

CORRELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE HEMOGLOBINA GLICADA Y LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES, EN PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2

L. VERGARAY¹, Y. ROBLES¹, E. FLORES¹, S. SUAREZ²

¹ Instituto de Química Biológica, Facultad de Farmacia y Bioquímica

² Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición, Facultad de Medicina
UNMSM

RESUMEN

Se ha determinado los niveles Hemoglobina glicada A_{1c} , Superóxido dismutasa, Glutation peroxidasa y Malondialdehído en 25 pacientes con Diabetes mellitus tipo 2, participantes en el Programa de Educación para Pacientes Diabéticos del Hospital Arzobispo Loayza y se ha comparado con un grupo control integrado por 15 individuos aparentemente sanos, ambos grupos de 40 – 75 años, a fin de observar posibles diferencias entre ellos y correlaciones respectivas. Existe una correlación positiva entre los niveles de Hemoglobina glicada A_{1c} - Superóxido dismutasa ($r=0,164$, $p<0.05$) y Hemoglobina glicada A_{1c} - Malondialdehído ($r=0.432$, $p<0.05$). Se deduce que el elevado nivel de Malondialdehído está asociado con las complicaciones de la Diabetes mellitus tipo 2, debido a la alta generación de radicales libres, conduciendo a un desbalance del sistema antioxidante, generando niveles bajos de Glutation peroxidasa, niveles normales o ligeramente elevados de superóxido dismutasa frente al grupo control.

Palabras claves: Superóxido dismutasa (SOD), Glutation Peroxidasa (GPx),
Diabetes Mellitus Tipo 2 (DMNID)

SUMMARY

It has been determined Glycated A_{1c} haemoglobin, Superóxido Dismutase, Glutation peroxidase and Malondialdehyde levels in 25 patients with Diabetes mellitus type 2, whom participate in the Education Program for Diabetic Patients, from Arzobispo Loayza Hospital, they were confront with 15 persons apparently healthful control group. There is a positive correlation between Glycated A_{1c} haemoglobin - Superoxido Dismutase ($r=0,164$, $p<0.05$) and Glycated A_{1c} haemoglobin - Malondyaldehyde ($r=0.432$, $p<0.05$) levels. We deduce that a high level of Malondialdehyde is associate with the Diabetes mellitus type 2 complications, for a high free radicals generation, that conduce to antioxidantes system disequilibrium, resulting low levels Glutation peroxidase, normal or high slightly level Superoxido Dismutase confront control group..

Key words: Superoxide Dismutase (SOD), Glutatione Peroxidase (GPx)
Diabetes Mellitus type 2 (NIDDM)

INTRODUCCIÓN

La Diabetes mellitus es una enfermedad metabólica crónica, compleja y heterogénea, que se caracteriza por la hiperglicemia y alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos y lípidos, generando una serie de complicaciones agudas y crónicas de gravedad variable, que con frecuencia afectan negativamente la calidad de vida. La interacción química espontánea de la glucosa con las proteínas, se ejemplifica con la hemoglobina glicada A_{1c} .

Las complicaciones de esta enfermedad: aterosclerosis, neuropatía, nefropatía, cardiopatía, ceguera y otros, están asociadas a incrementos en la producción de radicales libres, que conducen a un desequilibrio frente a los mecanismos antioxidantes, dando lugar a la formación continua, progresiva y acumulación de daños en células y tejidos, generando intensos trastornos funcionales en los diversos niveles de organización: ultraestructuras, células y órganos.

Este estado denominado estrés oxidativo, tal vez juega un rol importante en el desarrollo de las complicaciones en los pacientes diabéticos. Puede ser medido a través de indicadores como la formación de malondialdehído, depleción de glutatión u oxidación de proteínas entre otros.

El organismo está dotado de un complejo sistema antioxidante: enzimático, como la superóxido dismutasa, que transforma los radicales superóxido en peróxido de hidrógeno; catalasa y glutatión peroxidasa, que detoxifican el peróxido de hidrógeno; y un sistema no enzimático tales como glutatión, vitaminas A, C, E, entre otras.

En el presente trabajo se han determinado Hemoglobina glicada A_{1c} e indicadores de estrés oxidativo y defensa antioxidante séricos en pacientes con Diabetes mellitus tipo 2 con la finalidad de hallar el grado de correlación, para contribuir a resolver los interrogantes de numerosos problemas médicos actuales y mejorar o complementar las medidas terapéuticas aplicadas a las mismas.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL BIOLÓGICO

La población en estudio está constituida por un total de 40 personas de ambos sexos, y edades comprendidas entre 40 y 75 años. De ellos 15 aparentemente saludables fueron considerados como grupo control. El resto integrado por 25 pacientes con Diabetes mellitus no insulino dependiente que forman parte del programa de Educación para el diabético en el Servicio de Endocrinología del Hospital Arzobispo Loayza, fue considerado como grupo diabético.

Los criterios de inclusión para la toma de muestra aplicados para los pacientes fueron:

- a) personas de ambos sexos, no menor de 2 años de padecimiento de la enfermedad,
- b) que presenten complicaciones tardías propias de la enfermedad, seleccionados previa encuesta con asesoría médica.

La sangre fue recolectada en tubos heparinizados, excepto para la determinación de la HbA_{1c} que se realizó en sangre capilar y analizados al instante en un espectrofotómetro automatizado.

PARÁMETROS BIOQUÍMICOS

DETERMINACIÓN DE HEMOGLOBINA GLICADA A_{1c} (1)

En este análisis se determinan la concentración de HbA_{1c} , la concentración de hemoglobina total y la relación entre ambas, que se informa como porcentaje de HbA_{1c} . Para la determinación de la hemoglobina total se utiliza ferricianuro potásico, y tiocianato formándose el complejo coloreado tiocianometahemoglobina, que se mide a 531 nm. La intensidad del color es proporcional a la concentración de hemoglobina total en la muestra.

La HbA_{1c} se determina en un Sistema DCA 2000, que utiliza la inhibición de la aglutinación de partículas de latex recubiertas con un anticuerpo monoclonal de ratón, específico para HbA_{1c} . Esta reacción de aglutinación produce un incremento de la dispersión de luz, que se mide como un incremento de la absorbencia a 531 nm.

DETERMINACIÓN DE SUPERÓXIDO DISMUTASA (2)(3)

Se realizó según el método de Misra y Fridovich, consiste en la capacidad de SOD de inhibir la autooxidación de la epinefrina a adrenocromo, a un pH de 10,2. La reacción es medida a una longitud de onda de 480 nm, correspondiente al adrenocromo.

DETERMINACIÓN DE GLUTATION PEROXIDASA (4)

Se realizó según el método de Paglia y Valentine. La GPx cataliza la oxidación del glutathion (GSH) por el hidróperóxido de cumeno. El glutathion oxidado (GSSG) en presencia de glutathion reductasa (GR) y NADPH es inmediatamente convertido en su forma reducida con una oxidación concomitante de NADPH en $NADP^+$. Se mide la disminución de la absorbencia a 340 nm.

INDICADOR DEL DAÑO OXIDATIVO:

DETERMINACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS AL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBA) (5)

El malondialdehído (MDA) y otros aldehídos al reaccionar con dos moléculas de ácido tiobarbitúrico (TBA), bajo condiciones de acidez y temperatura controladas, forman un cromógeno rojo (MDA-TBA), que puede ser medido espectrofotométricamente a 535 nm. La intensidad de color de este compuesto es proporcional a la concentración del malondialdehído en la muestra.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En ambos grupos, la normalidad de los niveles de Hemoglobina glicada A_{1c} , Superóxido Dismutasa, Glutathion peroxidasa y Lipoperoxidación fue comprobada por la prueba de Lilliefors; seguidamente se halló el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación, respectivamente.

Para hallar la correlación materia de nuestra investigación se emplea el método de Correlación de Pearson.

Cuadro N° 1. Parámetros estadísticos de Hemoglobina glicada A_{1c} (HbA_{1c}) Malondialdehído (MDA), Superóxido Dismutasa (SOD) y Glutation Peroxidasa (GPx)

GRUPOS CONTROL Y DIABÉTICOS TIPO 2

	GRUPO CONTROL n = 15			GRUPO DIABÉTICO n = 25			p*
	X	DS	CV	X	DS	CV	
HbA _{1c}	5,42	0,24	4,40 %	8,86	2,92	33,00 %	< 0,001
SOD	765,10	93,30	12,20 %	742,60	63,80	8,60 %	n.s
GPx	44,95	13,04	29,00 %	26,36	2,35	8,90 %	< 0,001
MDA	123,16	12,12	9,80 %	150,52	19,34	9,20 %	< 0,001

* Con significancia estadística

Cuadro N° 2. Correlación entre las concentraciones de Hemoglobina Glicada A_{1c} (HbA_{1c}) Superóxido Dismutasa (SOD), Glutation Peroxidasa (GPx) y Malondialdehído (MDA) en ambos grupos de estudio

	GRUPO CONTROL n = 15		GRUPO DIABÉTICO n = 25	
	Coefficiente de Correlación r	P	Coefficiente de Correlación r	P
HbA _{1c} vs SOD	0,164	< 0,05	-0,149	n.s.
HbA _{1c} vs GPx	-0,083	n.s	0,081	n.s.
HbA _{1c} vs MDA	-0,083	n.s	0,432	< 0,05
MDA vs SOD	0,099	n.s	0,011	n.s.
MDA vs GPx	0,282	n.s	-0,248	n.s.
GPx vs SOD	-0,207	n.s	0,378	n.s.

Resultados y Discusión

La Diabetes mellitus no insulino dependiente se caracteriza por una falta de utilización de la glucosa por el hígado y el músculo, conduciendo a una hiperglicemia, cuyo incremento es responsable de las complicaciones del paciente diabético. El marcador bioquímico de la hiperglicemia es la HbA_{1c}, de gran utilidad para establecer el grado de control glicémico en los pacientes diabéticos.

Las proteínas de la membrana del eritrocito sufren una glicación no enzimática a lo largo de su vida media formando inicialmente una base de Schiff que siguiendo un reordenamiento de Amadori da origen a productos finales estables, la cantidad de productos de Amadori, y las proteínas modificadas se encuentran elevados en los pacientes diabéticos⁽⁶⁾. Como la vida media promedio de los eritrocitos es de aproximadamente 60 días, la medición de las fracciones glicosiladas de la Hemoglobina del adulto (HbA) tales como la HbA_{1c} refleja el nivel de glicemia en un periodo aproximado de 2 meses⁽⁷⁾.

Según se ha observado en trabajos experimentales de glicosilación no enzimática de la HbA_{1c}, a medida que se eleva el nivel de glucosa en la sangre, el nivel de la glicosilación no enzimática de las proteínas es proporcional al nivel de glicemia y al ciclo de vida de las proteínas glicosiladas.

En nuestro trabajo, como era de esperarse, los valores medios hallados de HbA_{1c} (Tabla 1) fueron significativamente más elevados que los controles ($p < 0,001$).

En la diabetes se ha puesto de manifiesto una serie de cambios que permiten señalar un incremento en la formación de radicales libres, entre los que cabe destacar: a) una disminución de concentraciones plasmáticas e intracelulares de antioxidantes, posiblemente como un resultado de su mayor consumo, producto de una mayor generación de radicales libres; b) aumento de la concentración de sustancias plasmáticas que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico, derivadas de la reacción de radicales libres con lípidos; c) una mayor susceptibilidad de las lipoproteínas a oxidarse⁽⁸⁾. Así pues se producen numerosos cambios que de forma indirecta permiten indicar que en la diabetes existe un marcado estrés oxidativo.

La glicación de proteínas no sólo ocurre con la hemoglobina, sino también con proteínas que participan en el sistema antioxidante, como GPx y SOD que actúan frente a los pro oxidantes, asimismo la albúmina, las lipoproteínas, el colágeno; procesos que tiene mucha implicancia en la evolución de la diabetes⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾.

Es conocido que la auto oxidación de los azúcares genera radicales libres de oxígeno a concentraciones elevadas de glucosa típica de estados diabéticos, la producción de radicales libres se incrementa en presencia de metales de transición.⁽¹⁰⁾

El desbalance entre los mecanismos de prooxidación y anti oxidación bien por el aumento de los agentes pro oxidantes o el descenso de los antioxidantes de cualquier órgano, sistema o grupo celular, puede condicionar a diferentes formas de enfermedad⁽¹¹⁾⁽¹²⁾⁽¹³⁾.

Un mecanismo de defensa primaria es la SOD, enzima que se encarga de dismutar al radical libre superóxido, sin embargo en el presente trabajo no se ha hallado diferencia significativa en el promedio de ambos grupos de estudio (742,60 U /g Hb, en pacientes con Diabetes mellitus tipo 2, frente a 765,10 U /g Hb del grupo control).

El incremento de la actividad de SOD es reflejo de una elevada generación de anión superóxido en la célula y de eliminación por esta enzima. Sin embargo una, intensa

producción de este radical por un tiempo prolongado agota la estimulación de la actividad de esta enzima, puesto que el producto de la reacción puede inhibirla. Esto explicaría la relativa disminución de la actividad de SOD en estos pacientes diabéticos crónicos.

Al parecer, la actividad de la SOD participa en la preservación de la integridad capilar, reduce los niveles de malondialdehído en el riñón, atenúa la glomerulonefritis, disminuye la proteinuria⁽¹⁴⁾. Diversos estudios han confirmado que una variedad de radicales libres son generados en la reperfusión coronaria, si el corazón ha recibido una reperfusión con SOD, todos los radicales atrapados son atenuados⁽¹⁴⁾, sugiriendo que todos ellos son derivados secundarios del anión superóxido.

En este trabajo, hemos observado una reducción significativa ($p < 0.001$) de la actividad de GPx en hematíes en el grupo de pacientes diabéticos. Los valores promedios encontrados fueron de 26,36 ($\pm 2,35$) U /g Hb y 44,95 ($\pm 13,04$) U /g Hb para pacientes con Diabetes mellitus tipo 2 y el grupo control respectivamente.

Esta enzima constituye una de las defensas primarias del ciclo redox que posee mayor afinidad para descomponer el H_2O_2 en presencia de glutatión, lo que sugiere que en condiciones normales es esta enzima la que lo degrada principalmente, teniendo en cuenta el alto contenido de glutatión GSH en glóbulos rojos. De modo que la baja actividad de GPx observada en los pacientes diabéticos es claro índice de la existencia de estrés oxidativo, o bien que los sistemas de regeneración de glutatión no funcionan correctamente⁽¹⁵⁾.

Forceville y col. (1998), observaron niveles bajos de GPx en personas enfermas, particularmente con enfermedades agudas y severas⁽¹⁶⁾. Aún en condiciones fisiológicas, Rodríguez Capote (1998) encontró que la actividad de GPx determinada en ratas, disminuye a medida que avanza la edad⁽¹⁹⁾.

Es posible que en los primeros momentos de un estado crónico de la Diabetes mellitus tipo 2 se agudice el funcionamiento del ciclo redox del glutatión catalizados por la GPx para hacer frente a los ataques oxidativos, pero en estados avanzados este ciclo se deteriora posiblemente de forma irreversible especialmente en pacientes diabéticos descompensados.

Esta disminución de la actividad de GPx significa incremento de H_2O_2 , que como habíamos manifestado anteriormente actúa como inhibidor de la actividad de SOD, lo que explicaría los resultados hallados.

La determinación de los lipoperóxidos y el estado de antioxidantes son importantes para elucidar los efectos que ejercen los radicales libres de oxígeno en los sistemas biológicos⁽¹⁷⁾⁽¹⁸⁾. Si bien el malondialdehído es el producto final más abundante de los aldehídos resultantes de la lipoperoxidación⁽¹⁸⁾, la reacción del TBA con otros grupos aldehídos productos de reacciones redox es evidente; razón por la que la expresión de metabolitos reactivos al TBA es la más adecuada.

En el presente trabajo, el valor medio de TBARS en el grupo de pacientes con Diabetes mellitus tipo 2 (150,52 (\pm 19,34) mmol/dL) resultó significativamente mayor que el grupo control (123,16 (\pm 12,12), mmol/dL), confirmando la existencia de una elevada tasa de estrés oxidativo que es índice de la sobreproducción de radicales libres que bien podría afectar al 50-70% de la proteína celular.

Parece ser que las alteraciones producidas por los radicales libres *in vivo* dependerían de: A) tipo celular donde habría que considerarse en mayor o en menor contenido por antioxidantes, enzimas detoxificadoras, B). Tipo de toxicidad de los radicales libres de oxígeno y de otras sustancias generadores de los mismos. C) naturaleza y resistencia del sustrato a ser oxidado y degradado⁽¹⁰⁾.

En los procesos de desprendimientos de retina se halla cantidad incrementada de productos de malondialdehído, que nos indican el elevado grado de lipoperoxidación⁽²¹⁾. Niveles altos de malondialdehído también se da en pacientes con cáncer al pulmón⁽¹⁶⁾⁽²⁴⁾, debido al bombardeo continuo por células fagocíticas. Estas poseen oxidantes altamente tóxicos (por ejemplo: metabolitos activos del ácido araquidónico que en condiciones fisiológicas son destinados a “buenos” propósitos como eliminar bacterias, pero cuando se activan en una explosión respiratoria generan una gran cantidad de radicales libres⁽¹⁵⁾. En trabajos relacionados con el envejecimiento se encuentra una lipoperoxidación alta, se corrobora que con la edad aumenta el daño oxidativo a la célula⁽¹⁹⁾⁽¹⁶⁾⁽²⁰⁾.

En la correlación de HbA_{1c} con la enzima SOD, en los pacientes, se observó que existe una relación no lineal (cuadrática) siendo significativa al 95% ($p < 0.05$). Para valores de HbA_{1c} de 5 a 7 el SOD es muy variable, de 7 a 11 tiende a aumentar probablemente como un mecanismo de defensa y respuesta a la generación de aniones superóxido, y para valores mayores a 11 el SOD tiende a disminuir (Tabla N°2), lo que se explicaría por el proceso de glicación y consecuente inactivación que sufre la proteína. No se observó correlación lineal entre la HbA_{1c} y GPx.

Asímismo se observa una correlación positiva entre los niveles de HbA_{1c} y TBARS ($r=0.432$), fue estadísticamente significativa ($p < 0.001$). Las reacciones de oxidación dañan a la glucosa y lípidos directamente generando compuestos reactivos que contienen un grupo carbonilo, estos fragmentos reactivos pueden causar modificaciones irreversibles de proteínas⁽²²⁾.

En los niveles de SOD y GPx no se observó correlación lineal. El SOD es una proteína con una defensa relativamente mayor contra los radicales libres, esta característica adquirida evolutivamente se explica por la naturaleza de radical libre de su sustrato. Está rodeada de carga negativa que evita el ataque del anión superóxido, pero tiene un canal rico en lisina para el ingreso del radical aniónico. La proteína puede sufrir oxidación y glicación, pero este mecanismo no es inmediato.

El SOD y GPx actúan en simultáneo pero no con la misma intensidad, dependiendo del tipo de radicales libres. En el caso de eritrocitos en pacientes diabéticos, el GPx es el que principalmente actuaría por lo que los niveles de esta enzima; como se ha hallado, disminuyen antes que el SOD.

De lo discutido se desprende que es importante la defensa del sistema antioxidante para el mantenimiento de la fisiología celular frente a procesos pro oxidantes, pues la influencia del estrés oxidativo como mecanismo patológico en la generación de diversas enfermedades puede derivar en complicación que disminuyen la calidad de vida como en este caso de pacientes diabéticos, sujeto de estudio en el presente trabajo.

CONCLUSIONES

En los pacientes diabéticos los niveles plasmáticos de HbA_{1c} y TBARS, marcador de estrés oxidativo, se encuentran elevados ($p < 0.001$), mostrando una correlación significativa $p < 0.05$. También son significativos estadísticamente los niveles disminuidos de GPx en eritrocitos ($p < 0.001$).

La correlación cuadrática de la HbA_{1c} y SOD en los pacientes diabéticos tiene valor significativo, en diferentes rangos de Hemoglobina glicada. Siendo importante señalar que cuando el rango está entre 7 y 11, el organismo todavía no pierde su capacidad de defensa antioxidante, lo cual no se observa en pacientes que no han compensado su glicemia.

Luego el indicador de estrés oxidativo y los parámetros antioxidantes pueden ser considerados como alternativas en aquellos laboratorios donde no pueda realizarse determinación de Hemoglobina glicada, o como auxiliares en aquellos que si disponen, justificándose además por la sencillez de su procedimiento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- HIAR, CH.E. "Desempeño Clínico del Sistema DCA 2000®+ para la determinación de Hemoglobina A_{1c} en 6 minutos". División Diagnósticos Bayer Abril 1998.
- 2.- PASCUAL C, Karzai W, Meier-Hellmann A, Oberhoffer M, Horn A, Bredle , Reinhart K. "Total plasma antioxidant capacity is not always decreased in sepsis". Crit Care Med Vol. 26. N° 4 - 1998.
- 3.- MISRA HP AND FRIDIVICH I. "The Role of Superoxide Anion in the Autoxidation of Epinephrine and a Simple Assay for Superoxide Dismutase". The Journal of Biological Chemistry Vol. 247. N° 10. 1972. 3170-3175.
- 4.- MANUAL DE INSTRUCCIONES. RANSEL Glutation peroxidasa. Laboratorios RANDOX. 1999.
- 5.- BUEGE JA, Aust S. "Microsomal Lipid Peroxidation". Methods in Enzymology. Vol. 52 1978. 302-310.
- 6.- BUCALA R. and Cerami A. "Advanced Glycosylation: Chemistry, Biology, and Implications for Diabetes and Aging". Advances in Pharmacology, Vol 23, 1992. 1-34.
- 7.- RAKEL, C. Terapéutica Actual. Interamericana. Mc Graw – Hill. 1994.
- 8.- BONET B.; Viana M.; y Herrera E. "Efectos teratogénicos de la diabetes: papel de los radicales libres". Endocrinología Vol. 45 N° 8 1998. 292-297.
- 9.- KENNEDY L.A., and Lyons T.J. "Glycation, oxidation, and lipoxidation in the development of Diabetic Complications". Metabolism. Vol. 46, N° 12, Suppl 1. 1997. 14-21.
- 10.- ROCHE E. Y ROMERO D. "Estrés oxidativo y degradación de Proteínas". Medicina Clínica Vol. 103 N° 5. 1994. 189-196.
- 11.- GÓMEZ PÉREZ, F. J. "Relación entre glucosilación de las proteínas y las complicaciones tardías de la diabetes mellitus". Temas de Medicina Interna: Diabetes Mellitus. Vol I (4) 1993. 709-725.
- 12.- MENDELSON A.B., BELLE S.H., STOEHR G.P, AND GANGULI M. "Use of Antioxidant Supplements and Its Association with Cognitive Function in a Rural Elderly Cohort". American Journal of Epidemiology. Vol. 148 N° 1 1998. 38-44.

- 13.- PRASAD M. M.D., WYLLIE R., M.D., VAN LENTE F, PH.D., STEFFEN R, M.D., and Kay M, M.D. "Antioxidants in Hereditary Pancreatitis". The American Journal of Gastroenterology Vol. 91 N° 8 - 1996. 1558-1562.
- 14.- OMAR B.A., FLORES S., AND MCCORD J. "Superoxide Dismutase: pharmacological Developments and Applications". Advances in Pharmacology, Vol 23, 1992. 109-161.
- 15.- BARRERO M.J. , DEL CANTO E., Y MARTÍN M.C. "Evaluación de estrés oxidativo en cáncer de pulmón". Neoplasia Vol 14 (3) 1997. 105-109.
- 16.- FORCEVILLE X, MD; VITOUX D, PHD; GAUZIT R, MD; COMBES A, MD; LAHILAIRE P, MD; CHAPPUIS P, PHD. "Selenium, systemic immune response syndrome, sepsis, and outcome in critically ill patients" . Crit Care Med Vol. 26 N° 9 1998. 1536-1544.
- 17.- KELLY S.A., HAVRILLA CH. M., BRADY T.C., HARRIS K., AND LEVIN E.D. "Oxidative stress in toxicology: established Mammalian and Emerging Piscine Model Systems" Environmental Health Perspectives Vol. 106, N° 7, 1998.. 375-384.
- 18.- DÍAZ, J. ; SERRANO, E.; ACOSTA, F.; LEASL, M.; ALONSO DE VEGA, J. M.; MARTÍNEZ, P.; JIMÉNEZ, R. Y CARBONELL, L. F. "¿Participan los radicales libres en los procesos de peroxidación lipídica?". Análisis Clínicos 1998 Vol. 3 N° XXIII. 149-153.
- 19.- RODRÍGUEZ-CAPOTE, K.; CÉSPEDES, E.; ARENCIBIA, R.; GONZÁLEZ-HOYUELA, M. "Indicadores de estrés oxidativo en el cerebro de ratas durante el envejecimiento. Efecto del factor de crecimiento nervioso". Rev. Neurol Vol. 27 N° 157. 1998. 494-500.
- 20.- MCEWEN, BS. "Protective and damaging effects of stress mediators". The New England Journal of Medicine, Vol. 338 N° 3. 1998. 171-178.
- 21.- ROMERO F.J., BOSCH-MORELL, ROMERO M.J. JAREÑO E.J, ROMERO B. MARÍN N. AND J. ROMÁ. "Lipid Peroxidation and Antioxidants in Human Disease". Environmental Health Perspectives. Vol. 106 Suppl 1998. 1229-1233.
- 22.- GONZÁLES-FRAGUELA, M.E.; CÉSPEDES E.M.; ARENCIBIA, R.; BROCHE, F.; GÓMEZ, A.A.; CASTELLANO, O.; GARCÍA, J.C. "Indicadores de estrés oxidativo y efecto del tratamiento antioxidante en pacientes con enfermedad de Parkinson Primaria". Rev. Neurol, Vol. 26 N° 149, 1998. 28-33.