizó en 100 μ L de buffer de lisis no denaturante (KH₂PO₄ 20 mM, KCl 135 mM; EDTA 0,10 mM; pH 7,4), se centrifugó por 20 minutos a 10000xg e incubó por una hora a 37° C en oscuridad con la siguiente mezcla de reacción: 100 μ L de muestra, 100 μ L de Hemina 15 μ M (Sigma-Aldrich), 100 μ L de biliverdina reductasa 100 μ g/mL obtenida de los hígados de rata, 600 μ L de buffer de resuspensión (KH₂PO₄ 100 mM; pH 7,4). La reacción se inició al agregar 100 μ L de NADPH 1mM (Sigma-Aldrich). Posteriormente se extrajo la bilirrubina formada con 1 mL de cloroformo mediante agitación por una hora y centrifugación por cinco minutos a 200xg. La concentración de bilirrubina se midió en espectrofotómetro (Shimadzu, modelo UV-1601) a 530 nm. La actividad se expresó como nmoles de bilirrubina formada por mg de proteína total/hora, utilizando su coeficiente de extinción molar ($\epsilon = 43,5 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) (Tenhunen *et al*, 1970).

- 4) Actividad de enzimas superóxido dismutasa y glutatión peroxidada (SOD/GSH): La actividad de la superóxido dismutasa fue determinada en eritrocitos utilizando un kit comercial (Bioxytech SOD-525 Assay; OXIS International Inc, Portland, OR). La curva de calibración fue producida con SOD (EC 1:15.1.1) pura obtenida de hígado de bovino (Sigma, St Louis), y los resultados se expresaron como unidades de SOD/mg de hemoglobina. La actividad GSH peroxidasa en eritrocitos fue determinada usando kit comercial (Ransel, Randox Lab) y expresada como U de GSH/g Hb.
- 5) Estatus de Fe: Se evaluó el Fe sérico mediante Espectrofotometría de Absorción Atómica (AAS) con horno de grafito (Perkin Elmer, Simaa 6100), además se determinó la concentración de hemoglobina y el volúmen corpuscular medio (en contador electrónico de células CELL_DYN 1700, ABBOTT Diagnostics), la capacidad total de fijación del hierro y el porcentaje de saturación de la transferrina (método colorimétrico), la protoporfirina eritrocitaria libre (ZP Hematofluorímetro, modelo 206D, AVIV Biomedical Inc.) y ferritina sérica por enzimo-inmuno ensayo. Estos parámetros permitieron calcular el hierro corporal total.

Con el objeto de detectar presencia de estado infeccioso reciente, el cual de presentarse hubiese interferido con las determinaciones de Fe, se realizaron determinaciones de Proteína C reactiva de alta sensibilidad (QuikRead CRP, Orion Diagnostica).

4) Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se consideraron tres tipos de variables:

- Variable respuesta: nivel de estrés oxidativo.
- Variable explicativa: desarrollo de Diabetes Mellitus tipo 2, depósitos de hierro.
- Variables de control y/o variables interactuantes: relacionada con a) factores metabólicos (concentración de Triglicéridos, colesterol, glicemia, insulinemia), b) metabolismo de Fe (Hb, Fn, Fe total) y c) factores antropométricos (IMC).

Para la descripción estadística se utilizó:

- Promedios geométricos más rango, para variables que no se distribuyen normalmente y promedios \pm desviaciones estándar, para variables de distribución normal.
- T student, para comparar valores entre hijos de diabéticos y grupo control.
- Análisis de asociación y riesgo relativo con test de regresión multinomial o logística para las asociaciones.

Se consideró que existió diferencia significativa cuando p fue $<0,05$. Estos métodos fueron evaluados usando el paquete estadístico STATA 8.0.

RESULTADOS

1) Mediciones antropométricas

Para caracterizar a los hijos de los pacientes diabéticos y de los controles, se evaluó la composición corporal de los individuos a través de distintas mediciones antropométricas: peso, talla, circunferencia de cintura e IMC (Tabla 1). Todos estos parámetros fueron mayores en los hijos de los individuos diabéticos comparados con los hijos de controles, siendo el peso ($p < 0.003$), la circunferencia de cintura ($p < 0.007$) y el índice de masa corporal (IMC) ($p < 0.000$), estadísticamente diferentes.

Tabla 1
Valores antropométricos en la población de hijos de pacientes diabéticos e hijos de sujetos controles.

	Hijos de Controles	Hijos de Diabéticos	T-test
N	51	70	
Edad (años)	29,3	33,6	
Peso (kg)	68.8 ± 12.6	76.6 ± 17.2	0.003
Talla (cms)	164.5 ± 9.4	164.6 ± 9.6	NS
Circunferencia cintura (cms)	84,8 (76,0 – 94,5)	94,6 (70,2 – 127,7)	0,007
IMC (kg/mt²)	25.3 ± 3.4	28.2 ± 5.2	0.000

2) Parámetros hematológicos

Para evaluar los parámetros hematológicos, se determinó el recuento de eritrocitos, el volumen corpuscular medio, la hemoglobina y el hematocrito (Tabla 2). Ninguno de estos parámetros mostró diferencia estadística entre los grupos estudiados, lo cual muestra la homogeneidad de los sujetos en estudio en cuanto a estos parámetros.

Tabla 2
Valores hematológicos en la población de hijos de pacientes diabéticos e hijos de sujetos controles.

	Controles	Diabéticos	T-test
Eritrocitos (x 10⁶ x mm³)	4,7 ± 0,5	4,7 ± 0,5	NS
Volumen corpuscular medio (fl)	86,9 ± 4,8	86,2 ± 5,7	NS
Hematocrito (%)	41,3 ± 4,7	41,2 ± 4,8	NS
Hemoglobina (g/dL)	14,3 ± 1,7	14,3 ± 1,7	NS

3) Mediciones bioquímicas

Con respecto a los parámetros bioquímicos, los hijos de diabéticos mostraron valores mayores en la insulinemia basal, las transaminasas (GOT, GPT), el colesterol total, colesterol LDL y triglicéridos. Todos ellos con diferencias significativas (Tabla 3).

Cabe destacar que tanto la glicemia basal como la glicemia postprandial fueron estadísticamente iguales. Se encontró 18 sujetos hijos de diabéticos con glicemias en ayuno mayor de 110 mg/dL, lo que significa que presentaban glicemias alteradas en estas condiciones.

Tabla 3
Parámetros Bioquímicos en la población de hijos de pacientes
diabéticos e hijos de sujetos controles.

	Controles	Diabéticos	T-Test
Glicemia 0'	89,9 ± 11,0	89,7 ± 14,9	NS
Glicemia 2 hrs	90,7 ± 21,5	98,6 ± 37,0	NS
Insulinemia 0'	4,3 (2,3 – 7,8)	6,9 (2,8 – 17,1)	0,001
Insulinemia 2 hrs	22,5 (8,6 – 58,7)	28,8 (9,6 – 86,5)	NS
GOT (UI/L)	34,1 (17,9 – 64,8)	41,8 (25,3 – 69,0)	0,026
GPT (UI/L)	32,8 (16,8 – 64,2)	47,4 (24,7 – 90,9)	0,002
Fosfatasa alcalina	125,2 ± 34,1	136,3 ± 40,1	NS
BT	0,5 (0,2 – 0,8)	0,5 (0,2 – 0,9)	NS
Creatinina	0,8 (0,6 – 1,1)	0,8 (0,5 – 1,3)	NS
Col T	171,6 ± 31,4	190,8 ± 43,8	0,004
HDL (mg/dL)	34,3 ± 10,2	34,5 ± 10,7	NS
LDL (mg/dL)	111,8 ± 31,6	124,8 ± 36,9	0,024
TG	113,8 (67,6 – 191,4)	134,9 (81,6 – 223,1)	0,036
PCR	0,9 (0,2 – 4,4)	1,1 (0,2 – 5,7)	NS

Estos parámetros a su vez permiten determinar cuántos individuos presentaron síndrome metabólico. Según lo descrito anteriormente, entre los individuos estudiados, sólo 16 presentaban síndrome metabólico.

3) Parámetros de nutrición de hierro

La comparación entre hijos de controles y diabéticos totales, mostró un valor mayor en los hijos de diabéticos para los siguientes parámetros: hierro sérico, porcentaje de saturación, ferritina sérica y de hierro corporal total (TBI), de los cuales sólo la ferritina sérica y el TBI tienen una diferencia significativa ($p < 0,001$ y $p < 0,002$, respectivamente), mientras que los hijos de controles mostraron mayores valores en la capacidad total de fijación de hierro (TIBC) y receptor para transferrina, con una diferencia significativa sólo en este último parámetro (Tabla 4).

Tabla 4
Parámetros de Nutrición de hierro en la población de hijos de pacientes diabéticos e hijos de sujetos controles

	Controles	Diabéticos	T-test
Hierro sérico (mg/dL)	92,0 ± 35,8	99,3 ± 38,6	NS
TIBC (mg/dL)	357,8 ± 67,4	353,4 ± 70,9	NS
% de saturación Tf	26,6 ± 11,1	29,7 ± 13,8	NS
Ferritina sérica (µg/L)	23,4 (8,9 – 61,9)	31,2 (11,5 – 84,8)	NS
Receptor para transferrina (µg/ml)	4,1 (2,2 – 7,9)	2,3 (0,8 – 6,8)	0,001
TBI (mg/kg)	4,3 (2,3 – 8,2)	6,9 (3,1 – 15,4)	0,002

4) Parámetros de estrés oxidativo

Los hijos de diabéticos presentaron un mayor valor en sus niveles de enzima hemoxigenasa (HO) y superóxido dismutasa (SOD) ($p < 0,000$ y $p < 0,002$, respectivamente), siendo ambas diferencias significativas. La enzima glutatión peroxidada (GSH) está más elevada en el grupo control ($p < 0,002$), correspondiendo también a una diferencia significativa. El valor de vitamina E fue igual en ambos grupos.

Tabla 5
Parámetros de estrés oxidativo en la población de hijos de pacientes
diabéticos e hijos de sujetos controles.

	Controles	Diabéticos	T-test
HO	2,3 (0,7 – 7,5)	5,7 (1,8 – 18,3)	0,000
TBARS	0,7 (0,3 – 0,7)	0,9 (0,3 – 3,3)	NS
Vitamina E	0,14 (0,03 – 0,7)	0,13 (0,02 – 0,8)	NS
SOD	3,3 ± 0,4	3,9 ± 0,6	0,002
GSH	56,5 ± 12,5	42,0 ± 15,5	0,002

TBARS: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

Según los resultados de este estudio, podemos resumir las alteraciones presentadas por los hijos de diabéticos en la tabla 6.

Tabla 6
Parámetros alterados en los hijos de pacientes con Diabetes Mellitus
tipo 2 con respecto a los hijos de sujetos controles.

	 Hijos de Diabéticos
Peso	Aumentado
Circunferencia Cintura	Aumentada
IMC	Aumentado
Insulinemia Basal	Aumentada
GOT	Aumentada
GPT	Aumentada
Colesterol Total	Aumentada
Colesterol LDL	Aumentadas
Triglicéridos	Aumentados
Receptor para Transferrina	Diminuído
Hierro Corporal Total (TBI)	Aumentado
Act. Hem Oxigenasa	Aumentada
SOD	Aumentada
GSH	Diminuída

DISCUSIÓN

Valores antropométricos

Al analizar los valores antropométricos se observa que los valores de circunferencia de cintura, peso e índice de masa corporal (IMC), son mayores en los individuos hijos de diabéticos. La obesidad es un importante factor de riesgo para la DM2 (Rajpathak *et al.*, 2009) y se ha asociado a la vez con niveles elevados de Fe corporal, relacionándose positivamente el IMC con los niveles de ferritina sérica ajustada a la medición de proteína C-reactiva, (Ford y Cogswell, 1999). Los resultados del presente estudio dejan de manifiesto la existencia de relación entre los hijos de diabéticos e indicadores de obesidad manifestados de manera temprana.

Parámetros de nutrición de hierro

Este estudio muestra que los hijos de pacientes con DM2 presentan mayores niveles de TBI y receptor para transferrina. A pesar de esto, podemos traducir estos resultados como una presencia de mayor nivel de Fe total en estos individuos comparados con los controles. Se sabe que esta patología tiene un componente genético-hereditario, y estos resultados se condicen con la relación establecida en literatura entre niveles corporales de hierro y diabetes, en donde estudios prospectivos han mostrado mayores niveles de ferritina sérica en individuos que a futuro presentan diabetes, comparado con individuos controles (Jiang, 2004), aunque no se han llevado a cabo estudios de causa-efecto al respecto. El Fe hem es absorbido con gran eficiencia por el organismo, al no ser afectado por quelantes e inhibidores que sí afectan al Fe no hem, y se va acumulando en el tiempo de manera lineal (Schumann, 2001). Este resultado se condice con otros descritos en anteriores investigaciones (Psyrogiannis, 2003) y apoya la tesis de que los niveles de hierro podrían ser predictores de mayor probabilidad a presentar DM2 a futuro.

Hay que tener en cuenta que la ferritina sérica, a pesar de ser considerada como un buen indicador del estatus de hierro corporal, no es específica para este apartado, pues es también una proteína de fase aguda de la inflamación, por lo que puede estar aumentada ante la presencia de cualquier proceso inflamatorio, por lo demás muy comunes en cualquier patología. En este estudio, quedó de manifiesto a la prueba de proteína C-reactiva (PCR) que existen procesos inflamatorios concomitantes, que podrían estar interfiriendo con la medición de ferritina sérica y

su interpretación como indicador del estatus de hierro, por lo que debemos analizar este parámetro muy cuidadosamente y en conjunto a los demás datos.

La relación entre altos niveles de Fe y DM2 se ha establecido con claridad en sujetos que presentan hemocromatosis hereditaria, pero aun sin establecer relaciones causa-efecto en individuos sanos, en donde faltan estudios de características intervencionales para concluir una teoría de esta índole. Sin embargo, aun cuando hacen falta estudios más conclusivos, existe abundante evidencia que apoya esta relación. Además, se han relacionado muchas vías activadas por los productos del estrés oxidativo, que a la vez colaboran en perpetuar el problema de la hiperglicemia y de la insulino-resistencia (Evans, 2003).

Se debe mencionar que, a pesar de no ser los más sensibles para el estudio de la nutrición de hierro, estos parámetros son los básicos para un estudio hematológico de este tipo.

Parámetros de estrés oxidativo

Los niveles de GSH se encuentran disminuidos en individuos hijos de diabéticos, como ocurre normalmente con los antioxidantes del organismo en situaciones de elevado estrés oxidativo (Collier *et al.*, 1990). La GSH es un antioxidante no enzimático, que, al igual que otros agentes antioxidantes, puede disminuir en cantidad en el organismo debido a la presencia de diversos agentes oxidantes (Tewari *et al.*, 2010). En este caso, se encontraron individuos con un nivel elevado de hierro comparado con los controles, lo cual podría ser la causa de la disminución de los niveles de GSH en estos mismos sujetos, dado el aumento en los niveles de ROS que se produce por la gran cantidad de Fe circulante. ROS y RNS dañan a las células y deben ser contrarrestados por diversos mecanismos de protección antioxidante. Sin embargo, los niveles de SOD se encuentran aumentados en los hijos de diabéticos respecto al grupo control, y esto se debe a que esta enzima antioxidante es, hasta cierto punto, estimulada por agentes oxidantes (López *et al.*, 2004). Ciertamente, esta enzima también puede disminuir en cantidad al verse sobrepasada por un estímulo oxidante demasiado elevado, lo cual es indicado en otros estudios que midieron esta variable en individuos diabéticos (Kornatowska *et al.*, 1998; Collier *et al.*, 1990).

Otro de los parámetros que ayudan a evaluar el nivel de estrés oxidativo en el organismo, es la medición de TBARS (siglas en inglés para “Thiobarbituric acid reactive

species”), productos que se forman a causa de la peroxidación de lípidos. Como se mencionó anteriormente, ROS y RNS, cuya presencia se exagera a causa de la sobrecarga de hierro en el organismo, tienen efectos deletéreos directos sobre componentes orgánicos tales como el DNA, proteínas y lípidos. La lipoperoxidación es uno de los efectos más destructivos causados por el hierro libre, ya que es una reacción en cadena del grupo acilo de ácidos grasos poliinsaturados en membranas celulares, llevando a disfunción y muerte celular (McCord, 2004). Al ser causada por hierro libre redox-activo, es esperable se encuentre un valor para TBARS mayor en individuos que presentan patologías que causan un incremento en el estrés oxidativo, como es el caso de la diabetes (Hadi *et al.*, 2009; Kornatowska *et al.*, 1998). Contrario a lo que esperábamos, en este estudio no se vio una diferencia significativa para TBARS entre hijos de diabéticos e hijos de controles, lo cual podría deberse a que los hijos de diabéticos se encuentran en una etapa previa, en donde encontramos algunos indicios de daño oxidativo, pero no extensivo a todos los parámetros.

Otro resultado importante del presente estudio, es el aumento marcado en los niveles de la enzima hemo oxigenasa (HO) en hijos de diabéticos, con respecto al grupo control. Esta enzima participa en la regulación intracelular de Fe mediante distintas acciones, siendo una de ellas el aumento de la inducción de la HO en las células, al estar el organismo expuesto a condiciones de estrés celular aumentado o concentraciones elevadas de hem (Böni *et al.*, 1993). Por lo tanto, estos resultados son consistentes con aquellas evidencias previamente conocidas.

Para efectos de esta investigación, se utilizó el método de medición de vitamina E en la sangre de Mezzetti (1995), descrito ya en los materiales y métodos. La concentración de vitamina E en plasma no presentó diferencias entre ambos grupos ($p > 0,05$), contrariamente a lo esperado en un principio. Sin embargo, coincide con resultados de estudios con individuos fumadores y no fumadores, en donde planteaban, como teoría para explicar aquello, que la principal defensa frente a la actividad oxidativa sería la vitamina C, actuando de manera más rápida, dando paso al actuar de la vitamina E sólo cuando sus reservas se encuentran depletadas (Mezzetti *et al.*, 1995). Además, estudios en niños con beta-talasemia, enfermedad en que el estrés oxidativo se encuentra aumentado, han mostrado una mayor disminución en el nivel de vitamina C que en el de vitamina E en plasma de los individuos afectados, en donde la vitamina

C se encuentra en aproximadamente 1/5 del nivel fisiológico, mientras que la vitamina E se encuentra bastante cerca del límite inferior (Dissayabutra *et al.*, 2005).

Se encontraron valores elevados de HO y SOD, así como disminuidos de GSH en hijos de diabéticos, lo cual nos indicaría por tanto un incremento en la actividad oxidativa en ellos, aun cuando no están presentando signos clínicos de enfermedad, constituyendo un indicador temprano de un funcionamiento deteriorado del organismo en este punto. Este tipo de evidencias tempranas han sido ya presentadas en otros estudios, observándose que valores elevados de ciertos indicadores relativos al aumento de hierro y estrés oxidativo, se ven aumentados antes de presentarse signos clínicos de alguna patología, presentándose como buenos predictores, principalmente en el caso de la ferritina sérica (Fumeron *et al.*, 2006).

CONCLUSIONES

- Hijos de diabéticos presentan mayores niveles de Fe corporal total, demostrado por sus mayores niveles de hierro corporal total (TBI) y menores de receptor para transferrina.
- Hijos de diabéticos presentan mayores niveles de estrés oxidativo, reflejado por mayores valores de enzimas hemo oxigenasa (HO) y superóxido dismutasa (SOD) que presentan con respecto al grupo control, así como por los menores niveles de glutatión peroxidada (GSH), que actúa como antioxidante.
- No se encontraron diferencias en los niveles de Vitamina E sérica entre ambos grupos.
- Los resultados sugieren que los hijos de pacientes con Diabetes mellitus tipo 2 presentarían una mayor predisposición a tener niveles más elevados de hierro corporal, así como también de indicadores de estrés oxidativo con respecto a individuos control, lo cual podría constituir un agravante de los daños al organismo en caso que desarrollasen diabetes mellitus tipo 2 u otra enfermedad cardiovascular, así como un elemento que influya para que alguna de estas patologías se desarrolle.

BIBLIOGRAFÍA

Acosta, A.; Escalona, M.; Maiz, A.; Pollak, F.; Leighton, F. 2002. Determinación del índice de resistencia insulínica mediante homa en una población de la región metropolitana de Chile. *Rev. Med. Chile.* 130: 1227-1231.

American Diabetes Association. 1998. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 21: S5-S19.

Grundy, S.; Cleeman, J.; Daniels, S.; Donato, K.; Eckel, R.; Franklin, B.; Gordon, D.; Krauss, R.; Savage, P.; Smith, S.; Spertus J.; Costa, F. 2005. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an american heart association, lung and blood institute scientific statement. *Circulation.* 112: 2735-2752.

Bo, S.; Menato, G.; Villois, P.; Gambino, R.; Cassader, M.; Cotrino, I.; Cavallo-Perin, P. 2009. Iron supplementation and gestacional diabetes in midpregnancy. [en línea]. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 201: 1.e1-1.e6. <http://www.ajog.org/article/S0002-9378%2809%2900443-8/abstract> [consulta: 25-06-2009]

Böni, R.; Hugh-Boni, R.; Galbraith, R.; Drummom, G.; Kappas, A. 1993. Tin-mesoporphyrin inhibits heme oxigenase activity and heme-iron absorption in the intestine. *Pharmacology.* 47: 318-329.

Brownlee, M. 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 414: 813-820.

Clarke, M.; Burnett, J. 2008. Vitamin E in human health and disease. *Crit. Rev. Clin. Lab Sci.* 45: 417-450.

Collier, A.; Small, M.; Wilson, R.; Bradley, H.; Thomson, J.A. 1990. Free radical activity in type 2 diabetes. *Diab. Med.* 7: 27-30.

Dissayabuttra, T.; Tosukhowong, P.; Seksan, P. 2005. The Benefits of Vitamin C and Vitamin E in Children with B-Thalassemia with High oxidative Stress. *J. Med. Assoc. Thai.* 88: S317-21.

Evans, J.; Goldfine, I.; Maddux, B.; Grodsky, G. 2003. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and B- cell dysfunction?. *Diabetes.* 52: 1-8.

Ford, E.; Cogswell, M. 1999. Diabetes and serum ferritin concentration among U.S. adults. *Diabetes Care.* 22: 1978-1983.

Fumeron, F.; Péan, F.; Driss, F.; Balkau, B.; Tichet, J.; Marre, M.; Grandchamp, B. 2006. Ferritin and transferrin are both predictive of the onset of hyperglycemia in men and women over 3 years. *Diabetes Care.* 29: 2090-2094.

Hadi, N.; Hussein, M.; Rudha, A. 2008. Effect of atorvastatin on oxidative stress parameteres and lipid profile in type 2 diabetic patients. *The Int. Med. J.* 2: 44-52.

Hashim, S.; Schuttringer, G. 1966. Rapid determination of tocopherol in macro- and microquantities of plasma. *Am. J. Clin. Nutr.* 19: 137-145.

Jiang, R.; Manson, J.; Meigs, J.; Ma, J.; Rifai, N.; Hu, F. 2004. Body iron stores in relation to risk of type 2 diabetes in apparently healthy women. *JAMA.* 291: 711-717.

Lee, C.; Wan, J. 2000. Vitamin E supplementation improves cell-mediated immunity and oxidative stress of asian men and women. *J. Nutr.* 130: 2932-2937.

Kornatowska, K.; Luciak, M.; Blaszczyk, J.; Pawlak, W. 1998. Lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in erythrocytes of patients with non-insulin dependent diabetes with or without diabetic nephropathy. *Nephrol. Dial. Transplant.* 13: 2829-2832.

Legro, R.; Finegood D.; Dunaif A. 1998. A fasting glucose to insulin ratio is a useful measure of insulin sensitivity in women with polycystic ovary syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83: 2694-2698.

Lopez, F.; Hernández-Palazón, J.; López, R.; Alarcón, E.; Martinez-lage, J.F. 2004. Activity of copper-zinc superoxide dismutase in a global ischemic brain lesion model without arterial hypotension. *Neurocirugía.* 15: 151-158.

Matsuda, M.; DeFronzo, R. 1999. Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing. *Diabetes Care.* 22: 1462-1470.

McCord, J. 2004. Iron, free radicals, and oxidative injury. *J Nutr.* 134: 3171S-3172S.

Mezzetti, A.; Lapenna, D.; Pierdomenico, S.; Calafiore, A.; Constantini F.; Riario-Sforza, G.; Imbastaro, T.; Neri, M.; Cuccurullo, F. 1995. Vitamins E, C and lipid peroxidation in plasma and arterial tissue of smokers and non-smokers. *Atherosclerosis.* 112: 91-99.

Psyrogiannis, A.; Kyriazopoulou, V.; Symeonidis, A.; Leotsinidis, M.; Vagenakis, A. 2003. Relative iron “overload” in offspring of patients with type 2 diabetes Mellitus: a new component in the conundrum of insulin resistance syndrome?. *Hormones.* 2: 161-168.

Rajpathak, S.; Crandall, J.; Wylie-Rosett, J.; Kabat, G.; Rohan, T.; Hu, F. 2008. The role of iron in type 2 diabetes in humans. *Biochim. Biophys. Acta.* 1790: 671-681.

Rosen, P.; Nawroth, P.P.; King, G.; Moller, W.; Tritschler, H.J.; Packer, L. 2001. The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association, and the German Diabetes Society. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 17: 189–212.

Schumman, K. 2001. Safety aspects of iron in food. *Ann. Nutr. Metab.* 45:91-101.

Tenhunen, R.; Ross M.; Marver, H.; Schmid R. 1970. Reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate dependent biliverdin reductase partial purification and characterization. *Biochemistry.* 9: 298-303.

Terasawa, Y.; Ladha, Z.; Leonard, S.; Morrow, J.; Newland, D.; Sanan, D.; Packer, L.; Traber M.; Farese, R. 2000. Increased atherosclerosis in hyperlipidemic mice deficient in α -tocopherol transfer protein and vitamin E. *PNAS.* 25: 13830-13834.

Tewari-Singh, N.; Agarwal, C.; Huang, J.; Day, B.; White, C.; Agarwal, R. 2010. Efficacy of glutathione in ameliorating sulfur mustard analog-induced toxicity in cultured skin epidermal cells and in SKH-1 mouse skin in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 336: 450-459.

Wallander, M.; Leibold, E.; Eisenstein, R. 2006. Molecular control of vertebrate iron homeostasis by iron regulatory proteins. *Biochim. Biophys Acta.* 1763: 668-689.