



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

**“ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS
SUPERÓXIDO DISMUTASA Y CATALASA EN
ERITROCITOS DE RATAS DIABÉTICAS
TRATADAS CON GLICINA”**

T E S I S

QUE PARA RECIBIR EL TÍTULO DE:

BIOLOGO

P R E S E N T A :

PINEDA SANTANA YADIRA

DIRECTORA: QFB CECELIA VILAR ROJAS.



LOS REYES IZTACALA, EDO. MÉX.

2004.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

RESUMEN

1. ANTECEDENTES	1
1.1 Diabetes.....	1
1.2 Diabetes tipo 1	2
1.3 Diabetes tipo 2	3
1.4 Diabetes gestacional	4
1.5 Otros tipos de diabetes	4
1.6 Diabetes tipo MODY	5
1.7 Complicaciones de la diabetes	6
1.7.1 Aldosa reductasa o sorbitol.....	7
1.7.2 Trastornos en la actividad de la proteína kinasa C (PKC).....	7
1.7.3 Glicación.....	7
1.8 Radicales libres.....	8
1.8.1 Anión superóxido (O_2^-).....	9
1.8.2 Peróxido de hidrógeno (H_2O_2).....	9
1.8.3 Radical hidroxilo (OH)	10
1.9 Especies reactivas de oxígeno (ERO).....	10
1.10 Sistema antioxidante no enzimático	11
1.10.1 Vitamina E (α -tocoferol)	11
1.10.2 Vitamina C (ácido ascórbico).....	11
1.10.3 Vitamina A (α -caroteno)	11
1.10.4 Glutati3n	12
1.10.5 Ácido úrico.....	12
1.11 Sistema antioxidante enzimático	12
1.11.1 Superóxido dismutasa (SOD, óxido reductasa EC 1.15.1.1)	13
1.11.2 Glutati3n peroxidasa (GPx EC 1.11.1.9)	13
1.11.3 Catalasa (CAT EC 1.11.1.6).....	13
1.12 Glicina	15
2. OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo General	17
2.2 Objetivos Particulares	17
3. MATERIAL Y METODOS	18
3.1 Actividad de Superóxido Dismutasa.....	19
3.2 Actividad de Catalasa	20
3.3 Determinaci3n de Hemoglobina Glucosilada.....	21
3.4 Determinaci3n de Proteínas	22
4. RESULTADOS	23
5. DISCUSI3N.....	29
6. CONCLUSIONES	36
7. BIBLIOGRAFÍA	37

1. ANTECEDENTES

1.1 Diabetes

La Diabetes Mellitus es un trastorno crónico del metabolismo debido a una deficiencia absoluta o relativa de insulina; así como también a una resistencia a la acción de la misma.

Esta enfermedad es un problema de salud pública mundial y la Organización Mundial de la Salud ha estimado que existen 143 millones de personas con diabetes en todo el mundo con una prevalencia de 6.51%, 14.8% en mayores de 20 años de edad y 36,000 defunciones al año (1-3). Anualmente se registran 180,000 nuevos casos, y se calcula que esta cifra se elevará a 300 millones para el año 2025 (4); ya que este padecimiento se ha convertido en una de las enfermedades de mayor incidencia y la segunda causa de mortalidad en el mundo (5-7).

La frecuencia de Diabetes Mellitus en la población mexicana ha aumentado más de treinta veces durante los últimos 50 años. En 1955 se registraron 1,500 muertes por esta enfermedad y en el 2000 más de 47 mil (8), teniendo una prevalencia de 8.2%; este incremento en la cifra considera a la diabetes como una enfermedad epidémica, además de ser la segunda causa de morbilidad en nuestro país. Se calcula que sólo 3.5 millones de diabéticos son registrados; sin embargo, se estima que el 50% de los pacientes desconoce el diagnóstico. El gasto para la atención del paciente diabético es muy elevado. En los Estados Unidos es cercano a 100 billones de dólares anuales (8).

Se ha estimado que, para el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), los costos relacionados directamente con el tratamiento de la diabetes, así como las incapacidades que ocasiona, supera los 4 mil millones de pesos anuales y sumando a esto el gasto generado en el sector privado y de la población no asegurada se alcanzarían cifras superiores a los 10 mil millones de pesos anuales (9).

La Diabetes Mellitus representa la principal demanda de atención médica y una de las causas más importante de hospitalización en México. Solamente en el IMSS se registran cada año cerca de 180 mil casos nuevos, se dan más de 5 millones de consultas. Se estima que diariamente mueren de manera prematura 39 derechohabientes a causa de las complicaciones de este padecimiento (8).

Esta enfermedad se caracteriza por hiperglucemia en ayuno y posprandial. En su forma más avanzada se asocia con cetoacidosis y desnutrición proteica provocando la aparición del síndrome hiperglucémico (1, 10-12). En etapas tardías de su evolución, esta enfermedad se acompaña en grado variable de complicaciones con daño a vasos sanguíneos pequeños (microangiopatía) o a grandes vasos (macroangiopatía). Por otro lado, a pesar de que se ha avanzado ampliamente en el conocimiento de la diabetes, las complicaciones crónicas de la enfermedad siguen reduciendo la esperanza de vida así como la calidad de ésta en enfermos diabéticos (13).

La Asociación Americana de Diabetes considera diabética a una persona cuando sus niveles de glucosa en ayuno rebasan los 126 mg/dl (11). A nivel internacional, dos grupos han clasificado a la Diabetes: "The National Diabetes Data Group (NDDG) (14) y "The World Health Organization (WHO)", con base en las características y el origen del padecimiento (10, 12). La diabetes se ha clasificado en diversos grupos, Diabetes tipo 1, Diabetes tipo 2, Diabetes gestacional y otros tipos específicos de Diabetes.

1.2 Diabetes tipo 1

La Diabetes 1 es una enfermedad autoinmune que presenta destrucción de las células β del páncreas y tiene un requerimiento absoluto de insulina. La aparición de manifestaciones clínicas puede estar precedida por un largo período asintomático durante el cual ocurre la destrucción de las células β hasta ser completa en la mayoría de los casos. El proceso evolutivo de la destrucción de las células pancreáticas, con

pérdida progresiva de la secreción de insulina, permite predecir la forma en que se altera la homeostasis de la glucemia. Con frecuencia, los síntomas se presentan en forma abrupta y dramática con requerimiento inmediato de la hormona (1).

Existen factores genéticos que predisponen a ciertos individuos a desarrollar Diabetes 1, y algunas infecciones virales están relacionadas con el inicio de la enfermedad. Este tipo de diabetes afecta principalmente a niños y ocasionalmente a adultos. Algunos pacientes particularmente niños y adolescentes han presentado cetoacidosis, que es de las primeras manifestaciones de esta enfermedad. Los adultos pueden tener funciones residuales de las células β , lo cual es suficiente para prevenir la cetoacidosis por varios años. Muchos individuos con este tipo de padecimiento eventualmente dependen de la insulina por el resto de su vida (15).

Uno de los daños causados por la no-secreción de insulina, se manifiesta con bajos o niveles plasmáticos imperceptibles del péptido c. La destrucción autoinmune de las células β se debe a la predisposición genética y también a factores relacionados con el medio ambiente, los cuales están pobremente definidos. Estos pacientes son raramente obesos (2, 11) y se presenta en el 10 y 15% de los casos (3).

La Diabetes tipo 1 representa el 5 y 10% del total de los casos de diabetes. En México no se conoce con exactitud; sin embargo, se estima que constituye menos de 5% de todos los casos de diabetes (8).

1.3 Diabetes tipo 2

Esta forma de diabetes, denominada con anterioridad diabetes no insulino dependiente, Diabetes tipo 2 o Diabetes de inicio en la edad adulta, es un término que se utiliza para personas que presentan resistencia a la insulina y suelen tener una deficiencia relativa de esta hormona (10-12).

Se presenta generalmente en adultos de 30 años en adelante, y se caracteriza por una disminución de la sensibilidad de los tejidos a la insulina, no pudiéndose utilizar de forma adecuada la insulina producida. Se ha mencionado que el 90% de la población de diabéticos presenta Diabetes 2. En México, se diagnostica con mayor frecuencia y está adquiriendo proporciones epidémicas (8). La mayoría de estos pacientes es obesa con cierto grado de resistencia a la insulina; la cetoacidosis rara vez ocurre de manera espontánea, con frecuencia, esta forma de diabetes se diagnostica años después de haber aparecido la enfermedad y en las etapas iniciales, los síntomas clásicos de diabetes no se presentan (16-18), teniendo mayor riesgo de desarrollar complicaciones macrovasculares y microvasculares al ser crónica la hiperglucemia (10-13).

Algunas evidencias indican que los desarreglos metabólicos presentes en los pacientes con Diabetes tipo 2, pueden ser detectados antes de que se manifieste completamente la enfermedad.

1.4 Diabetes gestacional

Se define como intolerancia a la glucosa de severidad variable con inicio o detección durante el embarazo. La Diabetes gestacional se presenta en mujeres susceptibles de padecer diabetes a causa de la acción antiinsulínica de las hormonas lactógeno placentario humano (HPL) y gonadotropina coriónica humana (HCG). Por lo general se manifiesta en la segunda mitad del embarazo y comúnmente desaparece después del parto; sin embargo, este grupo de mujeres tiene entre un 30 a 60% de probabilidad de desarrollar diabetes posteriormente (11, 23-24).

1.5 Otros tipos de diabetes

Dentro de este grupo se incluye diabetes e intolerancia a la glucosa que se desarrollan en asociación con enfermedades, síndromes genéticos y efectos

diabetogénicos por agentes químicos y toxinas con una prevalencia entre 1 a 2% de todos los pacientes diabéticos (Cuadro 1) (25).

Cuadro 1. CLASIFICACIÓN DE OTROS TIPOS DE DIABETES DE ACUERDO AL ORIGEN DEL PADECIMIENTO	
Defectos genéticos de las células β	
Cromosoma 12, HFN- α *(MODY**3), Cromosoma 7, glucocinasa (MODY2), Cromosoma 20, HFN-4 α (MODY1), Mutaciones de ADN***mitocondrial, otras.	
Defectos genéticos en la acción de la insulina	
Resistencia a la insulina tipo A; Leprecaunismo; Síndrome Rabson-Mendenhall; Diabetes lipoatrófica, etc.	
Enfermedades del páncreas	
Cualquier proceso que lesione el páncreas.	
Endocrinopatías	
Excesos en la producción de antagonistas de la insulina como: hormona del crecimiento, coritos, glucagón, epinefina.	
Diabetes inducida químicamente	
Vacor, pentamindina, ácido nicotínico, glucocorticoides, hormonas tiroideas, antagonistas β -andrenérgicos, tiazidas, otros.	
Infecciones	
Rubéola, citomegalovirus	
Diabetes poco común mediada inmunológicamente	
Anticuerpos contra el receptor de la insulina, Síndrome de Stiff-man, otros.	
Otros síndromes genéticos, algunas veces asociados a diabetes	
Síndrome de Down, de Klinnefelter, de Turner, de Wolfram.	
<ul style="list-style-type: none"> • Interferón alfa; **Maturity onset diabetes of the young; ***Ácido desoxiribonucleico. 	

1.6 Diabetes tipo MODY

Es una variante monogénica que tiene un comportamiento semejante a la Diabetes tipo 2, se presenta en individuos jóvenes menores de 25 años y se denomina MODY por sus siglas en inglés (Maturity-Onset Diabetes of the Young). Se caracteriza por un defecto en la secreción de insulina que puede ser moderado o severo de acuerdo al tipo de gen que se encuentre mutado. Existen al menos 7 diferentes genes alterados, encontrados en distintos grupos étnicos; una mutación en un único gen es suficiente para que la enfermedad se exprese; el tipo de herencia es autosómica dominante.

Los diferentes tipos de Diabetes tipo MODY son el resultado de mutaciones en distintos genes; entre los que han sido identificados son: el de la glucocinasa

(GK)/MODY2, el del factor nuclear de hepatocito (HNF) 1 α /MODY3, el del factor nuclear de hepatocito 4 α /MODY1, el del factor promotor de la insulina (IPF) 1/MODY4, HNF-1 β /MODY5, y NEUROD1/Beta2/MODY6 (Cuadro 2).

Glucocinasa (GK) es una enzima responsable de la fosforilación de la glucosa, mientras que HNF-1 α , HNF-4 α , IPF1, HNF-1 β , y NEUROD1 son factores de transcripción (4).

Cuadro 2. Diferentes tipos de MODY y su alteración genética.

Tipos	Alteración
MODY 1	Mutación en el gene de HNF-4 α
MODY 2	Glucocinasa GK
MODY 3	Mutación en el HNF-1 α
MODY 4	Mutación en factor 1 promotor de insulina
MODY 5	Mutación en el factor de transcripción hepática nuclear 1 β
MODY 6 o X	NEUROD1/ β 2
MODY 7 y 8	No clasificados

Existen otras variedades de MODY en donde el gen causal no ha sido identificado aún (26) y para fines de estudio se agrupan como MODY X, asumiendo que puede haber más de un subtipo distinto a los ya conocidos.

1.7 Complicaciones de la diabetes

Estudios epidemiológicos recientes han revelado que los pacientes diabéticos con un mal control glucémico tienen un riesgo mas alto de padecer enfermedades cardiovasculares que aquellos con un buen control.

La hiperglucemia es considerada en la actualidad como el factor causal clave en el desarrollo de las complicaciones vasculares diabéticas pudiendo producir sus efectos nocivos por diversos mecanismos entre los cuales se encuentran: la aldosa reductasa o sorbitol (29-30), estrés oxidativo (5-6), glicación (29-30), trastornos de la actividad

proteína kinasa C, pseudohipoxia (31), estrés carbonílico (5), trastornos del metabolismo de las lipoproteínas (32-33) y trastornos de actividad de las citocinas (33).

1.7.1 Aldosa reductasa o sorbitol

El exceso de glucosa en tejidos no insulino-dependientes puede seguir la vía de la aldosa reductasa, produciendo sorbitol y fructosa, alterando el metabolismo energético celular y la integridad de la membrana. Este sería un mecanismo bioquímico posible por el cual la hiperglucemia podría deteriorar la función y la estructura de las células y tejidos afectados por las complicaciones diabéticas.

1.7.2 Trastornos en la actividad de la proteína kinasa C (PKC)

La hiperactividad de la PKC sensibiliza las células del músculo liso vascular, a los vasoconstrictores y factores del crecimiento, induce la agregación plaquetaria pudiendo así promover la hipertensión y la aterogénesis.

1.7.3 Glicación

La glucosilación no enzimática o glicación implica la interacción química no enzimática entre el grupo carbonilo del carbohidrato con el grupo amino de las proteínas o péptidos (y en menor grado con lípidos y ADN), dando lugar a la formación de una base de Schiff o aldimina; para formar los productos de glicación temprana (también llamados productos de Amadori). Posteriormente los productos de glicación avanzada (AGEs) se forman por la oxidación de productos de Amadori produciendo intermediarios dicarbonilos muy reactivos (34-35).

Las proteínas glucosiladas pueden encontrarse en el plasma, intracelularmente, así como también en la matriz extracelular y las proteínas modificadas por este mecanismo pueden presentar alteraciones en su estructura y función dando como consecuencia que aquellos procesos en los que participan dichas proteínas sean modificadas, tal es el

caso de la calmodulina (33-34) la superóxido dismutasa (35) y la bomba de calcio (36) entre otras.

Los pacientes diabéticos presentan ciertas características particulares, como un envejecimiento prematuro, lo que ha sido relacionado entre otros aspectos con aumento en la glicación de proteínas, dando como resultado un riesgo de desarrollar aterosclerosis por alteraciones en el metabolismo de lípidos y de proteínas.

A pesar de los avances en el conocimiento de la diabetes, las complicaciones crónicas de la enfermedad siguen reduciendo la esperanza de vida así como calidad de ésta. La manifestación morfológica de la macroangiopatía es la aterosclerosis con sus complicaciones crónicas como son la enfermedad coronaria, cerebrovascular y vascular periférica, mientras que la microangiopatía se manifiesta por daño en diversos órganos como la retina, el parénquima renal y el sistema nervioso periférico, siendo una de las causas más importantes de invalidez y mortalidad en el paciente diabético. El tratamiento de la microangiopatía en etapas avanzadas demanda importantes recursos económicos (37-39).

El principal factor de riesgo en las complicaciones de la diabetes es la concentración alta de glucosa plasmática circulante de manera crónica (10) y una de las posibles causas del daño tisular en el paciente diabético, es el estrés oxidativo (1, 39-40), que es favorecido no sólo por el aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno, sino también por un decremento de los sistemas antioxidantes de defensa del organismo o por ambos. La hiperglicemia y la glicación de proteínas son una fuente importante de radicales libres (41-43).

1.8 Radicales libres

Los radicales libres son especies químicas que contienen uno o más electrones sin aparear. La necesidad de este electrón por aparearse es la base de su reactividad

pudiendo dañar moléculas en el interior de la célula, principalmente: proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (44).

Durante el metabolismo aerobio se generan constantemente pequeñas cantidades de radicales de oxígeno (ROS), incluyendo al radical hidroxilo (OH^\cdot), el anión superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) etc. como respuesta a estímulos externos e internos. Una alta producción de especies reactivas o una eliminación inadecuada de éstos da lugar al estrés oxidativo que puede causar graves disfunciones metabólicas y daño a macromoléculas biológicas. Debe existir, por tanto, un equilibrio entre los niveles de antioxidantes, de radicales libres, así como de moléculas mensajeras (factores de crecimiento, prostaglandinas y óxido nítrico) implicadas en la homeostasis celular (44). Entre los radicales de O_2 más importantes implicados en el estrés oxidativo se encuentran:

1.8.1 Anión superóxido (O_2^-)

Esta especie se forma cuando el oxígeno (O_2) recibe un solo electrón. En condiciones fisiológicas el anión superóxido (O_2^-) es producido en bajas concentraciones durante el metabolismo celular, por autooxidaciones de hidroquinonas, leucoflavinas, catecolaminas, tioles, tetrahidopterinas y hemoglobina. El citocromo P_{450} y el b5 localizados en retículo endoplásmico también generan O_2^- por autooxidación; ambos citocromos presentan una gran actividad en presencia de NADPH (citocromo 450) o NADH (b5). En todos los casos el producto primario formado es el O_2^- (45).

1.8.2 Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

El H_2O_2 no es un radical libre per se, ya que no posee electrones desapareados; sin embargo, al participar en la reacción de Haber-Weiss genera radicales hidroxilo o interactúa con halógenos y el sistema mieloperoxidasa para producir ácidos como el ácido hipocloroso, ácido hipobromoso, etc. (45-46).

1.8.3 Radical hidroxilo (OH)

Se genera por la ruptura del enlace oxígeno-oxígeno del H_2O_2 lo cual da como resultado 2 radicales hidroxilo, sin embargo, también puede formarse por la reacción de Haber-Weiss o por la reacción de Fenton (45-49).

Durante la diabetes, se presenta además un estado generalizado de estrés oxidativo y un incremento de éste es el resultado ya sea por una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno o de una disminución de los sistemas eliminadores de radicales (antioxidantes) o por ambos.

Uno de los sistemas de mayor relevancia es el sistema del glutatión y enzimas relacionadas (45, 50).

1.9 Especies reactivas de oxígeno (ERO)

Las ERO son capaces de afectar la estructura y función de las estructuras celulares como las proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, lo que puede conducir a daño y/o a la muerte celular (44). Sin embargo, las células poseen sistemas antioxidantes de defensa que les permiten controlar la concentración de las ERO (45).

En los organismos aerobios existe una gran variedad de sistemas de defensa antioxidantes tanto enzimáticos como no enzimáticos (2), que se coordinan cooperativamente y protegen al organismo del estrés oxidativo.

SISTEMAS ANTIOXIDANTES	
ENZIMÁTICOS	NO ENZIMÁTICO
Superóxido dismutasa (SOD)	Vitamina E (α -tocoferol)
	Vitamina C (ácido ascórbico)
	Vitamina A (α -caroteno)
	Glutatión reducido
Glutatión peroxidasa (GPX)	Ácido úrico
	Selenio
	Zinc
	Cobre
Catalasa (CAT)	Flavonoides
	Ácido fenólico
	Rivoflavina

1.10 Sistema antioxidante no enzimático

Este grupo de compuestos no proteínicos posee la capacidad de interactuar directamente con las especies reactivas de oxígeno; entre estos se mencionan:

1.10.1 Vitamina E (α -tocoferol)

Se le ha considerado como el antioxidante más ampliamente distribuido en los seres vivos, debido a que es un compuesto hidrofóbico, que se encuentra en las membranas biológicas. La vitamina E tiene la capacidad de interferir con la lipoperoxidación en su fase de propagación reaccionando con los radicales lipoperoxilos y alcoxilos.

La interacción con lipoperoxidos genera un radical α -tocoferilo, el cual es convertido en α -tocoferol al interactuar con el ácido ascórbico. También se ha observado que este compuesto tiene la capacidad de interactuar con el singulete de oxígeno y en menor grado con el radical superóxido, por lo que se piensa que puede proteger a las membranas de la acción oxidante de las ERO.

1.10.2 Vitamina C (ácido ascórbico)

Es una sustancia hidrosoluble que se localiza tanto en el citosol de las células como en los fluidos extracelulares y se caracteriza por su capacidad de aceptar electrones. Puede reaccionar directamente con el anión superóxido y el radical hidroxilo, dando como resultado la formación del radical ascorbilo, el cual puede ser convertido en ácido ascórbico.

1.10.3 Vitamina A (α -caroteno)

Es una vitamina liposoluble la cual se encuentra en las membranas lipídicas. Su función antioxidante consiste en impedir la lipoperoxidación al reaccionar principalmente con el singulete de oxígeno y el radical hidroxilo, la interacción con estas especies

reactivas de oxígeno genera radical carotenilo, el cual, a su vez, puede ser sintetizado al interactuar con el ácido ascórbico y/o α -tocoferol.

1.10.4 Glutación

El glutación reducido ha sido considerado como la molécula antioxidante más importante del organismo, ya que protege los grupos $-SH$ de las proteínas de la acción oxidante de los radicales libres. Así mismo, el glutación tiene la capacidad de reaccionar con una amplia gama de compuestos electrofílicos y oxidantes, tales como H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$ y OH . El glutación reducido neutraliza los radicales al transferirles un átomo de hidrógeno.

1.10.5 Ácido úrico

A pesar de que es un producto final del metabolismo de las purinas en humanos, también posee propiedades antioxidantes; sin embargo, se desconoce el proceso mediante el cual ejerce su acción protectora. Algunos reportes sugieren que el ácido úrico forma complejos con metales de transición tales como el hierro y cobre cuando interacciona con el ascorbato (45).

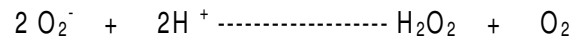
1.11 Sistema antioxidante enzimático

Este sistema incluye a varias enzimas destinadas a convertir las especies reactivas de oxígeno (ERO), en moléculas inocuas, antes de que promuevan la generación de moléculas más reactivas, las cuales son capaces de reaccionar y dañar estructuras celulares.

Se ha demostrado que la presencia de enzimas antioxidantes ofrecen protección a las células y tejidos contra el daño oxidativo y juegan un papel importante en las complicaciones crónicas de la diabetes. En mamíferos se han encontrado 3 enzimas antioxidantes, la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutación peroxidasa (GPx) (44-48, 50).

1.11.1 Superóxido dismutasa (SOD, óxido reductasa EC 1.15.1.1)

Es una enzima tetramérica, presente en los organismos aerobios que cataliza la dismutación del anión superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular.



La SOD, protege a las células del radical superóxido, sin embargo, uno de los productos de esta eliminación es el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual es descompuesto por la catalasa u otras peroxidases a H_2O y O_2^- (51).

La actividad de SOD está presente en la mayoría de los tejidos de mamíferos se pueden encontrar tres isoenzimas: Mn-SOD, Cu-Zn-SOD y SOD-EC. Las tres isoformas se sintetizan en los ribosomas citoplásmicos, producto de genes nucleares diferentes (46, 52).

1.11.2 Glutación peroxidasa (GPx EC 1.11.1.9)

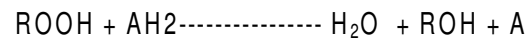
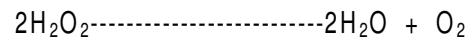
Es una enzima tetramérica que confiere protección a la célula ante un exceso de H_2O_2 y de hidroperóxidos, ya que cataliza la oxidación del glutatión (GSH) a disulfuro glutatión (GSSG). La enzima tiene tres isoformas: cistosólica, plasmática y gastrointestinal. Las reacciones catalíticas de estas isoformas generan glutatión oxidado, el cual es regenerado a glutatión reducido por la actividad de la enzima glutatión reductasa en presencia del NADPH (45-46, 51, 53).



1.11.3 Catalasa (CAT EC 1.11.1.6)

Es una enzima tetramérica, con cuatro subunidades idénticas de 60kDa cada una de ellas dispuestas tetraédricamente con cuatro grupos de ferro-protoporfirina por molécula. La reacción que cataliza es la descomposición del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en

agua (H₂O) y oxígeno (O₂), protegiendo a las células del H₂O₂ que se genera en su interior. En presencia de donadores de protones (metanol, etanol, ácido fórmico, fenoles) presenta actividad de peroxidasa (45, 47, 54).



El H₂O₂ es catabolizado enzimáticamente en organismos aerobios por la catalasa además de otras peroxidasas. Aunque la catalasa no es esencial para algunos tipos de células en condiciones normales, tiene un importante papel en la adaptación al estrés oxidativo. La catalasa captura el H₂O₂ antes de que pueda escapar de la célula y lo convierte en oxígeno molecular, protege también a los microorganismos del efecto tóxico del H₂O₂ que se acumula durante el metabolismo bacteriano y es liberado después de la fagocitosis (45, 47, 55, 56).

La catalasa se localiza principalmente en los peroxisomas, citoplasma y mitocondrias. El papel antioxidante de la catalasa se basa en que se disminuye el riesgo de la formación del radical hidroxilo por la interacción del peróxido de hidrógeno con metales de transición vía la reacción de Fenton. Esta enzima es más eficiente en presencia de altas concentraciones de peróxido de hidrógeno en la célula, debido a que su Km oscila en el rango milimolar. El mecanismo catalítico consiste en dos fases: rompimiento de una molécula de peróxido de hidrógeno generándose en el grupo hemo la especie oxoferrilo con la formación de una molécula de agua y por la reacción de la especie oxoferrilo con otra molécula de peróxido de hidrógeno (48, 56, 57).

Se ha comprobado que las células β de los islotes pancreáticos son altamente sensibles a la acción de las especies reactivas de oxígeno, al poseer el más bajo

potencial secuestrador de especies reactivas derivadas de la reducción parcial del oxígeno molecular.

Se ha demostrado que las enzimas antioxidantes mencionadas se encuentran modificadas en la diabetes, y se sabe que la glicación puede afectar la actividad de algunas de estas enzimas (50, 51, 58).

1.12 Glicina

La glicina es un aminoácido no esencial utilizado como producto nutricional, participa en muchos estados fisiológicos importantes incluyendo la biosíntesis de ácidos nucleicos, ácidos biliares, porfirinas, creatina fosfato y otros aminoácidos (59).

La glicina puede ser administrada en la dieta sin efectos secundarios y por sus propiedades antiinflamatorias puede ser útil en ciertos estados patológicos, que dependan de la activación de los neutrófilos y macrófagos. Este aminoácido no esencial ha demostrado ser protector contra la lesión celular atenuando el influjo de calcio libre citosólico y la generación de superóxido por neutrófilos; también participa en la producción de $TNF\alpha$ en macrófagos alveolares, contra la hipoxia de los túbulos renales proximales, la isquemia, la falla renal aguda, en el daño por reperfusión en el tejido cardiaco y hepático, proporciona citoprotección contra la lesión hepatocelular por depleción de ATP, minimiza las lesiones hepáticas después de la exposición crónica al alcohol, o posterior a choque hemorrágico, mejora la supervivencia en el choque endotóxico, protege de la hepatotoxicidad por D-galactosamina, previene el estado hipermetabólico y la hipoxia hepáticas, es adyuvante en el tratamiento de la esquizofrenia, disminuye los niveles séricos de hemoglobina glucosilada en pacientes con Diabetes Mellitus, protege del daño a las células endoteliales y además ofrece protección contra la radiación química (60-68).

La glicina además de los efectos benéficos mencionados ha sido utilizada por Carvajal (69), quien ha demostrado que este aminoácido inhibe de manera significativa la glicación de la hemoglobina en ratas diabéticas, así como también en pacientes con dicha patología. El grupo amino de la glicina al interactuar con el carbonilo de la glucosa formaría glucosil-glicina disminuyendo así la interacción de la glucosa con las proteínas dando como consecuencia una disminución en la síntesis de los productos de glicación (70).

Es importante conocer los mecanismos por los cuales se originan las complicaciones diabéticas, con el objeto de prevenir el daño y mejorar la calidad de vida de dichos pacientes. El estudio de la glicación de algunas proteínas ha esclarecido muchos de los mecanismos responsables del daño celular (71-73).

La glicina al interactuar con la glucosa, evita que por competencia se lleve a cabo la reacción entre los grupos amino de la glicina y de varias proteínas.

El objetivo de presente trabajo es estudiar la actividad de las enzimas superóxido dismutasa y catalasa en presencia de glicina, ya que se ha demostrado que la actividad de dichas proteínas está modificada en diabetes por glicación.

1. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Estudiar la actividad de las enzimas Superóxido dismutasa y Catalasa en eritrocitos de ratas con diabetes experimental.

2.2 Objetivos Particulares

1.- Estudiar la actividad de las enzimas antioxidantes en animales diabéticos tratados con glicina.

2.- Cuantificar la hemoglobina glucosilada y glucosa en sangre total en los cuatro grupos experimentales.

3.- Llevar un registro de peso corporal.

1. MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron 64 ratas macho Sprague Dawley de dos meses de edad con un peso aproximado de 200 ± 20 g.

Se mantuvieron bajo condiciones controladas de temperatura con un fotoperiodo de 12h de luz y 12h de oscuridad, con agua y alimento *ad libitum* durante los 2 meses que duró el tratamiento. La diabetes experimental se indujo con una sola dosis de estreptozotocina (STZ) 60mg/kg, vía intraperitoneal (76). La STZ se preparó en un amortiguador de citrato de sodio 0.1M pH 4.5.

La evaluación del estado diabético se realizó 48 hr después de la inyección de la STZ, por la medición de la glucemia, utilizando un glucómetro digital Accutrend alpha. La condición diabética se consideró cuando los niveles de glucosa en sangre rebasaron los 200mg/dl. Adicionalmente se llevó un registro del peso corporal.

El protocolo de trabajo estuvo formado por 4 grupos de ratas distribuidas de la siguiente manera:

Grupo 1.- Grupo Control: Ratas normales a las cuales se les inyectó amortiguador citrato de sodio (0.1 M pH 4.5) y tomaron agua *ad libitum*.

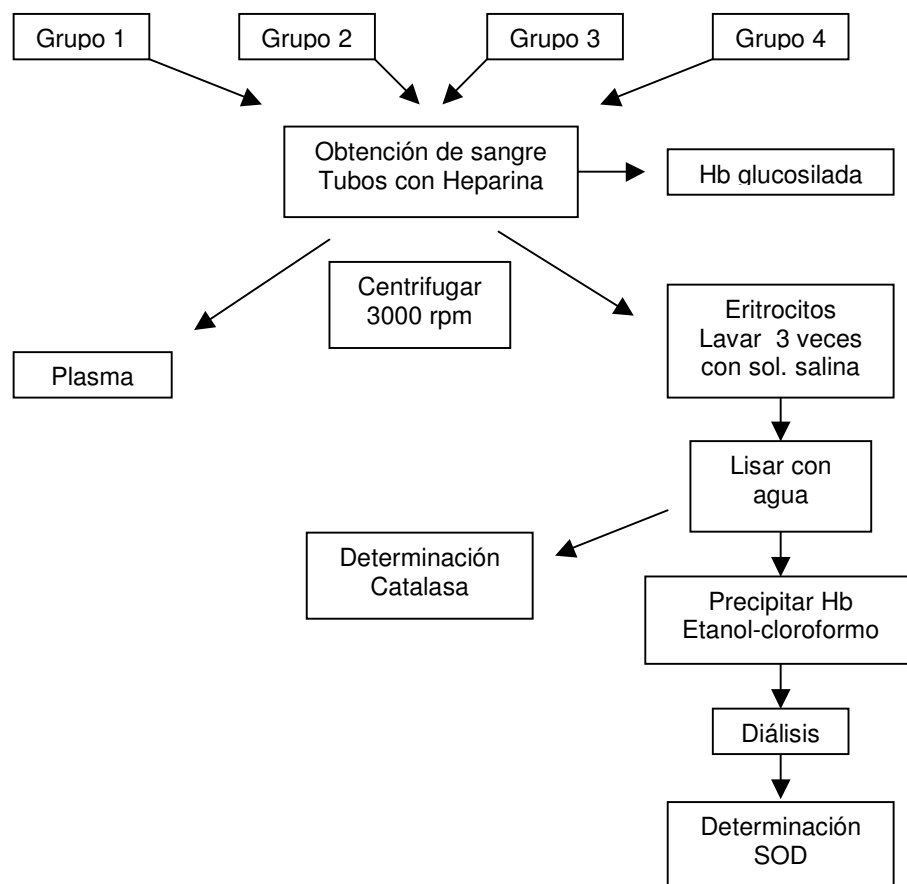
Grupo 2.- Grupo Diabético: Ratas inyectadas con estreptozotocina disuelta en el amortiguador y tomaron agua *ad libitum*.

Grupo 3.- Grupo Control con Glicina: Ratas normales tratadas de la misma manera que el grupo 1 a las cuales se les dió glicina al 1% en el agua de beber (*ad libitum*).

Grupo 4.- Grupo Diabético con Glicina: Ratas inyectadas con estreptozotocina las cuales tomaron diariamente glicina al 1% en el agua de bebida (*ad libitum*).

Después de dos meses las ratas fueron anestesiadas por vía intraperitoneal con pentobarbital, la sangre se obtuvo directamente de la aorta en tubos con heparina y se tomó una alícuota para cuantificar hemoglobina glucosilada.

El plasma se separó por centrifugación a 3000 rpm, los eritrocitos se lavaron 3 veces con solución salina, se lisaron con 4ml de agua fría y en el lisado se midió la actividad de la enzima catalasa. Posteriormente la hemoglobina se precipitó con 2ml de etanol-cloroformo 3:1 (34) y se eliminó por centrifugación. El sobrenadante se dializó contra agua y se utilizó para medir la actividad de la enzima Superóxido dismutasa (Ver diagrama).



3.1 Actividad de Superóxido Dismutasa

La actividad de Superóxido dismutasa total (EC 1.15.1.1.) se midió por el método de Beauchamp (52) y los resultados se expresaron como Unidades/mg de proteína (75).

La actividad de SOD se midió en un sistema xantina-xantina oxidasa, el cual genera un flujo de anión superóxido que reduce al nitroazul de tetrazolio (NBT) para formar el compuesto formazán el cual tiene una coloración azul. La mezcla de reacción se preparó de la siguiente manera: NBT 2.5×10^{-5} M, Xantina 1×10^{-4} M, EDTA 1×10^{-4} M, Carbonato de calcio 0.05 M y xantina oxidasa 2.2×10^{-9} M pH 10.2, incubándose durante 30 min a 37°C. La reacción se detuvo por adición de 500 μ l de $\text{CuCl}_2 \cdot (75)$. La absorbancia se midió a 560 nm en un espectrofotómetro Beckman modelo DU 650. Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de proteína necesaria para inhibir el 50% de la reacción.

3.2 Actividad de Catalasa

La actividad de Catalasa se determinó por el método de Aebi (55), el cual se basa en la desaparición del peróxido de hidrógeno en una mezcla de reacción preparada con 900 μ l de peróxido de hidrógeno 7.7 mM en un amortiguador de fosfatos 10 mM pH 7 y 100 μ l de muestra diluida 1:500. La absorbancia se lee a 240 nm cada 15 segundos durante 30 segundos, que es el periodo en que la descomposición del peróxido de hidrógeno sigue una cinética de primer orden.

De acuerdo con Aebi, como la unidad de actividad de catalasa se define de la siguiente fórmula (48): considerando la constante de reacción de primer orden (K).

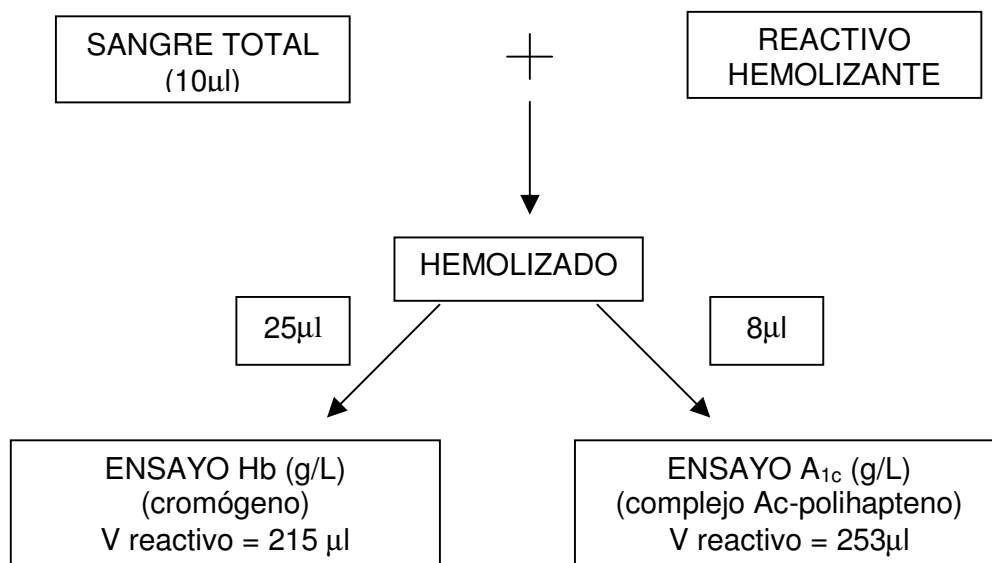
$$\begin{aligned}
 K &= (1/\Delta t)(\ln A1/A2) && \text{Donde } \Delta t = t2-t1 \\
 &= (2.3/\Delta t)(\log A1/A2) && A1 \text{ y } A2 = \text{absorbancia del } H_2O_2 \\
 &= (2.3/15)(\log A1/A2) && \text{en los tiempos } t1 \text{ y } t2 \\
 &= (0.153)(\log A1/A2)
 \end{aligned}$$

La actividad se expresa como K/mgHb

3.3 Determinación de Hemoglobina Glucosilada

La hemoglobina glucosilada se cuantificó en muestras de sangre total obtenida directamente de la aorta utilizando un multianalizador automático SYNCHRON CX4Δ. Dicho aparato maneja un sistema completamente automatizado y computarizado, que garantiza un alto control de calidad. La toma y dispensa de los volúmenes de muestra y de reactivo se controla por medio de jeringas de accionamiento directo y desplazamiento positivo.

El primer paso consiste en tratar la muestra de sangre con reactivo hemolizante (bromuro de tetradeciltrimetilamonio 9g/l) para liberar la hemoglobina. El hemolizado permanece estable durante 4 horas a temperatura ambiente y 24 horas en refrigeración. La determinación de la hemoglobina se realiza por un método colorimétrico, cuyo producto cromógeno se lee a una longitud de onda de 560 nm.



El reactivo para la determinación de hemoglobina glucosilada se basa en un método turbidimétrico de inmunoinhibición, que consiste en hacer reaccionar la

hemoglobina con anticuerpos (Ac) específicos para formar un complejo soluble antiHbA_{1c}-HbA_{1c}. La concentración de HbA_{1c} es inversamente proporcional al cambio de absorbancia y se lee a una longitud de onda de 340nm (77-79).

El porcentaje de hemoglobina A1c se calcula con la siguiente fórmula:

$$\%HbA_{1c} = \frac{[HbA_{1c}](g/dL)}{[Hb](g/dL)} \times 100$$

3.4 Determinación de Proteínas

Se realizó en microplaca por el método de Lowry (80) utilizando el reactivo de Bio-rad (500-0111). Es un ensayo colorimétrico basado en la reacción de la proteína con una solución alcalina (tartrato de cobre) y el reactivo de Folin-Ciocalteau. El color desarrollado se debe principalmente a los aminoácidos tirosina y triptofano así como también a cisteína, cistina e histidina. Las proteínas reducen al reactivo Folin, lo cual da una coloración azul, que absorbe a 750nm.

Reactivos:

Solución A: Solución alcalina de tartrato de cobre.

Solución B: Reactivo de Folin.

Estándar: Solución de albúmina bovina 1 mg/ml

TUBO	ESTANDAR DE ALBÚMINA (µl)	CONCENTRACIÓN (µg)	AGUA DESTILADA (µl)	SOLUCIÓN A (µl)	SOLUCIÓN B (µl)
BLANCO	-	-	25	25	200
1	5	5	20	25	200
2	10	10	15	25	200
3	15	15	10	25	200
4	20	20	5	25	200
5	25	25	0	25	200

1. RESULTADOS

En la tabla 1 se muestra el promedio \pm desviación estándar del peso corporal, concentración de glucosa sanguínea y hemoglobina glucosilada de los cuatro grupos experimentales después de 2 meses de tratamiento.

Tabla 1

GRUPO	n	PESO (g)	GLUCOSA (mg/dl)	HEMOGLOBINA GLUCOSILADA (%)
1.- Control + agua	17	447.30 \pm 22.60	142.33 \pm 15.39	3.86 \pm .58
2.- Diabético + agua	15	216.00 \pm 46.80	459.26 \pm 78.28	10.85 \pm 2.22
3.- Control + glicina	17	467.14 \pm 11.40	143.5 \pm 10.20	4.55 \pm 0.61
4.- Diabético + glicina	15	279.50 \pm 37.86	414.10 \pm 83.45	9.38 \pm 1.73

El peso corporal expresado en gramos (g) de las ratas control que tomaron agua fue de 447.3 ± 22.6 g y el grupo control que tomó glicina 467.14 ± 11.4 g. Al comparar ambos grupos no se observaron diferencias significativas.

El grupo diabético que tomó agua disminuyó su peso en un 51.7% (216 ± 46.8 g) presentando diferencias cuando se comparó con el grupo control ($p < 0.05$). El grupo diabético que tomó glicina disminuyó su peso 11.55% menos (279.5 ± 37.86 g) que el grupo diabético que tomó agua. Al comparar ambos grupos con el control que tomó glicina se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$).

La hemoglobina glucosilada del grupo diabético que tomó agua aumento en 6.99%, en relación, al grupo control, mientras que el grupo que tomó glicina sólo aumento 4.83%.

En la figura 1 se presenta el incremento en el peso corporal (Δ peso) expresado en gramos (g) de los grupos experimentales, después de 2 meses de haber inducido la

diabetes. Los animales del grupo 1 aumentaron su peso aproximadamente 189.08g y el grupo control que tomó glicina 222.46g. Al comparar ambos grupos se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$). El grupo 3 que tomó agua perdió peso ($19.40 \pm 49.03g$) siendo diferente estadísticamente ($p < 0.001$) del grupo diabético que tomó glicina ($71.52 \pm 29.77g$), el cual aumentó sólo 71.52g.

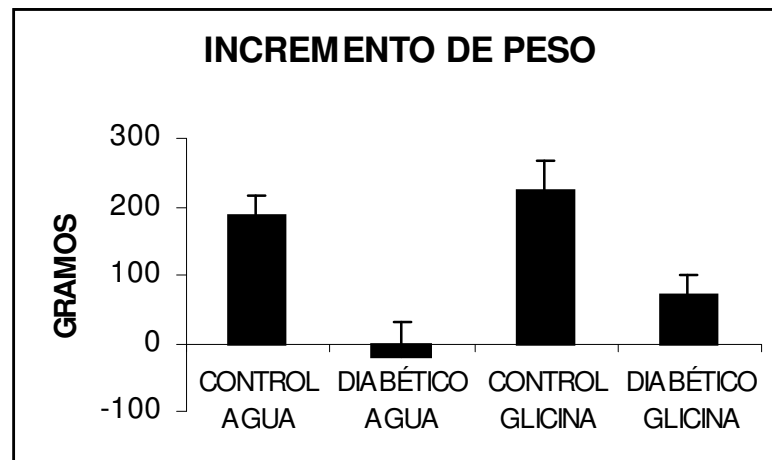


Fig. 1 Incremento del peso corporal (Δg).

Por otro lado, los niveles glucosa en sangre se presentan en la figura 2, donde el grupo 1 presentó niveles de glucosa de $142.33 \pm 15.38mg/dl$ y el grupo control que tomó glicina 143.5 ± 10.2 respectivamente, no existiendo diferencias significativas entre ambos ($p > 0.05$).

La glicemia del grupo 4 fue de $459.26 \pm 78.28mg/dl$, sin embargo, el grupo diabético que consumió agua mostró niveles de 414.10 ± 83.45 , estadísticamente no existen diferencias significativas entre ambos grupos ($p > 0.05$).

Cuando comparamos los grupos control y diabético tratados con agua encontramos que la glucosa del grupo diabético aumentó 3.22 veces más que el control, existiendo diferencias significativas ($p < 0.001$). Por otro lado, al comparar la glucosa de

los grupos tratados con glicina observamos que el grupo diabético solamente aumentó 2.88 veces su glucosa en comparación con el grupo control tratado con glicina ($p < 0.001$).

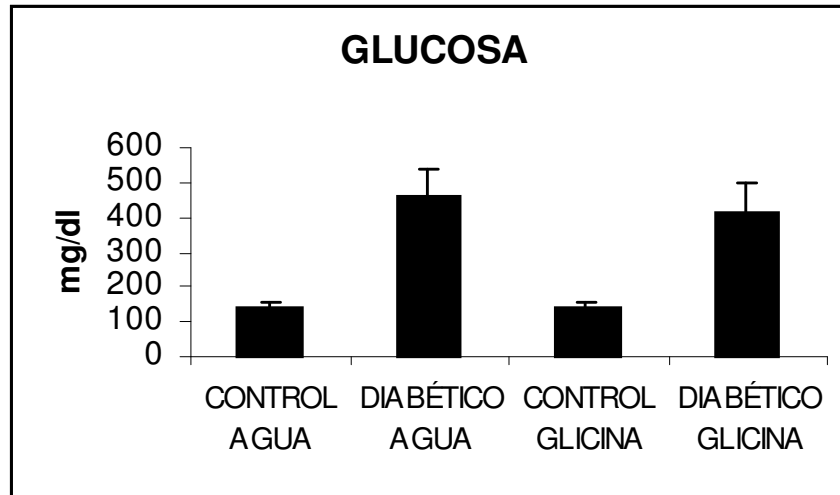


Fig. 2 Valores de glucosa en los grupos experimentales expresado en mg/dl.

La figura 3 muestra la concentración de hemoglobina glucosilada (HbA_{1c}) expresada en %, donde observamos que no existen diferencias significativas entre el grupo control que consumió agua ($3.86 \% \pm 0.58$) y el que tomó glicina ($4.54 \% \pm 0.61$). El grupo diabético que consumió el aminoácido disminuyó la hemoglobina aproximadamente en un 1.46% (9.38 ± 1.72) en comparación con el grupo diabético que tomó agua (10.84 ± 2.22), no presentando diferencias significativas ($p > 0.05$). El grupo diabético que consumió agua aumentó su HbA_{1c} 2.81 veces, mientras que el grupo diabético que consumió glicina solamente 2.06 veces.

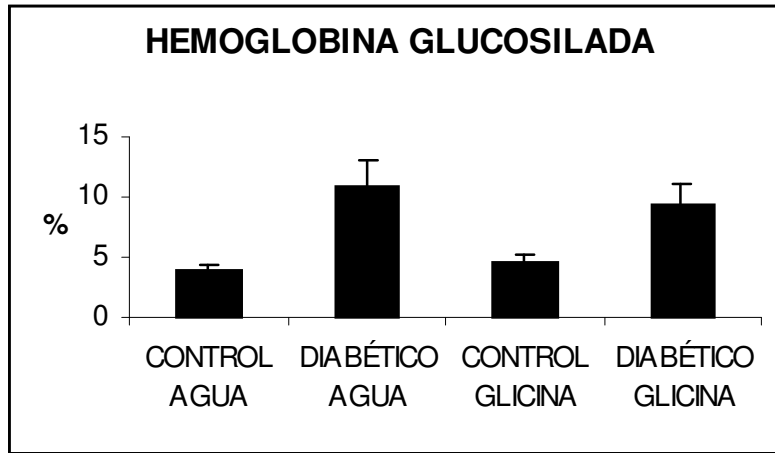


Fig. 3 Valores de hemoglobina glucosilada en los diferentes tratamientos, expresados en %.

En la figura 4 se presenta la actividad de la enzima catalasa expresada en UI/mgHb. Observamos que no existen diferencias significativas al comparar los 4 grupos experimentales ($p > 0.05$). Los valores del grupo control con agua fueron de 1.90 ± 0.23 UI/mgHb y los del grupo control con glicina 1.75 ± 0.22 UI/mgHb, mientras que el grupo diabético que tomó agua 1.62 ± 0.33 , aumentando en las ratas que tomaron glicina (1.64 ± 0.36). Sin embargo, los datos del grupo son más altos que los de los grupos diabéticos, siendo el control con agua el que presenta el valor más alto, en promedio 1.34 UI/mgHb con respecto a los demás.

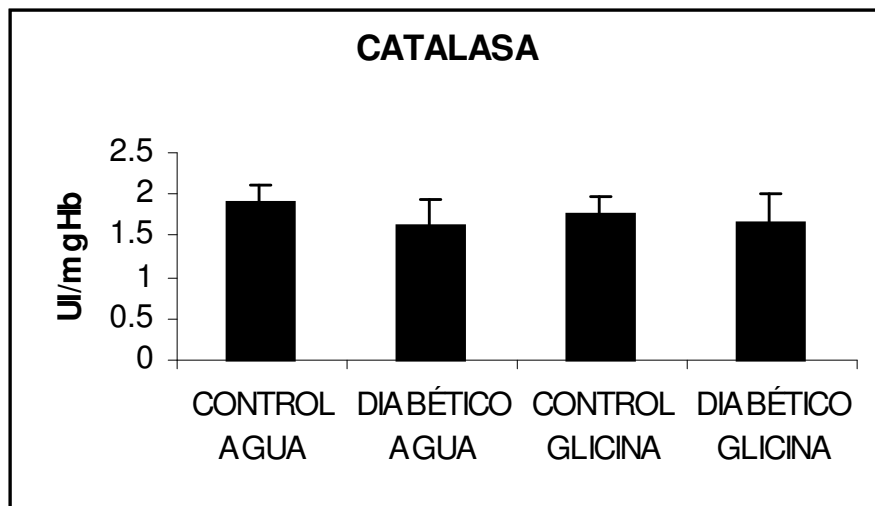


Fig. 4 Actividad de la Catalasa expresada en UI/mgHb.

La actividad de la enzima SOD expresada como UI/mgprot se presenta en la figura 5. Al comparar el grupo control con agua (125.99 ± 34.97 UI/mgprot) con el grupo control con glicina (108.24 ± 57.40 UI/mgprot) no existen diferencias ($p > 0.05$). El grupo 2 mostró una disminución en la actividad enzimática (62.77 ± 11.66), siendo significativa ($p < 0.05$) cuando se comparó con el grupo 1. El grupo diabético que tomó glicina en el agua de bebida, también disminuyó la actividad enzimática (91.77 ± 35.05). La actividad enzimática del grupo 2 disminuyó un 50% al referirlo con el grupo control correspondiente ($p < 0.001$); sin embargo, el grupo diabético tratado con glicina, solo disminuyó la actividad en un 15%.

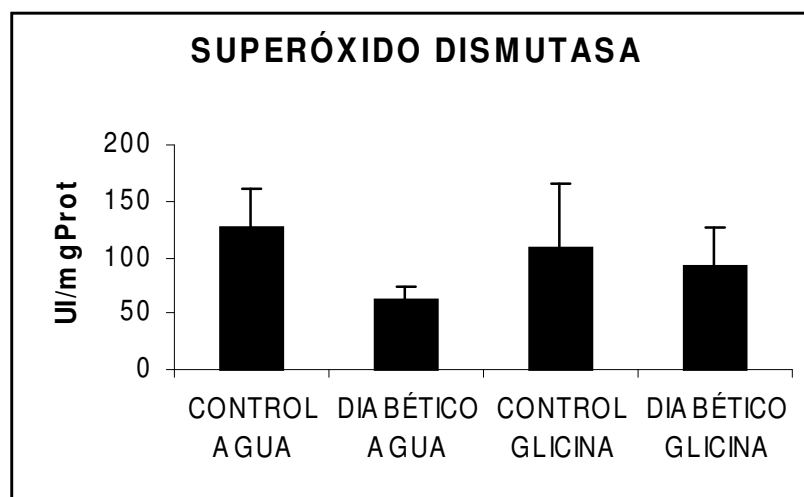


Fig. 5 Actividad de la enzima Superóxido dismutasa expresada en UI/mgprot.

En la tabla 2 se aprecia el índice de mortalidad de los animales durante el experimento. Se refiere como el cociente del número de animales muertos con respecto al número total de animales.

Tabla 2

GRUPO	ÍNDICE DE MORTALIDAD
1.- Control + agua	0
2.- Diabético + agua	4/19
3.- Control + glicina	0
4.- Diabético + glicina	0

Este dato fue mayor en los animales diabéticos sin tratamiento (21.05%), mientras que los animales tratados con glicina no presentaron defunciones, así como el grupo de animales control con agua.

Las estadísticas se realizaron con el software SPSS utilizando el ensayo de Kruskal-Wallis, ya que es una prueba no paramétrica para muestras independientes. Las diferencias entre los grupos fue considerada significativa cuando $P < 0.05$.

1. DISCUSIÓN

La Diabetes Mellitus es un síndrome que se caracteriza por la pérdida de la homeostasis de la glucosa, con trastornos en el metabolismo de lípidos y proteínas. Sus síntomas causan limitaciones en el modo de vida de los pacientes y en muchos de ellos el desarrollo de complicaciones crónicas puede llevarlos a la invalidez o incluso a la muerte (81).

Uno de los objetivos del presente trabajo fue evaluar el peso de los animales durante el tiempo que duró el proyecto. El grupo de animales diabéticos que tomaron agua, disminuyó sustancialmente de peso (51.7%) en comparación con el grupo control, mientras que las ratas que tomaron glicina recuperan adicionalmente su peso en un 11.05%. Estudios realizados por Alvarado (82) y cols. demostraron que ratas diabéticas tratadas con glicina y taurina tuvieron un lento pero continuo aumento en el peso corporal de dichos animales. El mecanismo específico por el cual estos aminoácidos actúan no se ha esclarecido, probablemente debido a la formación de tejido muscular.

Una manera de evaluar la glicación de proteínas se lleva a cabo por medio de la medición de hemoglobina glucosilada (HbA_{1c}), la cual brinda en clínica un índice objetivo del control de la glucosa sanguínea a lo largo de un periodo de tiempo aproximado de 8-12 semanas atrás. En este estudio la hemoglobina glucosilada se encontró aumentada en el grupo de animales diabéticos sin tratamiento (10.85%), mientras que en los animales que consumieron glicina en el agua de bebida, hubo una leve disminución (9.38%) de los niveles de la HbA_{1c} lo que concuerda con los trabajos reportados por Carvajal et al (45) y González-Ortiz et al (73).

Se ha propuesto a la hiperglicemia como causa importante de las complicaciones microvasculares como la retinopatía, nefropatía y neuropatía en sujetos con diabetes (83). Estudios epidemiológicos han revelado que pacientes diabéticos con un mal control

glicémico y como consecuencia niveles altos de hemoglobina glucosilada, tienen mayor riesgo de presentar complicaciones, siendo un problema socioeconómico importante el manejar este tipo de pacientes. Una vez que se presentan dichas complicaciones, restaurar la normoglicemia no revierte los daños producidos aún modificando la calidad de vida de estos pacientes.

El estudio del control y las complicaciones diabéticas (DCCT) y el estudio prospectivo de la Diabetes del Reino Unido (UKPDS) en un estudio publicado a fines de 1998 confirman que la disminución de los niveles de hemoglobina glucosilada puede reducir la progresión o aparición de las complicaciones microvasculares de Diabetes tipo 2 cuando los niveles de Hb disminuyen de 9 a 7%, lo cual es el resultado de un buen control de la glicemia, además de disminuir el porcentaje de muertes relacionada con diabetes en un 25% (84-86).

En nuestro trabajo, la glucemia del grupo diabético fue muy marcada, mientras que el grupo diabético que tomó glicina presentó una leve disminución de la glucosa sérica; sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos diabéticos debido probablemente al tiempo de duración del proyecto, que fue de dos meses. Ya que estudios realizados por Alvarado y cols. (82) después de 6 meses de establecerse la diabetes experimental, los animales tratados con glicina y taurina disminuyeron la glucemia significativamente al compararlos con el grupo control (87).

Por otro lado, Ramakrishnan (88) demostró que los aminoácidos glicina y lisina son capaces de retardar la formación de catarata al reaccionar dichos aminoácidos con la glucosa en condiciones de pH y temperatura fisiológica por inhibición de la glicación, de esta manera, dichos aminoácidos pueden competir con la glucosa y evitar así la glicación de ciertas proteínas de homogenados del cristalino, además de disminuir los niveles de glucosa circulante y como consecuencia la hemoglobina glucosilada.

Durante la diabetes, se presenta un estado generalizado de estrés oxidativo, el cual puede definirse como una alteración del estado de equilibrio dinámico entre la producción de radicales de oxígeno y su eliminación en un sistema biológico. Estudios tanto *in vitro* como *in vivo* sugieren que la formación de radicales libres ha sido relacionada con la patofisiología de las complicaciones diabéticas (50). Por lo cual la teoría del estrés oxidativo establece que el incremento del daño oxidativo sería la principal causa del envejecimiento (90). La diabetes y el envejecimiento se relacionan de tal manera, que la diabetes a menudo se describe como envejecimiento prematuro (91).

En condiciones fisiológicas, las especies reactivas de oxígeno y sus metabolitos son generados continuamente y eliminados o neutralizados por antioxidantes o enzimas eliminadoras de radicales. Los antioxidantes protegen contra la peroxidación de lípidos y proteínas y las enzimas antioxidantes o eliminadoras de radicales regulan los niveles de éstos.

La actividad de las enzimas antioxidantes ha sido estudiada ampliamente en diabetes (72, 92, 93), habiéndose demostrado que la Cu-Zn SOD que se encuentra en el eritrocito se glica tanto *in vivo* como *in vitro*, además, esta glicación aumenta en un 40% en pacientes diabéticos (75), lo que concuerda con los resultados obtenidos por nosotros, dando como resultado una disminución en la actividad específica de dicha proteína (72) lo que concuerda con nuestros resultados. Así mismo, la glicación de proteínas puede alterar algunas de las funciones y propiedades (94) de ciertas proteínas susceptibles de ser glicadas. Este mecanismo da lugar a la formación de diversos compuestos intermediarios pudiendo inducir cambios estructurales de diversas enzimas y proteínas como: modificaciones conformacionales, oxidación de grupos tiol, agregación molecular, formación de disulfuros, hasta inactivación de enzimas. La glicación e inactivación de catalasa y SOD altera los sistemas para detoxificar el anión

superóxido y el peróxido de hidrógeno. Entre las proteínas que se glican de forma no enzimática (glicación) se encuentra: hemoglobina, colágena, albúmina, cristalino, tubulina y proteínas de membrana, etc. Se sabe que en diabetes existe una disminución en la actividad de enzimas antioxidantes en el plasma (95) como es el caso de la superóxido dismutasa, dando como resultado un incremento en la producción de anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (40, 70, 72).

Es pues la glicación de proteínas una de las causas que da lugar a la formación de catarata y proliferación de la retinopatía diabética formando bases de Schiff, productos de Amadori o productos de glicación avanzada (AGEs). Por este mecanismo se puede remover glucosa circulante así como disminuir la glicación de proteínas.

Se ha demostrado que el daño oxidativo y la alteración de los sistemas antioxidantes de defensa en el cristalino del ojo podría tener un papel importante en el desarrollo de catarata (96-98), ya que el H_2O_2 al encontrarse elevado en el humor vítreo y acuoso del ojo humano se ha asociado con catarata en pacientes diabéticos (100-101). El peróxido de hidrógeno puede dar lugar a opacidad cortical en el cristalino del ojo de conejo (102) e interferir con la función del DNA, proteínas del citoesqueleto y diversas enzimas como la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa. Es pues importante mencionar que los altos niveles de glucosa podrían ser, no solo la causa principal de catarata en pacientes diabético, sino de todas las complicaciones mencionadas.

Se ha demostrado en riñón, que aunque la expresión del mensajero para Cu-Zn SOD se encuentra elevada en diabetes, su actividad está disminuida (103). Esto sugiere que la enzima se inactiva en condiciones de hiperglicemia (72). También se sabe que el porcentaje de Cu-Zn SOD se encuentra elevada en eritrocitos de Diabetes tipo 1. Sin embargo, en el caso de GPx o catalasa la disminución en la actividad corresponde con la expresión de su mensajero (104-106).

La actividad de la enzima catalasa se ha encontrado que puede estar disminuida (107), aumentada (108) o sin presentar cambio lo que concuerda con los resultados obtenidos en este estudio. Estas diferencias podrían deberse al tiempo de duración de la diabetes, a la cepa o a otras causas.

Aunque en condiciones normales la catalasa no es esencial para algunos tipos de células, tiene un papel importante en la adaptación al estrés oxidativo en respuesta adaptativa de las células. Esta enzima captura el H_2O_2 antes de que pueda escapar de la célula y lo convierte en oxígeno molecular. En células animales, especialmente en eritrocitos humanos, la principal enzima antioxidante para la detoxificación de H_2O_2 es la GPX, ya que la catalasa presenta menos afinidad por el H_2O_2 . En condiciones fisiológicas, prácticamente todo el H_2O_2 de eritrocitos es detoxificado por la GPx. El ciclo redox del glutatión es de vital importancia en situaciones de leve estrés oxidativo, mientras que la catalasa funciona muy bien en condiciones de estrés oxidativo severo, que pudiese presentarse en casos de hiperglucemia (109).

La actividad de la enzima catalasa reportada por Kakkar y cols. (76) se encuentra elevada en sangre, hígado, corazón y páncreas, mientras que en el riñón la actividad está disminuida comparándolo con los grupos controles. En el presente trabajo no se encontraron diferencias entre los grupos diabéticos y los controles, lo cual no concuerda con lo especificado por dicho autor, posiblemente debido a que los trabajos manejan diferentes cepas de ratas. La actividad de CAT fue significativamente elevada en los 2 grupos de diabéticos en relación con el grupo control.

Por otro lado Yan y cols. (70) mencionan que la catalasa en eritrocitos se encuentra disminuida por incubación con fructuosa, glucosa, ribosa y glucosa 6 fosfato en pacientes diabéticos; mientras que la expresión del ARNm de la catalasa se encuentra

igualmente disminuida; sin embargo, Sechi y cols. (110) encuentran esta enzima aumentada en riñones de ratas diabéticas al compararla con grupos control.

La SOD que desempeña un papel fundamental en los mecanismos de defensa del organismo frente a los radicales libres, al inhibirse por la glicación podría incrementar el efecto nocivo de los radicales libres (103).

La actividad de la SOD se encuentra elevada en sangre, riñón, hígado, corazón y páncreas de ratas diabéticas al compararlos con los grupos control (76), mientras que en eritrocitos de pacientes diabéticos dicha enzima se encuentra disminuida (70), además, la expresión de CuZn-SOD esta significativamente elevada en riñones de ratas diabéticas, esto al compararlo con ratas control (110).

SOD es una enzima que cataliza la dismutación del radical anión superóxido (O_2^-) a peróxido de hidrógeno y oxígeno. Según Marklund (111) esta enzima puede ser inhibida por altas concentraciones de H_2O_2 . Estos autores plantean que la producción elevada de H_2O_2 podría inhibir a la enzima CuZn-SOD y a SOD extracelular en humanos. Estos planteamientos pueden explicar los resultados, los cuales evidencian una inhibición de la enzima SOD.

Sechi y cols. (110) indicaron que la actividad de SOD y CAT es modulada por muchos estímulos y es regulada por las necesidades biológicas impuestas por el estrés oxidativo (112). Los mismos autores mencionan que los niveles de RNAm de CuZn-SOD y CAT están incrementados en los riñones de ratas diabéticas en comparación con ratas control, aún cuando en el presente trabajo no se midieron los niveles de dichas enzimas en el riñón, estos resultados pueden presumir lo que posiblemente suceda en los eritrocitos; sin embargo, no se descarta la posibilidad de que en un futuro se realice la medición de estas enzimas en riñón, hígado y otros órganos.

Por otro lado, dichos investigadores (109, 112) mencionan que los niveles de glucosa en sangre al final del experimento y los niveles de RNAm de ambas enzimas sugiere que la alta concentración de glucosa en el plasma y/o en otros tejidos afecta la expresión de los genes renales de las enzimas antioxidantes endógenas (AOE). Las ratas tratadas con una moderada dosis de insulina normalizan los niveles de RNAm de la catalasa, pero no los de CuZn-SOD. La exposición a altas concentraciones de glucosa aumenta la actividad de ambas enzimas en cultivo de células endoteliales, lo cual sugiere un efecto compensatorio (113).

Recientemente Kang (114) reportó que la CuZn SOD *in vitro* es modificada por metilglioxal, el cual es un producto intermediario de la glicación y se encuentra elevado en diabetes perturbando así los sistemas antioxidantes, lo cual confirma lo reportado por Choudhary y cols. (115) en donde suministran diferentes dosis de metilglioxal a ratones albinos y observan que la actividad de las enzimas es modificada por dicho aminoácido y confirma la teoría propuesta de que la glicina pudiera estar minimizando los daños ocasionados por la glicación.

Basándonos en los resultados obtenidos, pudiéramos mencionar que la glicina pudiera ser útil en el tratamiento de la Diabetes, considerando que dicho aminoácido no tiene efectos secundarios.

1. CONCLUSIONES

La actividad de la enzima Catalasa no mostró diferencias en los cuatro grupos experimentales.

La actividad de la enzima Superóxido dismutasa mostró una disminución de 50.18% en el grupo de ratas diabéticas. El grupo que tomó glicina también presentó una disminución de la actividad de 15.22%.

La hemoglobina glucosilada aumentó 2.81 veces en el grupo de ratas diabéticas al compararlo con el grupo control. Por otro lado, este incremento fue de 2.06 veces en los animales que tomaron glicina.

El grupo diabético que tomó agua, presentó una disminución en el peso corporal de 51.7%, mientras el grupo que tomó glicina disminuyó solo 11.55%.

La glicina probablemente disminuye la glicación de la enzima SOD en estados de hiperglicemia.

La glicina probablemente disminuye los daños provocados por las complicaciones diabéticas.

1. BIBLIOGRAFÍA

1. Saltiel A.R. New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. *Cell*. 2001. 104: 517-529.
2. Atkinson, M.A. and MacLaren N.K. The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Eng. J. Med.* 1994. 331: 1428-1436.
3. Rull A. The impact of diabetes mellitus on public health in Mexico. *Current Science Ltd*: 64-74. In: *Research methodologies in human diabetes, Part 1*. Berlin; New York, Walter de Gruyter, (Diabetes Forum Series Research) 5:147-169.
4. Sanchez-Reyes L., Fanghanel G., Marquerz-Cid M.E., et al. Actualización en los diferentes subtipos de diabetes tipo MODY. *Revista Endocrinología y Nutrición*. 2001. Vol 9: 5-11.
5. Baynes J.W. and Thorpe S.R. Role of oxidative Stress in Diabetic Complications. *Diabetes*. 1999. 48: 1-9.
6. Kashiwagi A., Asahina T., Nishio Y., Ikebuchi M., Tanaka Y., Kikkawa R. and Shigeta Y. Glycation, Oxidativa Stress and Scavenger activity. *Diabetes*. 1996. 45: suppl 3 S84-S86.
7. Phillips D., Mann J. Diabetes inpatient utilization, cost and data wality. *NZ Med. J.* 1992. 12: 313-315.
8. Hernández-Ávila M., Olaíz F. G. La diabetes y el mexicano: un reto para la salud pública. *Ciencia*. 2002. 53; 8-17.
9. González-Villalpando, C., Stern M.P., Arredondo-Pérez B. Utilización de los servicios hospitalarios por pacientes diabéticos: estudio en población abierta. *Salud Pública de México*. 1994. 34 (4); 415-419.
10. Turner R. The U.K. Prospective Diabetes Study a Review. *Diabetes Care*. 1998. 21 suppl 3: C35-C38.
11. American Diabetes Association: Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus (Committee Report). *Diabetes Care*. 1998. 21 (Suppl. 1): S5-S19.
12. American Diabetes Association: Screening for Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*. 1998. 21 (Suppl. 1): S20-S22.
13. Bach, J.F. Insulin-dependent diabetes-mellitus as an autoimmune disease. *Endoc. Rev.* 1994. 5: 516-542.
14. National committee for clinical laboratory standars. Routine Urinalysis and collection. Transportation and preservation of urine specimens. Tentative guideline, NCCLS publication GP16-T, Villanova, PA. 1992.
15. La Porte R.E., et al. Prevalence and incidence of insulin-dependent diabetes. *Diabetes in America 2nd end* (National Institute od diabetes and digestive and kidney diseases, National Institute of Health, USA. 1995; 3:37. Turner R. The U.K. Prospective Diabetes Study a Review. *Diabetes Care*. 1998. 21 suppl 3: C35-C38.
16. Harris M.I. Impaired glucose tolerance in the U. S. population. *Diabetes Care* 1989. 12: 464-474.
17. Zimmet P.Z. Kelly West Lecture 1991: challenges in diabetes epidemiology from west to the rest. *Diabetes Care*. 1992. 15: 232-252.
18. Fujimoto W.Y., Leonetti D.L., Kinyoung J.L., Shuman W.P., Stolov W.C., Wahl P.W. Prevalence of complications among second-generation

- Japanese-American men with diabetes, impaired glucose tolerance or normal glucose tolerance. *Diabetes*. 1987. 36: 730-739.
19. Moss S.E., Klein R., Klein B. Maurer M.S. The association of glycemia and cause-specific mortality in a diabetic population. *Arch Int Med*. 1984. 154: 2473-2479.
 20. Kuusisto J., Mykknen L., Pyörala K., Laakso M. NIDDM and its metabolic control predict coronary heart disease in elderly subjects. *Diabetes*. 1994. 43: 960-967.
 21. Andersson D.K.G., Svaardsudd K. Long-term glycemic control relates to mortality in type II diabetes. *Diabetes Care*. 1995. 18: 1534-1543.
 22. Uusitupaa M.I.J., Niskanen L.K., Siitonen O., Voutilainen E., Pyörala K. Ten years cardiovascular mortality in relation to risk factors and abnormalities in lipoprotein composition in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic and non-diabetic subjects. *Diabetologia*. 1993. 18: 1534-1543.
 23. Norma 2200-50-002-A001. Instituto Mexicano del Seguro Social. Agosto de 2000. Manual de procedimientos para la atención Integral de derechohabientes con factores de riesgo asociados a diabetes mellitus o con diabetes mellitus.
 24. Coustan D.R., Gestational diabetes. *Diabetes in America 2nd edn* (National Institute of diabetes and kidney diseases, National Institute of Health, USA. 1995. 35: 703.
 25. Ganda O.M., Prevalence and incidence of secondary and other types of diabetes. *Diabetes in America 2nd edn* (National Institute of diabetes and digestive and kidney diseases, National Institute of Health, USA. 1995; 35: 703.
 26. Doria A, Plengvidya N. Recent advances in the genetics of maturity-onset diabetes of the young and other forms of autosomal dominant diabetes. *Curr Opin Endo Diab*. 2000. 7: 203.
 27. Gabbay K. The sorbitol pathway and the complications of diabetes. *N. Eng J Med*. 1973. 288: 831-836.
 28. Boel E., Selmer J., Flodgaard H., Jensen T. Diabetic late complication: Will aldose reductase inhibitors or inhibitors of advanced glycosylation end product formation hold promise?. *J Diabetes compl*. 1995. 9: 104-129.
 29. Vlassara H. Recent progress in advanced glycation end products and diabetic complications. *Diabetes*. 1997. 46: S19-S25.
 30. Gugliucci A., Allard M.F. Glycation of hepatocyte cytosolic Proteins in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Bioch Bioph Res Comm*. 1996. 229: 952-958.
 31. Ziyadeh F. Mediators of hyperglycemia and the pathogenesis of matrix accumulation in diabetic renal disease. *Miner Elect Metab*. 1995. 21: 292-302.
 32. Giugliano D., Ceriello A., Paolesso G. Diabetes Mellitus, hypertension, and cardiovascular disease: which roles for oxidative stress?. *Metabolism*. 1995. 44: 363-368.
 33. Lopez-Virella M., Virella G. Cytokines modified lipoproteins and atherosclerosis in diabetes. *Diabetes*. 1996. 45 suppl 3 S40-S44.
 34. Kowlura R.A., Heidorn D.B., Edmondson S.P., Bitensky M.W.A., Downer N.W., Whaley T.W, Trehwella J. Glycation of calmodulin: chemistry and

- structural and functional consequences. *Biochemistry*. 1989. 28: 2220-2228.
35. Monnier V. Toward a Maillard reaction theory of aging In Baynes J. W. Monnier J. M. ed. *Proceeding of the NIH. Conference on the Maillard Reaction o in Ageing. Diabetes and Nutrition*. New York: Liss. 1989. 1-22.
 36. Hunt J.V., Smith C.T., Wolfe S.P. Autoxidative glycosylation and possible involvement of peroxides and free radicals in LDL modification by glucose. *Diabetes*. 1990. 39: 1420-1424.
 37. Brownlee M., Cerami A. The biochemistry of the complications of diabetes mellitus. *Ann. Rev. Biochem*. 1981. 50: 385-432.
 38. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001. 414: 813-820.
 39. Giugliano D., Ceriello A., Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes care*. 1996. 19: 257-267.
 40. Ceriello A. Mercuri F. Quagliario R. Assaloni R. Motz E. Tonutti L. Taboga C. Detection of nitrotyrosine in the diabetic plasma: evidence of oxidative stress. *Diabetologia*. 2001. 44: 834-838.
 41. Brownlee M. Glycation and diabetic complications. *Diabetes*. 1994. 43: 836-841.
 42. Brownlee M. Glycosylation products as toxic mediators of diabetic complications. *Ann. Rev. Med*. 1991. 42: 159-161.
 43. Mullarkey C.J. Edelstein D., Brownlee M. Free radical generation by early glycation products: a mechanism for accelerated atherogenesis in diabetes. 1990. 173: 932-939.
 44. Medina N.R. Concentración de lipoperoxidos y capacidad antioxidante del suero sanguíneo humano. Efecto de la contaminación atmosférica y el tabaquismo. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM. 1997. México. 89pp.
 45. Carbajal C.R.C. Sistema antioxidante enzimático renal en la nefrotoxicidad por dicromato de potasio. Tesis de Maestría. Facultad de Química. UNAM. 2002. México. 98pp.
 46. Maldonado J.P.D. Nefrotoxicidad por gentamicina. Efecto protector del ajo y su relación con superóxido dismutasa. Tesis de Maestría. Facultad de Química. UNAM. 2000. México. 105pp.
 47. Granados S.Ma.A. Efecto del ajo en polvo sobre el síndrome nefrótico y la hipertensión. Tesis de Maestría. UNAM. 1999. México. 86pp.
 48. Olivares C.I.M. Efecto del ajo sobre la nefrotoxicidad por gentamicina: papel de las especies reactivas de oxígeno y las enzimas antioxidantes. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM. 2000. México. 56pp.
 49. Gugliucci A. Glicación de proteínas: rol protagónico de la hiperglicemia en las complicaciones crónicas de la diabetes mellitus. *Rev. Med. Uruguay*. 2000. 16: 58-75.
 50. Ceriello A., Morocutti A., Mercuri F., Quagliario L., Moro M., Damante G., Viberti GC. Detective intracellular antioxidant enzyme production in Type 1 Diabetic Patients UIT Nephropathy. *Diabetes*. 2000. 49: 2170-2177.
 51. Harris E.D. Regulation of antioxidant enzymes. *Faseb J*. 1992. 6: 2675-2683.
 52. Beauchamp C. Fridovich I. Superoxide dismutase; improved assay and assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* 1971; 44:276-281.

53. Flohé L., Günzler W. Glutathione peroxidase. *Methods of Enzymology*. 1984. 105: 114-121.
54. Ou P., Wolff S.P. Erythrocyte catalase inactivation (H_2O_2 production) by ascorbic acid and glucose in the presence of aminotriazole: role of transition metals and relevance to diabetes. *Biochem J*. 1994. 303: 935-940.
55. Aebi H. Catalase *in vitro*. *Methods of Enzymology*. 1984. 105: 121-126.
56. Nihal S.A., Sadrzadeh S.M.H., Hallaway P.E., Eaton J.W. Erythrocyte catalase. A somatic oxidant defense?. *J. Clin. Invest*. 1986. 77: 319-321.
57. Góth L. Eaton J.W: Hereditary catalase deficiencies and increased risk of diabetes. *The Lancet*. 2000. 356: 1820-1821.
58. Heales S.J.R. Catalase deficiency, diabetes and mitochondrial function. *The Lancet*. 2000. 357: 314.
59. Butter G.D., Lindell S.L., Sumimoto R., Schilling M.K., Southard J.H., Belzer F.O. Effect of glycine in dog and rat liver transplantation. *Transplantation*. 1993. 56(4): 817-822.
60. Zhong Z., Jones S., Thurman R. Glycine minimizes reperfusion injury in a low-flow reflow liver perfusion model in the rat. *Am J Physiol*. 1996. 270: G332-G338.
61. Wheeler M., Thurman R. Production of superoxide and TNF- α from alveolar macrophages is blunted by glycine. *Am J Physiol*. 1999. 277: L952-L959.
62. Wheeler M.D., Ikejima K., Enomoto N., Stacklewitz R.F., Seabra V., Zhong Z., Yin M., Schemmer P., Rose M.L., Rusyn I., Bradford B., Thurman R.G. Glycine: a new anti-inflammatory immunonutrient. *Cell. Mol Life Sci*. 1999. 56: 843-856.
63. Wheeler M.D., Stacklewitz R.F., Yamashina S., Ikejima K., Morrow L.A., Thurman R.G. Glycine-gated chloride channels in neutrophils attenuate calcium influx and superoxide production. *FASEB J*. 2000. 14: 476-484.
64. Ikejima K., Imuro Y., Forman D.T., Thurman R.G. A diet containing glycine improves survival in endotoxin shock in the rat. *Am. J. Physiol*. 1996. 271: G97-G103.
65. Gannon M.C., Nuttall J.A., Nuttall F.Q. The metabolic response to ingested glycine. *Am J. Clin. Nutr*. 2002. 76: 1302-1307.
66. Thurman R. Prevention of cyclosporine-induced nephrotoxicity with dietary glycine. *Transplantation*. 1997. 63: 1661-1667.
67. Luc J.C., Paul P.C., Anton J.M., Wim H.M., Hans A. Amino acid ingestion strongly enhances insulin secretion in patients with long-term type 2 diabetes. *Diabetes care*. 2003. 26: 625-630.
68. Yin M. Ikejima K., Arttel G.E., Glycine accelerates recovery from alcohol-induced liver injury. *Journal pharmacology experter*. 1998. 286: 1014-1019.
69. Carvajal-Sandoval G., Juárez de Carvajal E., Ramos-Martinez G., Carvajal Juárez M. E. Inhibición de la glicosilación no enzimática de la hemoglobina en la diabetes mellitus. *Rev Inst Nat Enf Res*. 1995. 8: 185-188.
70. Yan H., Harding J.J. Glycation-induced inactivation and loss of antigenicity of catalase and superoxide dismutase. *Biochem J*. 1997. 328: 599-605.

71. Gugliucci A., Menini T. Circulating advanced glycation peptides in streptozotocin-induced diabetic rats: evidence for preferential modification of IgG light chains. *Life Sciences*. 1998. 62: 2141-2150.
72. Arai K., Maguchi S., Fujii S., Ishibashi h., Oikawa K., Taniguchi N. Glycation and inactivation of Human Cu-Zn-Superoxide Dismutase. *Biochim. Biophys*. 1987. 282: 16969-16972.
73. González-Ortiz M. Medina-Santillán R., Martínez-Abundis E., Reynoso von Drateln C. Effect of glycine on insulin secretion and action in healthy first-degree relatives of tipe 2 diabetes mellitus patients. *Horm Metab Res*. 2001. 33: 358-360
74. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. Randall R.J. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem* 1951; 19:256-275.
75. Kawamura N., Ookawara T., Suzuki K., Konishi K., Mino M., Taniguchi n. Increased glycated Cu,Zn-speroxide dismutase levels in erythrocytes of patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74:1352-1354.
76. Kakkar R., Kalra J., Mantha S.V., Prasad K. Lipid peroxidation and activity of antioxidant encimes in diabetic rats. *Mol. Cell. Biochem*. 1995. 151: 113-119.
77. Heinze E., Kohne E., Meissner A., *et al.* Hemoglobin A_{1c} (HbA_{1c}) in children cith long standing and newly diagnosed Diabetes mellitus. *Acta pediatr Scand*. 1979. 68: 609-612.
78. Mortensen H.B. Glycated Hemoglobin. *Dan Med Bull*. 1985. 6: 309-328.
79. Lehmann P. Homegenous immunoturbidometric assay for hemoglobin A1c adaptable for most clinical chemistry analyzers; a new concept in the care of Diabetic patients. AACC 45th National Meeting. 1993.
80. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. Randall R.J. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol Chem*. 1951. 19: 256-275.
81. Mamposo S.M., León F.O.S., Licea P.M.E., Pérez M.B., Castillo J.R. Especies reactivas de oxígeno en la diabetes mellitus con retinopatía diabética y sin ella. *Rev. Cubana. End*. 1999. 140; 8-15.
82. Alvarado-Vásquez N., Zamudio P., Cerón E., Vanda B., Zenteno E., Carvajal-Sandoval. Effect of glycine in streptozotocin-induced diabetic rats. *Elsevier Science. Comp. Biochem. Physiol*. 2003. 134: 521-527.
83. Canahuati R.L.E. Terrés S. A.M., Gonxález S. R. Aterogénesis y glicosilación de proteínas en diabetes mellitus. *Rev. Mex. Pat. Clin*. 1996. 43; 67-79.
84. Matilla B., Mauriz J.L. Culebras J.M. González-Gallego J., González P. Revisión: La glicina: un nutriente antioxidante protector celular. *Nutr. Hosp*. 2002. 17: 2-9.
85. The diabetes control and complications trial data group. Relationship of glycemic exposure (HbA_{1c}) to the risk of development and progression of retinopathy in the diabetes control and complications trial. *Diabetes*. 1995. 44: 968-983.
86. The diabetes control and complications trial data group. The effect of intensive diabetes management on macrovascular events and risk factors in the diabetes control and complications trial. *Am. J. Cardiol*. 1995. 75: 894-903.

87. Jyothirmayi R.G.N., Modak R., Reddi, A.S. L-Lysine reduces nonenzymatic glycation of glomerular basement membrane collagen and albuminuria in diabetic rats. *Nephron*. 2001. 87: 148-154.
88. Alvarado-Vásquez N. Neurological, biochemical and morphologic análisis of a model of diabetic rata type I treated with glycine or taurine. Tesis de Maestria. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 1999. 145pp.
89. Ramakrishnan S., Sulochana K.N. Decrease in glycation of lensproteins by lysine and glycine by scavenging of glucose and possible mitigation of cataractogenesis.. *Exp. Eye. Res.* 1993. 57: 623-628.
90. Sohal R.S., Weindruch R. Oxidative stress caloric restriction, and aging. *Science*. 1996. 5: 59-63.
91. González-Fllecha
92. alliwell B., Gutteridge J.M.C. Free radicals in biology and medicine, 2nd ed. Oxford: Clarendon press. 1989. 416-508.
93. Taniguchi N., Kinoshita N., Arai K., et al. Inactivation of erythrocyte Cu-Zn-superoxide dismutase through nonenzymatic glycosylation. In: Baynes J.W., Monnier B.M. eds. *The Maillard reaction in aging, diabetes and nutrition*. New York; Liss. 1989, 51-70.
94. Ahmed M.U., Thorpe S.R., Baynes J-W. Identification of N-Carboxymethyllysine as a degradation product of fructoselysine in glycated protein. *J. Biol. Chem.* 1986. 261; 4889-4894.
95. Ceriello A., Bortolotti N., Falleti E., Total radical-trapping antioxidant parameter in non-insulin dependent diabetic patients. *Diabetes Care*. 1997. 20: 194-197.
96. Bhuyan K.C., Bhuyan D.K., Podos S.M.
97. Blakytyn R., Harding J.J. Prevention of cataract in diabetica rats by aspirin, paracetamol (acetaminophen) and ibuprofen. *Exp. Eye. Res.* 1992. 54: 509-518.
98. Babizhayev M.A. Failure to with stand oxidative stress induced by phospholipid hydroperoxides as a possible cause of the lens opacities in systemic diseases and ageing. *Biochem. Biophys. Acta*. 1996. 1315: 87-99.
99. Bhuyan K.C., Bhuyan D.K. Superoxide dismutase of the eyes: relative functions of superoxide dismutasa and catalase in protecting the ocular lens from oxidative damage. *Biochem. Biophys. Acta*. 1978. 542: 28-38.
100. Spector A., Garner W.H. Hydrogen peroxide and human cataract. *Exp. Eye. Res.* 1981. 33: 673-681.
101. Simonelli F., Cotticelli L., Iura A., Manna C., Nesti A., Rinaldi E., Auricchio G. The decrease of free epsilon-amino groups in senile and diabetic cataracts. *Ophthalm. Res.* 1990. 22: 160-165.
102. Giblin F.J., McCready J.P., Schrimsher L., Reddy V.N. Peroxide-induced effects on lens cation transport following inhibition of glutathione reductasa activity in vitro. *Exp. Eye. Res.* 1987. 45: 77-92.
103. Reddi A.S., Bollineni J.S. Renal cortical expression of mRNAs for antioxidant enzymes in normal and diabetic rats. *Biochemical and biophysical Research communications*. 1997. 235: 598-601.
104. Matkovics B., Varga S.I., Szabo L., Witas H. The effect of diabetes on the activities of the peroxide metabolism enzymes. *Horm. Metab. Res.* 1982. 14: 77-79.

105. Loven D., Schedl H., Wilson H., Daabees T.T., Stegink L.D., Diekus M., Oberley L. Effect of insulin and oral glutathione on glutathione levels and superoxide dismutase activities in organs of rats with streptozocin-induced diabetes. *Diabetes*. 1986. 35: 503-507.
106. Wohaieb S.A. Godin D.V. Alterations in free radical tissue-defense mechanisms in streptozocin-induced diabetes in rat. Effect of insulin treatment. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1987. 65:2191-2195.
107. Wohaieb S.A. Godin D.V. Alterations in tissue antioxidant systems in the spontaneously diabetic (BB wistar) rat. *Diabetes*. 1987. 36: 1014-1018.
108. Crouch R. Kimsey G., Priest D.G., Sarda A., Buse M.G. Effect of streptozotocin on erythrocyte and retinal superoxide dismutase. *Diabetologia*. 1978. 15: 53-57.
109. Olalla M.L., Matés J.M. Radicales libres de oxígeno y enzimas antioxidantes.
<http://www.ciencias.uma.es/publicaciones/encuentros/encuentros56/radicales.html>. Julio 2003.
110. Sechi L.A., Ceriello A., Griffin C.A., Catena C., Amstad P., Schambelan M., Bartoli E. Renal antioxidant enzyme mRNA levels are increased in rats with experimental diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1997. 40: 23-29.
111. Marklund S. Distribution of Cu-Zn superoxide dismutase and Mn superoxide dismutase in human tissues and extracellular fluids. *Acta Physiol Scand*. 1980. 492: 19-23.
112. Touati D. Regulation and protective role of the microbial superoxide dismutases. In: Acandolios J. G. (ed) current communications in cell and molecular biology. V. Molecular biology and free radical scavenging systems, cold spring Harbor laboratory press, Col Spring Harbor, pp 231-261.
113. Ceriello A., Russo P., Amstad P., Cerutti P. High glucose induces antioxidant enzymes in human endothelial cells in culture. *Diabetes*. 1996. 45: 471-477.
114. Kang J.H. Modification and inactivation of human Cu,Zn-Superoxide dismutase by methylglyoxal. *Mol Cells*. 2003. 15: 194-199.
115. Choudhary D., Chandra D., Kale R.K. Influence of methylglyoxal on antioxidant enzymes and oxidative damage. *Toxicology letters*. 1997. 93: 141-152.