

Radicales libres y mecanismos de daño tisular en la diabetes mellitus

Gustavo Acosta Altamirano^a, María Guadalupe Frías de León^b, María del Rocío Reyes-Montes^b, Víctor Vargas Hernández^c, Juan Antonio Suárez Cuencá^d



Humberto J. Boscán F.

Resumen

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad crónico-degenerativa de elevada incidencia y prevalencia a nivel mundial. La hiperglucemia crónica, característica de la diabetes, genera mayor producción de radicales de superóxido, que juegan un papel principal en los mecanismos de daño tisular responsables de las complicaciones clínicas de la DM: la glucosilación de proteínas y acumulación de productos de la glucosilación avanzada, y la activación de las vías del sorbitol, de las hexosaminas y de la proteína cinasa C. Aunque se han desarrollado diferentes fármacos para inhibir las vías de daño, aún no se ha demostrado su verdadero beneficio en diabéticos. Por lo tanto, el buen control de la glucemia sigue siendo el factor fundamental para evitar o retardar el daño tisular.

^aClínica de Inmunodiagnóstico. México.

^bDepartamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Medicina. UNAM.

^cHospital Juárez de México.

^dDepartamento de Biología Celular. Instituto de Fisiología Celular. UNAM.

Correo electrónico: mq9903@yahoo.com.mx

Palabras clave: Diabetes mellitus, hiperglucemia, radicales libres, estrés oxidativo, complicaciones diabéticas, antioxidantes, especies reactivas de oxígeno.

Free radicals and mechanisms of tissue damage in diabetes mellitus

Abstract

Diabetes mellitus (DM) is a chronic-degenerative disease with a high incidence and prevalence around the world. Chronic hyperglycemia, a feature of diabetes, induces a higher production of superoxide free radicals, which play a major role in the mechanisms of tissue damage responsible for the clinical complications of DM: advanced glycosylation and activation of sorbitol, hexosamines, and protein kinase C pathways. Although different drugs that inhibit the damaging pathways have been developed, their actual benefit in diabetic patients has not been proved yet. Therefore, adequate glycemia control is still the fundamental factor to prevent or delay tissue damage.

Key words: Diabetes mellitus, hyperglycemia, free radicals, oxidative stress, diabetic complications, antioxidants, reactive oxygen species.

INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad metabólica, crónica, degenerativa e incurable, de incidencia y prevalencia elevadas a nivel mundial. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha pronosticado que para el año 2030 habrá cerca de 366 millones de personas diabéticas en el mundo mientras que en México, de acuerdo con los datos de la Secretaría de Salud, el 9 % de la población adulta es diabética.^{1,2}

La principal manifestación de la DM es la hiperglucemia ocasionada por una deficiencia, absoluta o relativa, en la secreción o función de la insulina. La insulina es una hormona producida en las células de los islotes de Langerhans (tipo β) del páncreas, la función de esta hormona es permitir el ingreso de la glucosa a los tejidos insulino-dependientes para que se utilice en las vías metabólicas encargadas de la producción de energía. La hiperglucemia provoca alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, proteínas y lípidos; además está implicada en el desarrollo de complicaciones crónicas sistémicas que constituyen la principal causa de mortalidad en la DM. Entre las complicaciones crónicas más frecuentes están la retinopatía, nefropatía, neuropatía, disfunción sexual, coma hiperosmolar, cardiopatía y neumopatía diabética.^{3,4}

Existen varios tipos de DM, no obstante, los más frecuentes son: la tipo 1 (DM1) o dependiente de insulina y la tipo 2 (DM2) o independiente de insulina. La DM1 se manifiesta por la disminución de la secreción de insulina ocasionada por la destrucción de las células β pancreáticas de los islotes de Langerhans, y está mediada por procesos autoinmunes e inmunogenéticos, con aparición en forma repentina durante la edad pediátrica.^{1,5} La DM2 se desarrolla por la resistencia a la acción de la insulina en los tejidos periféricos, por alteraciones en la unión de la hormona con su receptor o por alteraciones en su receptor, y aunque es común entre la población adulta puede presentarse a cualquier edad. En los últimos años, la DM2 aumentó en frecuencia, incluso en la población infantil, principalmente a consecuencia de los malos hábitos en la alimentación, mayor prevalencia de obesidad y sedentarismo.^{1,6}

En los últimos años, la Diabetes Mellitus Tipo 2 aumentó en frecuencia, incluso en la población infantil, principalmente a consecuencia de los malos hábitos en la alimentación, mayor prevalencia de obesidad y sedentarismo.

Se ha demostrado ampliamente que la hiperglucemia, tanto intra como extracelular, genera una mayor producción de radicales libres (RL), principalmente el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), y con ello se incrementa el daño por estrés oxidativo (EOx).⁷⁻¹⁴ El EOx es el promotor del desarrollo de las múltiples complicaciones asociadas a la DM, así mismo el EOx está involucrado en la apoptosis (muerte celular programada) de las células β pancreáticas de los islotes de Langerhans y la resistencia a la insulina, que se observan en la DM1 y la DM2, respectivamente.^{10,12,15,16} Los radicales $O_2^{\cdot-}$, peróxido de hidrógeno (H_2O_2) e hidroxilo ($\cdot OH$) se producen excesivamente en la mitocondria cuando el oxígeno se reduce de manera incompleta durante la fosforilación oxidativa. Estos RL ocasionan daño celular por oxidación de lípidos, proteínas y cortes en la doble cadena del DNA.^{11,17} No obstante, el organismo posee enzimas antioxidantes para eliminar los RL, tales como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa.^{11,16,18}

Por otra parte, la producción excesiva de $O_2^{\cdot-}$ inhibe la actividad de una de las enzimas limitantes de la glucólisis, la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (G3PDH). La inactividad de G3PDH se debe a modificaciones estructurales de la enzima causadas por la adhesión de polímeros de ADP-ribosa sintetizados por la polimerasa poli[ADP-ribosa] (PARP). La PARP reside en el núcleo en forma inactiva, pero cuando el DNA sufre algún daño se estimula su actividad. Este fenómeno ocurre cuando, en estado de hiperglucemia, se produce un exceso de $O_2^{\cdot-}$ que rompe la cadena de DNA. Una vez activada la PARP, ésta fracciona a la molécula



Radiografía de pie diabético.

la de nicotinamida adenina dinucleótido oxidada (NAD⁺) en sus 2 componentes, el ácido nicotínico y la ADP-ribosa, y posteriormente sintetiza polímeros de ADP-ribosa, estos polímeros se acumulan y adhieren a la G3PDH y otras proteínas nucleares provocando alteraciones en la estructura y función de dichas proteínas. Por esta razón, en diabéticos, el nivel del gliceraldehído-3 fosfato (G3P) se encuentra elevado al no poder ser metabolizado por la G3PDH, y la acumulación de G3P activa cuatro mecanismos diferentes de daño tisular: glucosilación de proteínas y formación de productos finales de la glucosilación avanzada; activación de las vías del sorbitol, de las hexosaminas y de la proteína cinasa C^{10,12,14,15,19,20} (**figura 1**).

MECANISMOS DE DAÑO TISULAR ACTIVADOS POR INHIBICIÓN DE LA GADPH EN LA DM

Vía del sorbitol. Esta vía es una de las fundamentales en la degradación de la glucosa por la aldosa reductasa (AR). La AR se localiza en tejidos que no requieren insulina para la captación de glucosa, como: ojo (epitelio corneal, cristalino y pericitos retinales), riñón (podocitos, células mesangiales, epitelio tubular), y nervio periférico (axones y células de

La producción de sorbitol ocasiona edema celular y axonal (neuropatías) por el aumento en la presión osmótica intracelular y bloqueo de la actividad de la ATPasa sodio/potasio en las fibras nerviosas.

Schwann^{17,20}). En condiciones fisiológicas normales, la AR tiene la función de reducir los aldehídos tóxicos a alcoholes inactivos dentro de la célula, pero cuando la glucosa aumenta la AR se encarga de reducirla a sorbitol, y éste es oxidado a fructosa por la sorbitol deshidrogenasa. El sorbitol y la fructosa, junto con la disminución del cofactor nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado (NADP) e incremento del cofactor nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH), son moléculas que están implicadas en el desarrollo de las complicaciones diabéticas. La producción de sorbitol ocasiona edema celular y axonal (neuropatías) por el aumento en la presión osmótica intracelular y bloqueo de la actividad de la ATPasa sodio/potasio en las fibras nerviosas.¹⁹ La mayor producción de fructosa intracelular permite el ingreso de este compuesto a la vía glucolítica como fructosa-6-fosfato o como fructosa-1-fosfato, lo que a su vez incrementa los intermediarios G3P y dihidroxi-acetona fosfato (DHAP). La entrada de fructosa a la vía glucolítica como fructosa-1-fosfato genera directamente G3P y DHAP. Los metabolitos mencionados también poseen suficiente capacidad para glucosilar proteínas y generar O₂⁻, contribuyendo de esta manera al incremento de EOx. El cofactor NADPH es requerido para la actividad de la AR, por lo que un incremento en la vía del sorbitol resulta en una disminución intracelular de NADPH y aumento del NADP, estos cambios alteran la actividad de enzimas que también emplean el NADPH como cofactor, tales como la glutatión reductasa y óxido nítrico sintasa. Así mismo, la producción anormal de radicales O₂⁻ altera el metabolismo del óxido nítrico (NO) ya que reaccio-

nan con éste para formar peroxinitrilo ($\cdot\text{OONO}$), un compuesto con gran capacidad oxidante al descomponerse en $\cdot\text{OH}$ y dióxido de nitrógeno (NO_2),^{14,15,19} por lo que el NADPH es un factor importante en la protección contra el daño ocasionado por los RL (**figura 1**).

Glucosilación de proteínas y formación de los productos de la glucosilación avanzada (PGA). La glucosilación de proteínas resulta de la formación de un enlace covalente entre la glucosa y el grupo ϵ -amino de la lisina de las proteínas plasmáticas y tisulares, o el grupo α -amino terminal de la cadena polipeptídica. El nivel de glucosilación dependerá de la concentración de glucosa y del tiempo de vida media de la proteína. La glucosilación trae como consecuencia que las proteínas nativas modifiquen su estructura, sus propiedades físico-químicas y funciones biológicas.^{7,21} Es importante mencionar que la mayoría de las proteínas del organismo se glucosilan, entre ellas están la albúmina, hemoglobina, apolipoproteínas, colágeno, fibrinógeno, inmunoglobulinas. En presencia de metales como Cu^{2+} y Fe^{2+} , las proteínas glucosiladas pueden ceder un electrón al oxígeno molecular y generar RL.⁷ Cuando se glucosilan proteínas de larga vida, como colágeno, sufren reordenaciones irreversibles para formar compuestos más estables, los llamados productos de la glucosilación avanzada (PGA). Durante la formación de los PGA, las proteínas modifican su función, así como su estructura secundaria y terciaria, lo que conlleva a cambios en la permeabilidad de las membranas basales, constituyendo un factor importante en el desarrollo de la retinopatía y nefropatía diabéticas. Antes de la formación de los PGA se generan diferentes intermediarios o precursores que también son tóxicos, como el metilglioxal.²² El metilglioxal es eliminado fisiológicamente por la glioxalasa dependiente de glutatión, pero en la DM la expresión de la glioxalasa se altera, lo que contribuye a la citotoxicidad y complicaciones crónicas originadas por este intermediario^{15,23-26} (**figura 1**).

Vía de las hexosaminas. Esta vía se encarga de metabolizar una pequeña parte de la glucosa que ingresa a la célula. La glucosa ingresa a glucólisis, pero al transformarse a fructosa 6-fosfato puede in-

La glucosilación trae como consecuencia que las proteínas nativas modifiquen su estructura, sus propiedades físico-químicas y funciones biológicas.

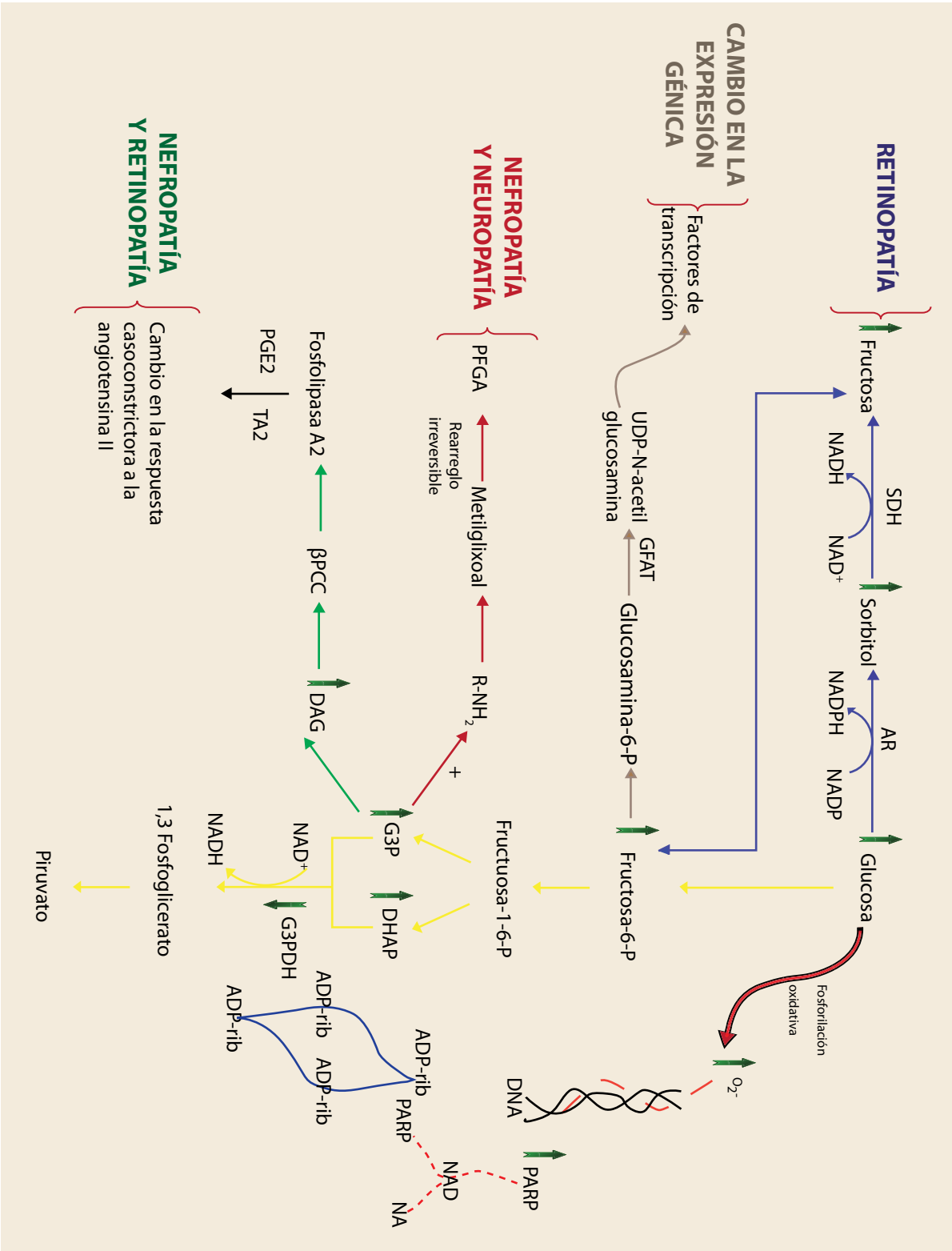
Cuando se glucosilan proteínas de larga vida, sufren reordenaciones irreversibles. La mayoría de las proteínas del organismo se glucosilan, entre ellas están la albúmina, hemoglobina, apolipoproteínas, colágeno, fibrinógeno, inmunoglobulinas.

gresar a la vía de las hexosaminas y convertirse en glucosamina 6 fosfato y posteriormente a uridin difosfato N-acetilglucosamina (UDP-glucosamina) por la acción de la enzima glutamina fructosa 6 fosfato amido transferasa (GFAT). La UDP-glucosamina modifica los factores de transcripción por adhesión a los residuos de serina y treonina, generando cambios patológicos en la expresión de genes, tal es el caso del gen del factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) o el gen del inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1), lo que tiene como consecuencia la oclusión capilar y vascular, respectivamente^{9,10,15,20,27} (**figura 1**).

Vía de la proteína cinasa C. La proteína cinasa C (PCC) es una enzima que tiene 11 isoformas que son importantes en la homeostasis vascular.²⁸ En estado de hiperglucemia, la actividad de las isoformas α , β y δ de la PCC aumenta en las células endoteliales de retina y riñón debido a un incremen-

Se han diseñado medicamentos para inhibir la formación de PGA. Entre estos destacan la aminoguanidina y piridoxamina.

Figura 1. Mecanismos involucrados en el daño tisular de DM



to en la concentración de diacilglicerol (DAG). Cuando la PCC es activada, la producción de la óxido nítrico-sintasa endotelial disminuye mientras que el vasoconstrictor endotelial-1 aumenta, provocando alteraciones del flujo sanguíneo.^{29,30}

Cuando la β -PCC está activa, estimula a la fosfolipasa A2, con lo que aumenta la producción de tromboxanos, estos modifican la permeabilidad endotelial y la respuesta a la angiotensina II en el músculo liso vascular. Los cambios en la permeabilidad endotelial y en la respuesta vasoconstrictora a la angiotensina II son de gran importancia en el desarrollo de la retinopatía y la nefropatía diabéticas. La activación de la vía de la PCC también origina un aumento en la síntesis de prostaglandinas (PGI2 y PGE2), sustancias vasodilatadoras involucradas en la hiperfiltración glomerular relacionada con la DM^{30,31} (**figura 1**).

El esquema muestra los cuatro mecanismos de daño tisular: glucosilación de proteínas, formación de productos finales de la glucosilación avanzada (rojo); activación de las vías del sorbitol (azul), de las hexosaminas (café) y de la proteína cinasa C (verde).

IMPLICACIONES TERAPÉUTICAS

Considerando que uno de los principales mecanismos de generación de daño tisular en el paciente diabético es la formación de PGA, se han diseñado medicamentos para inhibir dicho proceso. Entre estos fármacos destacan la aminoguanidina y piridoxamina, que son químicamente más reactivos que el grupo amino de la lisina de las proteínas y compiten con ellas para formar un compuesto no reactivo, impidiendo así la formación de los PGA.³²⁻³⁴ La metformina inhibe la formación de metilglioxal y por lo tanto la formación de PGA. Por otro lado, el esclarecimiento del papel de la PARP en las complicaciones diabéticas, ha impulsado el desarrollo de fármacos para inhibir esta enzima, con lo que se pueden bloquear las diferentes vías de daño activadas por la inactivación de la G3PDH. Se ha demostrado que el tratamiento con inhibidores de PARP previene la lesión estructural de la retinopatía no proliferativa humana.^{15,35}

Otra alternativa son los fármacos que activan a

Además del uso de los antioxidantes clásicos (vitamina E y C; ácido lipoico) para disminuir el EOX, los agentes para control glucémico (metformina, troglitazona y glicazida) también tienen actividad antioxidante, lo que les confiere un elevado potencial terapéutico.

El control sobre los niveles de azúcar en los individuos con DM sigue siendo primordial para impedir o retrasar el desarrollo de las complicaciones crónicas, pues el metabolismo de la glucosa conlleva a mayor producción de O_2^- , que es el desencadenante de las vías de daño sistémico.

la transcetolasa, ya que esta enzima emplea como sustrato al G3P y a la fructosa 6 fosfato, de tal manera que al lograr disminuir la concentración de estos metabolitos se evitará la activación de los mecanismos de daño diabético.⁸ Dada la participación del EOX en las complicaciones diabéticas, resulta de gran importancia un tratamiento antioxidante. Sin embargo, se ha observado que además del uso de los antioxidantes clásicos (vitamina E y C; ácido lipoico) para disminuir el EOX^{13,36-40}, los agentes para control glucémico (metformina, troglitazona y glicazida) también tienen actividad antioxidante, lo que les confiere un elevado potencial terapéutico. Por ejemplo, la metformina incrementa el nivel de glutatión en sangre,^{41,42} la troglitazona inhibe la oxidación de lípidos y ayudan a prevenir la formación de cataratas^{41,43,44} y la glicazida también disminuye la oxidación de lípidos e incrementa la actividad de la SOD en plasma.⁴⁵



Manuel Hernández

CONCLUSIONES

La etiología de las complicaciones en los pacientes diabéticos es multifactorial; sin embargo, es inducible que la sobreproducción de O_2^- , estimulada por la hiperglucemia, activa y unifica los 4 mecanismos involucrados en la fisiopatología de las complicaciones crónicas en la DM. Por ello, la terapéutica empleada en los pacientes diabéticos no sólo debe dirigirse al control glucémico, sino que también es necesario controlar el EOX con agentes antioxidantes, como las vitaminas E y C. Cabe destacar que entre más conocimiento se tiene sobre los mecanismos de daño diabético es posible avanzar más en el desarrollo de fármacos eficaces, como los inhibidores de PARP; no obstante, el control sobre los niveles de azúcar en los individuos con DM sigue siendo primordial para impedir o retrasar el desarrollo de las complicaciones crónicas de la DM, pues el metabolismo de la glucosa conlleva a mayor producción de O_2^- , que es el desencadenante de las vías de daño sistémico. ●

La etiología de las complicaciones en los pacientes diabéticos es multifactorial; sin embargo, la sobreproducción de O_2^- , estimulada por la hiperglucemia, activa y unifica los 4 mecanismos involucrados en la fisiopatología de las complicaciones crónicas en la DM. La terapéutica empleada en los pacientes diabéticos no sólo debe dirigirse al control glucémico, sino que también es necesario controlar el EOX con agentes antioxidantes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aguilar-Salinas CA, Vázquez-Chávez C, Gamboa-Marrufo R, García-Soto N, Ríos-González JJ, Holguín R. Prevalence of obesity, diabetes, hypertension and tobacco consumption in an urban adult mexican population. *Arch Med Res.* 2001;32:446-53.
2. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care.* 2004;27:1047-53.
3. Schering Deb, Kasten Shelia. The Link Between Diabetes and Cardiovascular Disease. *J of Pharm Pract.* 2004;61-5.
4. Hsia C, Raskin P. The diabetic lung: Relevant of alveolar microangiopathy for the use of inhaled insulin. *Am J of Med.* 2005;118:205-11.
5. Acosta Altamirano G, Hernández Rodríguez M, Reyes Montes MR, Parrao Rodríguez CA. Aspectos autoinmunitarios en la diabetes mellitus. *Rev Hosp Jua Mex.* 1999;66:75-84.
6. Zimmer P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature.* 2001;414:782-7.
7. Triana ME. La hiperglicemia y sus efectos tóxicos. Un concepto patogénico para la micro y macroangiopatía diabética. *Rev Cubana Angiol Cir Vasc.* 2001;2:131-41.
8. Green K, Brand MD, Murphy MP. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes.* 2004;53:110-8.
9. Xue-Liang D, Edelstein D, Rossetti L, et al. Hyperglycemia induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *PNAS.* 2000;97:12222-6.
10. Aronson D. Hyperglycemia and the pathobiology of diabetic complications. *Adv Cardiol.* 2008;45:1-16.
11. Haffner SM. Clinical relevance of the oxidative stress concept. *Metabolism.* 2000;49:30-34.

12. Kaneto H, Katakami N, Kawamori D, et al. Involvement of oxidative stress in the pathogenesis of diabetes. *Antiox Redox Signal*. 2007;9:355-366.
13. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol*. 2003;17:24-38.
14. Rolo AP, Palmeira CM. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2006;212:167-78.
15. Brownlee M. The Pathobiology of Diabetic Complications A Unifying Mechanism. *Diabetes*. 2005;54:1615-25.
16. García C, Díaz MT, Morales F. Presencia de las especies reactivas de oxígeno en la diabetes mellitus insulino-dependiente. *Av Diabetol*. 2005;21:145-8.
17. Dorado MC, Rugerio VC, Rivas AS. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Rev Fac Med UNAM*. 2003;46:229-35.
18. Matés JM, Pérez-Gómez C, Núñez CI. Antioxidant enzymes and human disease. *Clin Biochem*. 1999;32:595-603.
19. Chung SS, Ho EC, Lam KS, Chung SK. Contribution of polyol Pathway to Diabetes-Induced Oxidative Stress. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14:S233-S236.
20. Díaz-Flores M, Baiza-Gutman LA, Ibáñez-Hernández MA, et al. Aspectos moleculares del daño tisular inducido por la hiperglucemia crónica. *Gac Med Mex*. 2004;140:437-47.
21. Bonnefont-Rousselot D, Beaudeux JL, Thérond P, Peynet J, Legrand A, Delattre J. Diabetes mellitus, oxidative stress and advanced glycation endproducts. *Ann Pharm Fr*. 2004;62:147-57.
22. Raj DSC, Choudhury D, Welbourne TC, Levi M. Advanced glycation end products: A nephrologist's perspective. *Am J Kidney Dis*. 2000;35:365-80.
23. Shangari D, O'Brien PJ. The cytotoxic mechanism of glyoxal involves stress. *Biochem Pharmacol*. 2004;68:1433-42.
24. Furth AJ. Glycated proteins in diabetes. *Br J Biomed Sci*. 1997;54:192-200.
25. Goh SY, Cooper ME. The Role of Advanced Glycation End Products in Progression and Complications of Diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93:1143-52.
26. Jakuss V, Rietbrock N. Advanced Glycation End-Products and the progress of Diabetic Vascular Complications. *Physiol Research*. 2004;53:131-42.
27. Koim-Litty V, Sauer U, Nerfich A, Lehmann R, Schieicher ED. High glucose induced transforming growth factor beta 1 production is mediated by the hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells. *J Clin Invest*. 1998;101:160-9.
28. Idris I, Gray S, Donnelly R. Protein Kinase C activation: isozyme-specific effect on metabolism and cardiovascular complications in diabetes. *Diabetología*. 2001;44:659-73.
29. Yuan SY, Ustinova EE, Wu MH, et al. Protein kinase C activation contributes to microvascular barrier dysfunction in the heart at early stages of diabetes. *Circ Res*. 2000;87: 412-7.
30. Koya D, King GL. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes*. 1998;47: 859-66.
31. Chibber R, Ben-Mahmud BM, Kohner EM, et al. Protein kinase C beta 2-dependent phosphorylation of core 2 GlcNAc-T promotes leucocyte-endothelial cell adhesion: a mechanism underlying capillary occlusion in diabetic retinopathy. *Diabetes*. 2003;52:1519-27.
32. Edelstein D, Brownlee M. Mechanistic studies of advanced glycosylation end product inhibition by aminoguanidine. *Diabetes*. 1992;41:26-9.
33. Smit AJ, Lutgers HL. The clinical relevance of advanced glycation end products (AGE) and recent development in pharmaceuticals to reduce AGE accumulation. *Curr Med Chem*. 2004;11:2767-84.
34. Stitt A, Gardiner TA, Alderson NL, et al. The AGE inhibitor pyridoxamine inhibits development of retinopathy in experimental diabetes. *Diabetes*. 2002;51:2826-32.
35. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*. 2000;404:787-90.
36. Shultz JJ, Harris AK, Rychly DJ, Ergul A. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: Linking basic science to clinical practice *Cardiovascular Diabetology*. 2005;4:5.
37. Beckman JA, Goldfine AB, Gordon MB, et al. Oral antioxidant therapy improves endothelial function in Type 1 but not Type 2 diabetes mellitus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285:2392-8.
38. Da Ros R, Assaloni R, Ceriello A. Antioxidant therapy in diabetic complications: what is new? *Curr Vasc Pharmacol*. 2004;2:335-41.
39. Evans JL. Antioxidants: Do they have a role in the treatment of insulin resistance?. *Indian J Med Res*. 2007;125: 355-72.
40. Tankova T, Koev D, Dakovska L. Alpha-lipoic acid in the treatment of autonomic diabetic neuropathy (controlled, randomized, open-label study) *Rom J Intern Med*. 2004;42: 457-64.
41. Lida KT, Kawakami Y, Suzuki M, et al. Effect of thiazolidinediones and metformin on LDL oxidation and aortic endothelium relaxation in diabetic GK rats. *Am J Physiol*. 2003;284:1125-30.
42. Giannarelli R, Aragona M, Coppelli A, Del Prato S. Reducing insulin resistance with metformin: the evidence today. *Diabetes Metab*. 2003;29:S28-35.
43. Diamant M, Heine RJ. Thiazolidinediones in type 2 diabetes mellitus: current clinical evidence. *Drugs*. 2003;63: 1373-405.
44. Fukui T, Noma T, Mizushige K, Aki Y, Kimura S, Abe Y. Dietary troglitazone decreases oxidative stress in early stage type II diabetic rats. *Life Sci*. 2000;66:2043-9.
45. Tsubouchi H, Inoguchi T, Inuo M, et al. Sulfonylurea as well as elevated glucose levels stimulate reactive oxygen species production in the pancreatic beta cell line, MIN6- a role of NAD(P)H oxidase in beta-cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;326:60-5.