

Óxido nítrico y estrés oxidativo en la retinopatíadiabética

Nitric oxide and oxidative stress in diabetic retinopathy

María Eliana Hidalgo Lillo,^I María Isabel López Benavides,^{II} Victoria Novik Assael,^{II} Georgina Sánchez Parra,^{III} Leticia Herrera Videla,^{I-III} Ela María Céspedes Miranda^{IV}

^I Facultad de Ciencias. Universidad de Valparaíso. Valparaíso, Chile.

^{II} Facultad de Medicina. Universidad de Valparaíso. Valparaíso, Chile.

^{III} Facultad de Farmacia. Universidad de Valparaíso. Valparaíso, Chile.

^{IV} Facultad de Ciencias Médicas "General Calixto García". Universidad Médica de La Habana. La Habana, Cuba.

RESUMEN

Introducción: el estrés oxidativo está implicado en las complicaciones de la diabetes mellitus, como la retinopatía. En condiciones de hiperglucemia se incrementan los niveles de óxido nítrico y de anión superóxido, y se produce daño irreversible a biomoléculas.

Objetivo: analizar los niveles de óxido nítrico y de indicadores de estrés oxidativo en pacientes diabéticos tipo 1 con retinopatía diabética, herramienta que pudiera ser eficaz en el control de estos pacientes.

Método: se evaluaron los niveles urinarios y plasmáticos de nitritos, nitrotirosina en plasma e indicadores de estrés oxidativo en pacientes diabéticos tipo 1 con y sin retinopatía, procedentes de los hospitales Gustavo Fricke, Naval y Van Buren, en Valparaíso.

Resultados: se observó diferencia en los niveles de nitritos en plasma entre diabéticos con y sin retinopatía, y el grupo control ($117,95 \pm 8,80 \mu\text{mol/L}$; $77,98 \pm 32,65 \mu\text{mol/L}$; $58,72 \pm 13,37 \mu\text{mol/L}$; respectivamente; $p < 0,0001$). La nitrotirosina plasmática es menor en diabéticos sin retinopatía en relación con los que presentan la complicación ($0,76 \pm 1,93$ vs. $2,20 \pm 2,44 \mu\text{mol/L}$; $p = 0,0008$) y es casi imperceptible en el grupo control ($0,02 \pm 0,00 \mu\text{mol/L}$). Una menor actividad de las enzimas superóxidodismutasa y catalasa, así como mayor lipoperoxidación se demostró en pacientes con retinopatía.

Conclusiones: los resultados permiten sugerir que existe una relación entre la formación e inactivación de óxido nítrico con el estrés oxidativo, la retinopatía diabética y probablemente con la patogenia de esta complicación.

Palabras clave: óxido nítrico; estrés oxidativo; diabetes mellitus tipo 1; retinopatía.

ABSTRACT

Introduction: Oxidative stress is involved in diabetes mellitus complications such as retinopathy. In hyperglycemic conditions an increase occurs in nitric oxide and superoxide anion levels, and irreversible damage is caused to biomolecules.

Objective: Analyze the levels of nitric oxide and oxidative stress indicators in type 1 diabetic patients with diabetic retinopathy, a tool potentially effective for the control of these patients.

Methods: Evaluation was conducted of urine and plasma levels of nitrites, plasma nitrotyrosine and oxidative stress indicators in type 1 diabetic patients with and without retinopathy from the hospitals Gustavo Fricke, Naval and Van Buren, in Valparaíso.

Results: A difference was found in plasma nitrite levels between diabetics with and without retinopathy and the control group ($117.95 \pm 8.80 \mu\text{mol/L}$; $77.98 \pm 32.65 \mu\text{mol/L}$; $58.72 \pm 13.37 \mu\text{mol/L}$, respectively; $p < 0.0001$). Plasma nitrotyrosine is lower in diabetics without retinopathy than in those with the complication (0.76 ± 1.93 vs. $2.20 \pm 2.44 \mu\text{mol/L}$; $p = 0.0008$) and it is almost imperceptible in the control group ($0.02 \pm 0.00 \mu\text{mol/L}$). Patients with retinopathy had lower superoxide dismutase and catalase activity and higher lipid peroxidation.

Conclusions: Results suggest a relationship between nitric oxide formation and inactivation and oxidative stress, and diabetic retinopathy and probably the pathogenesis of this complication.

Key words: nitric oxide, oxidative stress, diabetes mellitus type 1, retinopathy.

INTRODUCCIÓN

La retinopatía diabética (RD) constituye una de las complicaciones de la diabetes mellitus. Aproximadamente el 25 % de los pacientes con diabetes mellitus tipo 1 presentan retinopatía a los cinco años de evolución de la enfermedad, y el 80 % después de los diez años de evolución de la enfermedad, siendo la causa más frecuente de ceguera en estos pacientes.¹ Entre las formas clínicas de RD, la RD proliferativa tiene mal pronóstico y se asocia habitualmente con nefropatía, enfermedades cardiovasculares o ambas.²

Resultados del estudio *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT) confirman que la hiperglucemia es un factor importante en el desarrollo de la retinopatía e indican que de lograrse un control metabólico óptimo de la DM, existen menos posibilidades de desarrollo de dicha complicación.²

La hiperglucemia y el estrés oxidativo son eventos importantes en la patogénesis de la RD.¹ La hiperglucemia condiciona la mayor actividad de vías metabólicas que incrementan la producción de especies reactivas oxidantes (ERO), depleción de mecanismos antioxidantes, y el establecimiento de estrés oxidativo (EO), con alteraciones en la estructura y función de los diferentes niveles de organización biológica, y en vías específicas de señalización de la célula que favorecen las complicaciones del diabético.^{1,3,4}

La retina es particularmente susceptible al estrés oxidativo, dado el alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados, la elevada demanda energética y la exposición a la luz.⁵ El EO afecta la función del endotelio, incrementa la permeabilidad vascular y la apoptosis en los pericitos retinales.⁶ En la retina del diabético con retinopatía se observan isquemia y trastornos circulatorios importantes.⁷

El óxido nítrico (NO) interviene en los mecanismos que regulan la circulación retiniana. En estudios clínicos realizados en plasma de pacientes con RD se ha asociado el control metabólico del diabético con el metabolismo del óxido nítrico.⁸ En estudios *in vitro* se ha observado que la hiperglucemia induce la expresión de la óxido nítrico sintasa endotelial y un incremento del anión superóxido en células endoteliales.⁹ En estas condiciones se favorece la producción de peroxinitrito y la inhibición de la acción del NO en el endotelio vascular.

Antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos desempeñan un papel protector en la pared vascular. En este contexto, la administración de antioxidantes a ratas diabéticas disminuyó los efectos deletéreos que se producen en la retinopatía diabética, como la adhesión leucocitaria a las células endoteliales, la permeabilidad vascular, la apoptosis de células retinianas y el engrosamiento de la membrana basal. Se ha sugerido además, que el incremento en la superóxido dismutasa extracelular, una de las enzimas antioxidantes, inhibe la progresión de la RD.¹⁰

En Chile no existen estudios previos sobre los niveles del NO y el estrés oxidativo en la RD. El objetivo del presente estudio es analizar los niveles de NO y de indicadores de estrés oxidativo en pacientes diabéticos tipo 1 con retinopatía diabética, herramienta que pudiera ser eficaz en el control de estos pacientes.

MÉTODOS

De los consultorios de endocrinología de los hospitales Van Buren, Naval y Gustavo Fricke, en Valparaíso, se seleccionaron 41 pacientes diabéticos tipo 1, entre 20 y 40 años de edad y al menos diez años de evolución de la enfermedad, no fumadores, no hipertensos ni portadores de enfermedad tumoral o inflamatoria. Estos pacientes fueron divididos en dos subgrupos: 21 pacientes diabéticos sin retinopatía y 20 pacientes con retinopatía diabética.

El diagnóstico de retinopatía se confirmó mediante oftalmoscopia directa (oftalmoscopio Carl Zeiss), la biomicroscopia del fondo de ojo con el empleo de la lámpara de hendidura marca CSO modelo CL-930, así como la oftalmoscopia indirecta (oftalmoscopio Keeler y lente auxiliar Goldman).

Los pacientes sin medicación de insulina al momento de la evaluación, recolectaron la orina de 24 horas previas al estudio. Se seleccionaron además 21 personas sanas (grupo control). Pacientes y personas sanas dieron consentimiento por escrito para

participar en el estudio, siendo aprobado por el Comité de Ética de las instituciones involucradas.

Procedimientos analíticos

La glucemia se determinó por el método enzimático-colorimétrico de glucosa oxidasa,¹¹ la hemoglobina glicada (HbA_{1c}) por un método de separación de las hemoglobinas rápidas por medio de cromatografía de intercambio iónico (Human)¹² y la creatinina según Slot, basado en el método de *Jaffé*.¹³

Determinación de indicadores asociados al estrés oxidativo

Se determinaron los indicadores nitritos, nitrotirosina, lipoperoxidación, grupos carbonilo, capacidad antioxidante total y actividad de enzimas antioxidantes catalasa (CAT) y superóxido dismutasa extracelular (SOD). La determinación de nitritos se realizó mediante el reactivo de *Griess*.¹⁴ Los niveles de nitritos en orina fueron normalizados a través de la determinación de creatinina en orina. Para la cuantificación de nitrotirosina se utilizó un ELISA (Nitrotyrosine Elisa test kit, Cat #: HK 501. Lt #: 3519K16, Size: 2x96 assays. HyCult Biotechnology). La lipoperoxidación se realizó mediante la determinación de productos reactivos al ácido tiobarbitúrico (TBARS),¹⁵ y la determinación de carbonilos según *Levin* y otros.⁶ La actividad de las enzimas CAT y SOD se realizaron siguiendo la cinética de descomposición de peróxido de hidrógeno y la de formación de citocromo reducido en presencia del sistema xantina-xantina oxidasa, respectivamente.^{17,18} La capacidad antioxidante total se determinó según *Romay* y otros,¹⁹ y la concentración de proteínas mediante el método de *Lowry*.²⁰

Análisis estadístico

De los datos se utilizó el programa *Statistica*. Se estimó la diferencia entre los grupos mediante estadística no paramétrica que incluyó análisis de varianza de Kruskal-Wallis para muestras independientes, con el fin de verificar diferencias entre grupos. Se consideraron diferencias significativas cuando $p < 0,05$.

RESULTADOS

DETERMINACIÓN DE NITRATOS-NITRITOS PLASMÁTICOS Y URINARIOS

Como se observa en la tabla, la concentración de nitratos y nitritos plasmáticos fue diferente entre los tres grupos de estudio, siendo mayor en los diabéticos con retinopatía, en relación con el grupo control y con el grupo de diabéticos sin retinopatía ($p < 0,0001$). En orina, no se demuestran diferencias significativas ($p = 0,6885$); no obstante en diabéticos con retinopatía, las concentraciones de nitritos y nitratos tienden a ser mayores.

Tabla. Concentraciones de nitratos-nitritos plasmáticas y urinarias

		Control	DM-1	DM-1R
Nitritos-nitratos plasmáticos (µmol/L)	Media	58,72	77,98	117,95*
	Desviación estándar	13,37	32,65	38,80
Nitritos-nitratos urinarios (µmol/L)	Media	165,48	168,37	301,63
	Desviación estándar	140,64	101,72	434,41

DM-1: diabetes mellitus tipo 1; DM-1R: diabetes mellitus tipo 1 con retinopatía; * $p < 0,0001$.

DETERMINACIÓN DE NITROTIROSINA EN PLASMA

En las personas del grupo control, la nitrotirosina es prácticamente indetectable. Sin embargo, la concentración de nitrotirosina en diabéticos con retinopatía resultó ser mayor que en el grupo sin esta complicación ($p = 0,0008$), resultado que se expresa en el análisis de la relación nitrotirosina/nitritos que se representa en la figura 1.

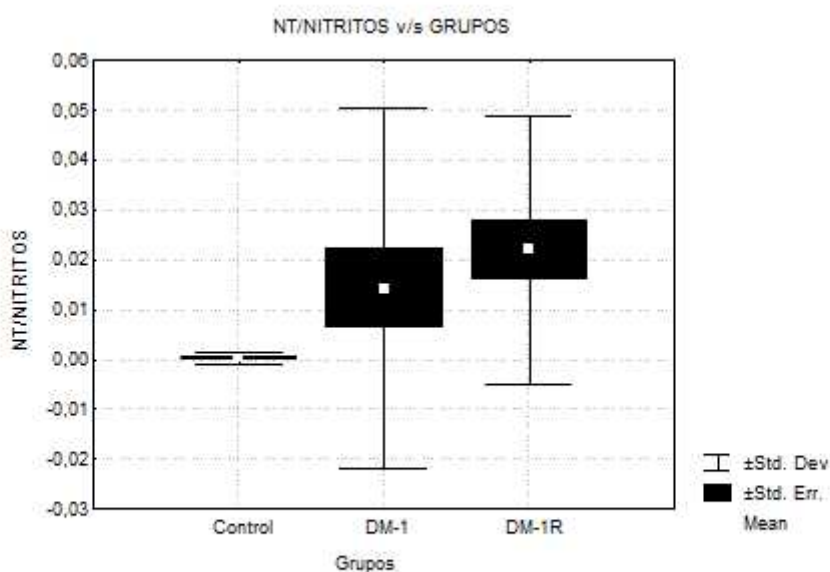


Fig. 1. Nitrotirosina/Nitritos para cada grupo: Control, diabetes mellitus sin retinopatía y diabetes mellitus con retinopatía. (DM-1: diabetes mellitus tipo 1, no retinopatía; DM-1R: diabetes mellitus con retinopatía).

DAÑO A LÍPIDOS (ESPECIES REACTIVAS AL ÁCIDO TIOBARBITÚRICO) Y A PROTEÍNAS (GRUPOS CARBONILO).

La mayor concentración de TBARS se verifica en los diabéticos con retinopatía (Fig. 2), mientras que en relación con la concentración de grupos carbonilo no se observan diferencias significativas entre los grupos ($p = 0,0666$; Fig.3), aunque en el grupo control se encontró la concentración más baja.

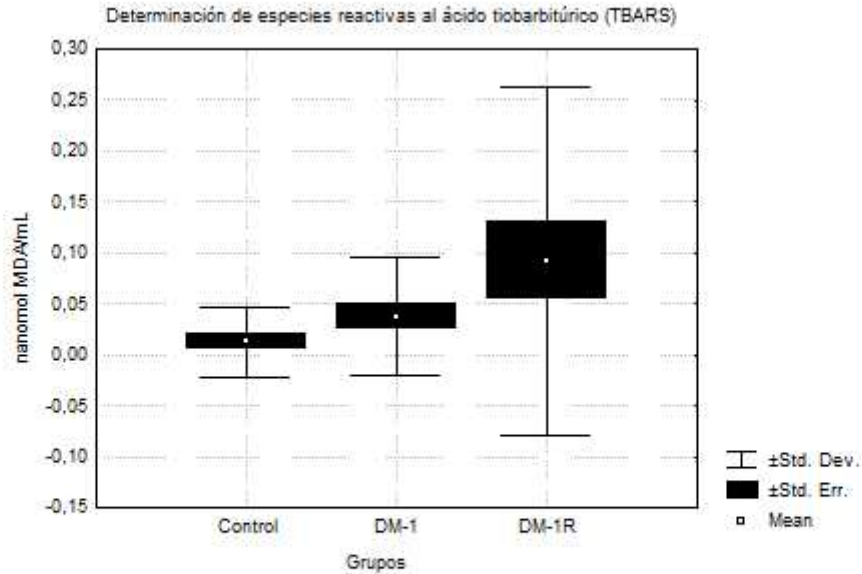


Fig. 2. Determinación de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico en los grupos de estudio. (DM-1: diabetes mellitus tipo 1, no retinopatía; DM-1R: diabetes mellitus con retinopatía).

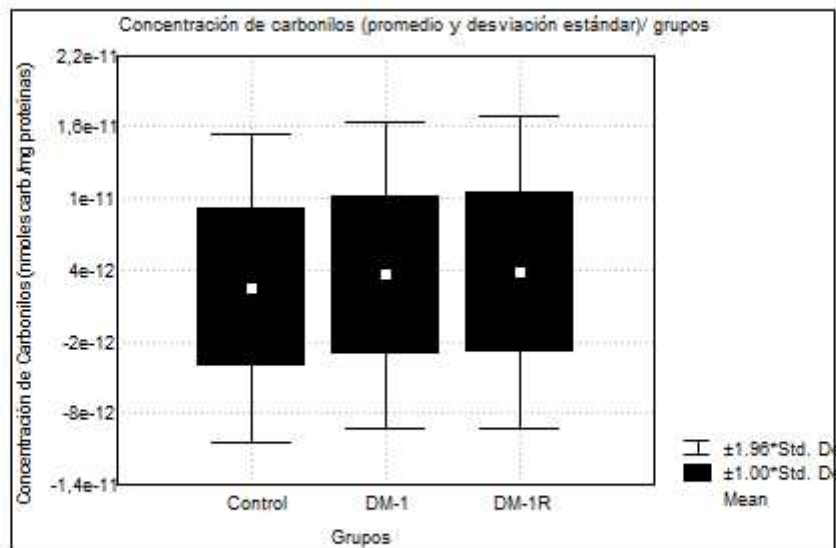


Fig. 3. Concentración de carbonilo en grupos control, diabéticos sin y con retinopatía. (DM-1: diabetes mellitus tipo 1, no retinopatía; DM-1R: diabetes mellitus con retinopatía).

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA SUPERÓXIDO DISMUTASA

La actividad de la enzima SOD, no fue diferente entre los grupos ($p= 0,2884$), aunque se observa una tendencia a menor actividad en pacientes con retinopatía diabética (Fig. 4).

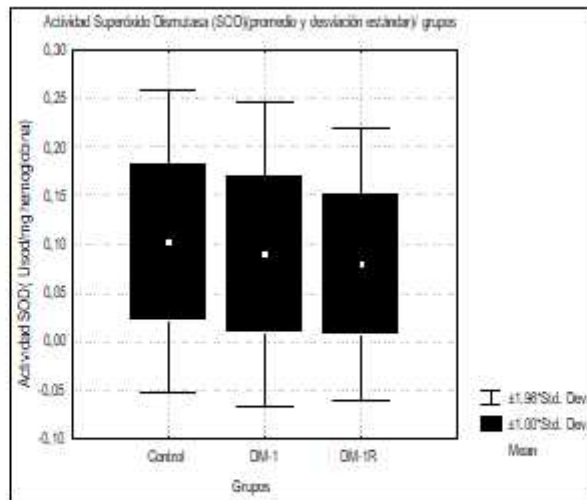


Fig 4. Actividad superóxido dismutasa en controles, diabéticos y diabéticos con retinopatía. (DM-1: diabetes mellitus tipo 1, no retinopatía; DM-1R: diabetes mellitus con retinopatía).

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA CATALASA

En la figura 5 se observa un incremento significativo en la actividad de la catalasa en los pacientes diabéticos tipo 1 sin retinopatía, pero en presencia de retinopatía la actividad de esta enzima disminuye (test ANOVA y test de Fisher; $p < 0,05$).

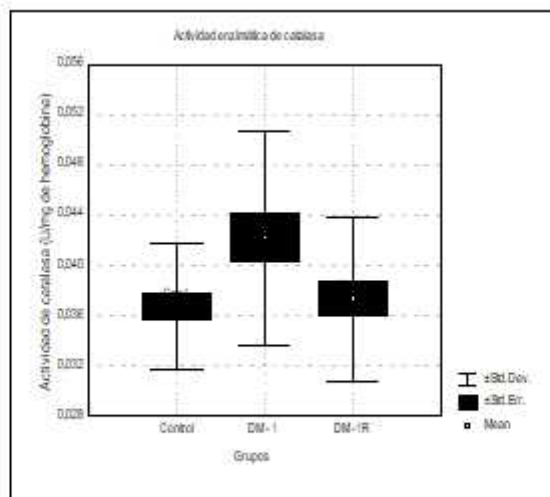


Fig 5. Actividad catalasa en controles, diabéticos y diabéticos con retinopatía. (DM-1: diabetes mellitus tipo 1, no retinopatía; DM-1R: diabetes mellitus con retinopatía).

CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL EN PLASMA SANGUÍNEO (TRAP)

Los resultados del test ANOVA no permiten verificar diferencias entre los grupos en estudio (Fig. 6). No obstante, se encontró una tendencia al incremento en el grupo con retinopatía en comparación al resto de los grupos.

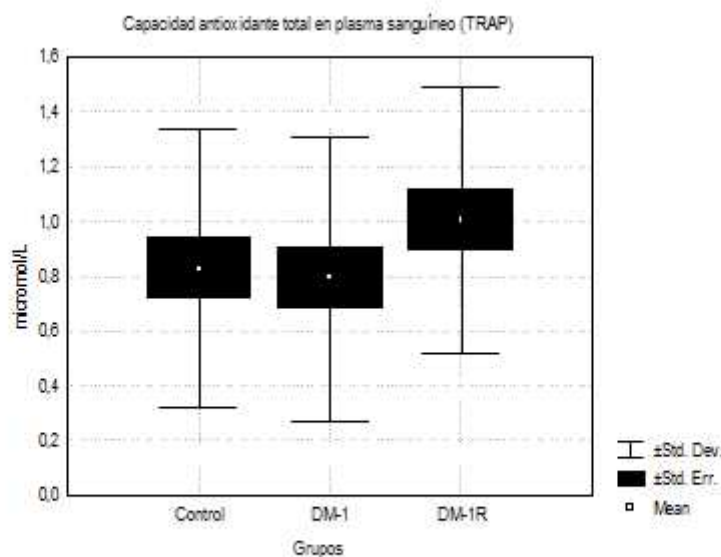


Fig. 6. Capacidad antioxidante total en plasma sanguíneo en los diferentes grupos de estudio.

DISCUSIÓN

El óxido nítrico interviene en el control del tono vasomotor, la angiogénesis y la permeabilidad vascular. La mayor concentración de nitritos y nitratos en los pacientes diabéticos con retinopatía indica una posible relación entre la producción de NO y las complicaciones a nivel de microcirculación en estos pacientes. Se ha documentado que un aumento en las concentraciones sanguíneas de glucosa eleva los niveles de NO, tanto en animales, como en pacientes con diabetes tipo 1 con reciente diagnóstico.²¹ Este aumento se ha vinculado con el requerimiento de dosis de insulina y con la activación de la óxido nítrico sintasa inducible, activación en particular en las células fotorreceptoras.²² La expresión de esta enzima es mediada por el factor nuclear- κ B, el cual se incrementa en estados de hiperglucemia y es relevante en la degeneración vascular que se presenta en la retinopatía diabética.^{1,9,23}

Los resultados del presente estudio concuerdan con los de *Maejima* y otros, quienes demostraron que la concentración de nitratos y nitritos en diabéticos tipo 2 fue superior a la del grupo control. En este mismo estudio se evaluaron estos niveles en diabéticos con distintas complicaciones microvasculares, resultando mayores en pacientes que presentaban distintos grados de retinopatía y neuropatía.²⁴ *Sharma* y colaboradores también cuantificaron NO en diabéticos tipo 2 y encontraron asociación con la severidad de la retinopatía.⁵ En el estudio de *Rodríguez* los niveles de nitritos y nitratos se incrementaron con la severidad de la RD.²⁵ *Izumi* reportó un incremento en NO en pacientes diabéticos con y sin RD en comparación con personas saludables.²⁶

Las determinaciones de nitratos y nitritos en orina son mayores que en plasma debido probablemente, a que en la orina se suma un porcentaje de formación de NO a nivel renal. Se ha descrito que en diabéticos con neuropatías recientes se produce un aumento excesivo en la producción de NO, por sobre la del anión superóxido, lo que contribuye a favorecer la vasodilatación a nivel renal.²¹

La relación entre el aumento en la formación de NO y su desactivación oxidativa se expresó por medio de la proporción de las concentraciones plasmáticas de nitrotirosina/nitratos y nitritos (NT/NO). El análisis revela un aumento en pacientes diabéticos tipo 1, el cual se hace más evidente en presencia de retinopatía (Fig. 1).

El incremento en la formación de NO favorece su oxidación en presencia de anión superóxido, con la formación de peroxinitrito. Esta afirmación se evidencia con la cuantificación de nitrotirosina, marcador que está incrementado en diabéticos con retinopatía, condición que genera un compromiso microvascular. Resultado similar se reporta en el estudio de *Ruía* y colaboradores.⁶ En este contexto, los marcadores de concentración de NO y nitrotirosina resultan ser indicativos de daño oxidativo.

Los niveles elevados de lipoperoxidación en los pacientes diabéticos con presencia de RD, evidencian la existencia de una mayor peroxidación lipídica en esta complicación de la diabetes. Esto puede explicarse porque dicha lipoperoxidación es la consecuencia de la formación de especies reactivas a expensas de una hiperglucemia mantenida o en episodios bruscos presente en el paciente diabético. El incremento de la lipoperoxidación en los pacientes con DM tipo 1 con RD en relación con diabéticos sin retinopatía, sugiere que las especies reactivas del oxígeno desempeñan una función importante como factor desencadenante y agravante de la RD, potenciado por el tiempo de evolución de la diabetes.

El incremento en las especies reactivas es el nexo entre la hiperglucemia y las complicaciones del diabético debido a la modificación en vías metabólicas, entre las que se encuentran la activación de la vía del poliol, la formación del diacilglicerol y el fosfatidilinositol por activación de la proteína quinasa C, la formación de productos terminales de glicación avanzada y la disfunción mitocondrial.⁶ De hecho, las ERO incrementan la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular en retina y en consecuencia, se incrementa la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa.²⁷

Los resultados que se presentan son similares a los documentados por otros autores. Incremento en los niveles de TBARS atendiendo a la severidad de la retinopatía diabética es uno de los hallazgos referido por los grupos de *Rodríguez* y otros. En el estudio de *Ruía* con 40 diabéticos con retinopatía se demostró un incremento de la peroxidación con la evolución de la complicación.^{6,25}

Altas concentraciones de productos de la peroxidación lipídica y de peroxinitrito se han encontrado en pacientes diabéticos con retinopatía en relación con aquellos pacientes diabéticos sin complicación angiopática.^{6,28}

De acuerdo a los resultados obtenidos sobre daño a proteínas se observa una tendencia al aumento en pacientes con retinopatía diabética. Especies reactivas y productos finales de la peroxidación lipídica pueden producir daño a proteínas, lo que compromete la función metabólica, en la que intervienen enzimas.

Las enzimas antioxidantes son diana de las especies reactivas, lo que hace pensar en una menor actividad de las enzimas antioxidantes en diabéticos con retinopatía, como se observa en la tendencia a la disminución en la actividad SOD y la disminución en la actividad CAT en los diabéticos complicados. Una disminución de la actividad de SOD puede estar relacionada con un aumento en la concentración de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), proveniente de la autooxidación de la glucosa y favorecida por una baja actividad de la enzima catalasa. El H_2O_2 inhibe a la superóxido dismutasa, cuyo sustrato es el anión superóxido. El incremento en este anión trae como consecuencia la formación de otras especies reactivas, como el peroxinitrito.⁶ Bajo estas condiciones es ineficaz el mecanismo antioxidante endógeno en estos pacientes diabéticos. Este resultado difiere del que se reporta por *Rodríguez* y otros, quienes encuentran que la

actividad catalasa en eritrocitos está incrementada en la RD, probablemente como respuesta compensatoria ante el incremento en las ERO en diabéticos tipo 2.²⁵

El aumento significativo en la actividad catalasa en los pacientes diabéticos tipo 1 sin retinopatía está en correspondencia con la menor lipoperoxidación en estos pacientes y la respuesta antioxidante que se produce ante un incremento en las especies reactivas.

La valoración de las defensas antioxidantes no enzimáticas del organismo se realizó mediante la técnica TRAP. A pesar de que los resultados no difieren entre los grupos, el valor mayor se encontró en el grupo con retinopatía en comparación al resto de los grupos. Los mecanismos de defensa antioxidante del plasma parecen responder a las necesidades metabólicas en consecuencia con los cambios fisiopatológicos. Sin embargo, *Rodríguez* y otros encontraron disminución en la capacidad antioxidante total asociada a la severidad de la RD.²⁵

CONSIDERACIONES FINALES

Teniendo en cuenta los resultados que se presentan se confirma que existe una relación entre la formación e inactivación de NO con el estrés oxidativo y la retinopatía diabética. Los marcadores de concentración de NO y nitrotirosina así como de lipoperoxidación, indicativos de daño oxidativo, pueden influir en la progresión de complicaciones como la retinopatía en pacientes con diabetes mellitus tipo 1 y podrían ser indicadores efectivos de diagnóstico precoz de daño microvascular.

A la memoria de nuestro estimado colega *Dr. Ernesto Fernández B.*

Agradecimientos

Al Dr. Manuel Ayra, cuyo trabajo sirvió de inspiración y al Dr. Enrique Cabrera Vicencio, por su asesoría estadística.

Apoyo financiero

Laboratorios Radicales Libres, Universidad de Valparaíso. Esta institución no tuvo influencia en el diseño del estudio, recolección, análisis o interpretación de los datos, ni en la preparación, revisión o preparación del manuscrito.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no hay conflicto de intereses.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wu Y, Tang L, Chen B. Oxidative stress: Implications for the development of diabetic retinopathy and antioxidant therapeutic perspectives. Hindawi Publishing Corporation. *Oxid Med Cell Long*. 2014 [citado 12 Jun 2016]:12. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/752387>.
2. Brownlee M, Aiello LP, Cooper ME, Vinik AI, Plutzky J, Boulton AJM, et al. Complications of Diabetes Mellitus. In: Williams Textbook of Endocrinology (Thirteenth Edition). 2016 [citado 12 Jun 2016]:1484-581. Disponible en: doi:10.1016/B978-0-323-29738-7.00033-2 .
3. Roig M, Lleó A, Zanón V, Vivar B, Marín J, Dolz R, et al. Enhanced oxidative stress and other potential biomarkers for retinopathy in type 2 diabetics: Beneficial effects of the nutraceutical supplements. Hindawi Publishing Corporation. *BioMed Res Int*. 2015 [citado 12 Jun 2016]:1484-581. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/408180>.
4. Davies KJA. The oxygen paradox, oxidative stress, and ageing. *Arch Biochem Biophys*. 2016;595:28-32.
5. Sharma S, Saxena S, Srivastav K, Shukla RK, Mishra N, Meyer CH, et al. Nitric oxide and oxidative stress is associated with severity of diabetic retinopathy and retinal structural alterations. *Clin Exp Opth*. 2015;43:429-36.
6. Ruia S, Saxena S, Prasad S, Sharma SR, Akduman L, Khanna VK, et al. Correlation of biomarkers thiobarbituric acid reactive substance, nitric oxide and central subfield and cube average thickness in diabetic retinopathy: a cross-sectional study. *Int J Retin Vit*. 2016;2:8.
7. Carmo A, Cunha-Vaz JG, Carvalho AP. Nitric oxide synthase activity in retinas from non-insulin-dependent diabetic GOTO-Kakizaki rat: correlation with blood-retinal barrier. *Nitric Oxide*. 2000;4(6):590-6.
8. Kumar S, Trivedi A, Verma N, Panwar A, Kumar P. Evaluation of the serum levels of nitric oxide among diabetic patients and its correlation with lipid profile as well as oxidative stress in north indian setting. *J Clin Diag Res*. 2016;10(5):OC44-7.
9. Ha JM, Jin SY, Lee HS, Shin HK, Lee DH, Song SH, et al. Regulation of retinal angiogenesis by endothelial nitric oxide synthase signaling pathway. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2016;20(5):533-8.
10. Yasuda H, Ohashi A, Nishida S, Kamiya T, Suwa T, Hara H, et al. Exendin-4 induces extracellular-superoxide dismutase through histone H3 acetylation in human retinal endothelial cells. *J Clin Biochem Nutr*. 2016;59(3):174-81.
11. Trinder P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with alternative oxygen acceptor. *Ann Clin Biochem*. 1969;6:24-7.
12. Yatscuff R, Tevaarwerk G, Clarsin C. An affinity procedure for the determination of HbA_{1c}. *Clin Chem*. 1983;29:1223.

13. Slot C. Plasma creatinine determination. A new and specific Jaffe reaction method. Scand J Clin Lab Invest. 1965;17:381-7.
14. Grand F, Guitton J, Goudable J. Optimisation des paramètres du dosage des nitrites et nitrates sériques par la technique de Griess. Annal Biol Clin. 2001;59:559-65.
15. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. Methods Enzymol. 1990;186:407-21.
16. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified protein. Methods Enzymol. 1990;186:464-78.
17. Aebi H. Catalase *in vitro*. Methods Enzymol. 1984;105:121-6.
18. Chambers DE, Parks DA, Patterson G, Roy R, McCord JM, Yoshida S, et al. Xanthine oxidase as a source of free radical damage in myocardial ischemia. J Mol Cell Cardiol. 1985;17(2):145-52.
19. Romay C, Pascual C, Lissi EA. The reaction between ABTS radical cation and antioxidants and its use to evaluate the antioxidant status of serum samples. Braz J Med Biol. 1996;29:175-83.
20. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951;193:265-75.
21. Chiarelli F, Cipollone F, Romano F, Tumini S, Costantini F, Diricco L, et al. Increased circulating nitric oxide in young patients with type 1 diabetes and persistent microalbuminuria. Diabetes. 2000;49:1258-63.
22. Du Y, Veenstra A, Palczewski K, Kern TS. Photoreceptor cells are major contributors to diabetes-induced oxidative stress and local inflammation in the retina. PNAS. 2013;110(41):16586-91.
23. Roy S, Kern TS, Song B, Stuebe C. Mechanistic insights into pathological changes in the diabetic retina: Implications for targeting diabetic retinopathy. Am J Pathol. 2016 Nov 12 [citado 12 Jun 2016];S0002-9440(16):30413-8. Disponible en: doi: 10.1016/j.ajpath.2016.08.022.
24. Maejima K, Nakano S, Himeno M, Tsuda S, Makiishi H, Ito T, et al. Increased basal levels of plasma nitric oxide in type 2 diabetic subjects relationship to microvascular complications. J Diab Complic. 2001;15:135-43.
25. Rodríguez AD, Castellanos JA, Martínez EC, Miller G, Villa D, Hernández PP, et al. Oxidants, antioxidants and mitochondrial function in non-proliferative diabetic retinopathy. J Diab. 2014;6:167-75. doi: 10.1111/1753-0407.12076.

26. Izumi N, Nagaoka T, Mori F, Sato E, Takahashi A, Yoshida A, et al. Relationbetween plasma nitric oxide levels and diabetic retinopathy. Jpn J Ophthalmol. 2006;50(5):465-8.

27. Takeda M, Mori F, Yoshida A, Takamiya A, Nakagomi S, Sato E, et al. Constitutive nitric oxide synthase is associated with retinal vascular permeability in early diabetic rats. Diabetologia. 2001;44:1043-50.

28. Gurler B, Vural H, Yilmaz N, Oguz H, Satıcı A, Aksoy N, et al. The role of oxidative stress in diabetic retinopathy. Eye. 2000;14:730-5.

Recibido: 6 de marzo de 2017.

Aprobado: 7 de abril de 2017.

María Eliana Hidalgo Lillo. Facultad de Ciencias. Universidad de Valparaíso. Chile.
Correo electrónico: mhidalgolillo@gmail.com