

Reconocimiento a la trayectoria del Prof. Emérito Dr. Rodolfo R. Brenner

Biomarcadores emergentes para diferentes patologías humanas*

Emerging biomarkers for different human pathologies

Biomarcadores emergentes para diferentes doenças humanas

► Carlos Alberto Marra¹, María Josefa Tacconi de Alaniz²

¹ Dr. en Bioquímica Clínica, Investigador Independiente CONICET-CCT-La Plata-INIBIOLP, Profesor Adjunto full-time, y Docente-Investigador Prog. Incentivos, Ministerio de Educación de la Nación (Categoría I). Cátedra Bioqca. y Biol. Molec. Fac. Cs. Médicas, UNLP.

² Dra. en Medicina, Investigadora Principal CONICET-CCT-La Plata, Asesora Docente y Docente-Investigador Prog. Incentivos, Ministerio de Educación de la Nación (Categoría I) Cátedra Bioqca. y Biol. Molec. Fac. Cs. Médicas, UNLP.

* INIBIOLP (Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata), CCT- La Plata, CONICET-UNLP, Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata, 60 y 120 (1900) La Plata, Argentina.

Resumen

El objetivo de esta actualización fue revisar los hallazgos concernientes a la posible utilidad clínica de nuevos biomarcadores de estrés oxidativo-nitrosativo, especialmente aquellos derivados del metabolismo lipídico, como herramientas a implementar en el diagnóstico diferencial, la prognosis, el riesgo o la evaluación de estrategias terapéuticas, en enfermedades crónicas de tipo degenerativo. Se analizó la información disponible sobre el uso de marcadores emergentes en casos de infertilidad masculina por varicocele, pacientes con neurodegeneración debida a mal de Alzheimer, de Parkinson, o demencias de origen vascular, enfermos con cáncer de pulmón, próstata o mama, diabéticos tipo 2 y personas expuestas a agroquímicos en forma profesional. Como conclusión surge la posibilidad de implementar muchos de estos biomarcadores en el laboratorio bioquímico-clínico con promisoría y confiable utilidad en varias de estas situaciones patológicas, considerando que la mayoría de ellos se pueden determinar con relativa baja dificultad y requieren muestras obtenibles por métodos no invasivos o mínimamente invasivos.

Palabras clave: biomarcadores * lípidos * diabetes * cáncer * pesticidas * estrés oxidativo * varicocele

Summary

This review aimed to analyze the possible clinical utility of various oxidative-nitrosative stress biomarkers, mostly derived from lipid metabolism, as a tool to be implemented in the differential diagnosis, prognosis, risk assessment, or the evaluation of the therapeutical strategies for chronic illnesses of the degenerative type. The available information concerning the utility of the biomarkers on male infertility due to varicocele, neurodegenerative disease such as Alzheimer, Parkinson or vascular dementia, prostate, lung and breast cancer, professional sprayers exposed to agrochemicals or type 2 diabetes patients was discussed. The main conclusion is that many of these emerging biomarkers could be implemented in clinica /biochemical analyses of human samples due to the fact that they can be obtained from non-invasive or minimal-invasive procedures and are easily determined.

Key words: biomarkers * lipids * diabetes * cancer * pesticides * oxidative stress * varicocele

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

ISSN 1851-6114 en línea

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

Resumo

O objetivo desta atualização é rever os achados sobre a possível utilidade clínica de novos biomarcadores de estresse oxidativo-nitrosativo, especialmente aqueles derivados de metabolismo lipídico, como ferramentas para implementar no diagnóstico diferencial, prognose, risco, ou avaliação de estratégias terapêuticas, em doenças crônicas de tipo degenerativo. Foi analisada a informação disponível sobre o uso de marcadores emergentes em casos de infertilidade masculina por varicocele, pacientes com neurodegeneração devida à doença de Alzheimer, de Parkinson ou demência de origem vascular, pacientes com câncer do pulmão, próstata ou mama, diabéticos tipo 2 e pessoas expostas a produtos agroquímicos devido a sua profissão. Como conclusão surge a possibilidade de implementar muitos destes biomarcadores no laboratório bioquímico-clínico com promissora e confiável utilidade em várias dessas situações patológicas, considerando-se que a maior parte deles pode ser determinada com relativa baixa dificuldade e requerem amostras obtidas através de métodos não invasivos ou minimamente invasivos.

Palavras-chave: biomarcadores * lipídios * diabetes * câncer * pesticidas * estresse oxidativo * varicocele

ABREVIATURAS

AD: mal de Alzheimer	LDL: lipoproteína de baja densidad
AGEs: productos avanzados de glicosilación	MMSE: <i>mini-mental state examination test</i>
BEON: biomarcadores de estrés oxidativo-nitrosativo	MTs: metalotioneínas
BL: muestra benigna	NCM: número de metástasis confirmadas
BMI: índice de masa corporal	NEO: muestra maligna (neoplásica)
C: muestra de tejido control	OPs: organofosforados
CEA / CA: variantes del antígeno carcinoembrionario	Ox-LDL: lipoproteína de baja densidad peroxidada
c-GLC: cromatografía gas-líquido capilar computarizada	PCR: proteína C reactiva
C-HDL: colesterol de las lipoproteínas de alta densidad	PCs: carbonilos proteicos
CNCC: cobre no complejo a ceruloplasmina	PD: mal de Parkinson
CRP: ceruloplasmina	PET: tomografía de emisión positrónica
DM2: diabetes <i>mellitus</i> tipo 2	PSA: antígeno prostático específico
Fib: fibrinógeno	RENIS: Registro Nacional de Investigaciones en Salud
FNT- α : factor de necrosis tumoral alfa	RMN: resonancia magnética nuclear
FRAP: habilidad reductora del ión férrico plasmática	RNS: sustancias reactivas derivadas del nitrógeno
Hb A1c: hemoglobina del tipo (glicosilada) A1c	ROS: sustancias reactivas derivadas del oxígeno
HO: hipoglucemiantes orales	SISA: Sistema Integral de Información Sanitaria
HOMA: <i>homeostasis model assessment</i>	SNC: sistema nervioso central
HP-TLC: cromatografía planar de alta resolución	TAC: tomografía axial computarizada
I: insulina	TBARS: sustancias reactivas al tiobarbiturato
IL: interleuquinas	VCAM-1: factor vascular de adhesión plaquetaria tipo 1
IL-6: interleuquina 6	VD: demencia de origen vascular
	vWF: factor von Willebrand

Introducción

La revolución acaecida en los recursos preventivos y paliativos de la Medicina contemporánea a nivel global ha determinado un significativo incremento de la expectativa de vida que no siempre estuvo acompañado de un mejoramiento consecuente en la calidad de vida. Esto último se ha hecho mucho más notable en países no desarrollados o en vías de desarrollo en donde si bien se vive más tiempo, se ha visto un notable incremento de la incidencia y de la prevalencia de enfermedades concomitantes. Argentina no escapa a esta cuestión y se desprende de los datos aportados por el

Registro Nacional de Investigaciones en Salud (RENIS) dependiente del Sistema Integral de Información Sanitaria (SISA), ambos del Ministerio de Salud de la Nación (<https://sisa.msal.gov.ar/sisa/#sisa>), que la población argentina sigue las tendencias de muchos otros países en vías de desarrollo en cuanto al aumento de las enfermedades degenerativas (especialmente el cáncer y las neurodegenerativas, tales como Parkinson, Alzheimer y demencias de origen vascular) además de tener significativos incrementos en diabetes tipo 2 (DM2), dislipemias, obesidad mórbida, cáncer, enfermedades cardiovasculares, e infertilidad masculina entre otros. Las causas de estos incrementos en incidencia/preva-

lencia no están del todo claras, pero se acepta en términos generales que hay presiones de tipo epigenético, de interacción del genoma con el entorno, que determinan la progresión de las dolencias en oposición a los recursos implementados en su contra. Factores ambientales tales como polucionantes, aditivos alimentarios, perversiones del gusto, desnutrición, y hábitos de vida en general, concurren para ejercer un efecto deletéreo sobre la mayor posibilidad de vivir en detrimento de la calidad de los años agregados. Esta situación se ve potenciada, además, por el hecho que no siempre los recursos de sanidad pública están disponibles, ni existe (en caso de haberlos) una transferencia inmediata de los mismos hacia la comunidad en general. Dentro de este escenario, se viene desarrollando en todo el mundo un esfuerzo deliberado por hallar metodologías que permitan una implementación - a nivel masivo y asistencial - más eficiente de las estrategias en medicina preventiva, paliativa, o curativa (sea cual fuere el nivel de vigencia de las mismas en cada uno de los contextos sociales que integran la comunidad) mediante el empleo de marcadores de aparición, progresión de daño, eficacia terapéutica y curso clínico, que en su conjunto se denominan "biomarcadores de riesgo" aunque muchas veces esta denominación sea engañosa ya que se trataría más bien de marcadores de daño ya establecido, de eficacia paliativa/curativa, y/o de pronosis.

En los últimos años un grupo de investigadores pertenecientes al Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP) ha desarrollado una serie de estudios tendientes a la utilización de diferentes técnicas bioquímicas como marcadores de patologías de interés comunitario. La línea de investigación se enfocó a la evaluación de estos biomarcadores con probable utilidad en el pronóstico y/o seguimiento de la progresión clínica de las enfermedades, determinantes de la calidad de vida durante la evolución de la patología, o indicadores evaluativos de las estrategias terapéuticas implementadas. Los principales aportes se resumen seguidamente.

Estudio de la composición de ácidos grasos de plasmalógenos de etanolamina como biomarcadores de malignidad y capacidad metastizante de cánceres humanos

En el año 2008 Smith *et al.* (1) investigaron la utilidad de un marcador lipídico derivado de los éter-lípidos que contienen etanolamina y lo compararon con otros biomarcadores usualmente empleados en la práctica clínica para el diagnóstico y seguimiento de neoplasias de mama, pulmón y próstata, las tres formas de cáncer prevalentes en la población argentina. Se proyectó la

realización de este estudio considerando que los antígenos tumorales utilizados usualmente se hallan seriamente limitados por su sensibilidad y especificidad. A la fecha no se ha encontrado un marcador que sea a la vez confiable, específico, y sensible como para utilizarlo en el diagnóstico del cáncer y menos aún para el seguimiento de su progresión o de su capacidad metastizante, o ambas (2-9).

Con ese propósito se analizaron 677 biopsias de tejidos neoplásicos humanos (mama, pulmón y próstata) obtenidos por acto quirúrgico o mediante biopsias por aguja bajo control por imagen. Cada muestra maligna se dividió en dos porciones que se emplearon para estudio histopatológico y aislamiento de lípidos complejos derivados de colina y etanolamina. Mediante cromatografía planar de alta resolución (HP-TLC) se purificó la fracción de plasmalógenos de etanolamina cuya composición en ácidos grasos de cadena larga se cuantificó mediante cromatografía capilar gas-líquido computarizada (c-GLC). Cada muestra patológica se clasificó histológicamente como benigna (BL) o maligna (NEO) del tipo correspondiente, y todos los resultados se compararon con tejido sano cercano a la lesión (C) obtenido del mismo paciente portador del tumor. También se determinaron marcadores usuales para cada tipo de neoplasia y número de metástasis confirmadas (NCM) mediante estudios complementarios de diversos tipos, fundamentalmente TAC, RMN, PET y captación isotópica/densitometría diferencial.

Los resultados se compararon con mezclas de numerosas muestras normales (*pools* de control), o por medio del promedio del porcentaje de cambios con respecto a la composición observada en los tejidos normales del mismo paciente empleando un diseño del tipo caso-control. Se demostró que el contenido de ácidos grasos monoenoicos fue significativamente más alto en los glicerolípidos aislados de muestras patológicas respecto del tejido sano, ya sea comparando los datos contra la mezcla de tejidos control de referencia o respecto del dato correspondiente al tejido sano del mismo paciente. Este parámetro fue especialmente elevado en los plasmalógenos de etanolamina de los tejidos NEO en comparación con los C, teniendo las muestras clasificadas como BL un nivel intermedio entre ambos. El cociente ácidos monoenoicos/saturados en la fracción plasmalógenos de etanolamina tuvo un índice de sensibilidad y especificidad equivalente a los de otros marcadores convencionales, sin embargo, sus valores predictivos de falsa positividad o negatividad fueron mucho más altos. También fue mayor la correlación lineal ($0,96 < r^2 < 0,98$) entre el nivel de este marcador y el NCM, cosa que no es posible establecer con marcadores convencionales como el antígeno prostático específico (PSA), o los antígenos carcinoembrionario (CEA y CA) del tipo 125, 15.3, 19.9 y 27.9, determinados concomitantemente (4) (7). Es más, en algunos casos los

marcadores convencionales disminuyeron, en lugar de aumentar a medida que la lesión primaria se maligniza y des-diferencia durante el curso clínico. El PSA es uno de estos casos, el cual incluso es completamente normal en el 12% de los adenocarcinomas de próstata (1). La conclusión del estudio es que el cociente ácidos grasos monoenoicos/saturados en los plasmalógenos de etanolamina constituye un marcador tumoral confiable y sensible para diferenciar tejido sano de hiperplasia/dislipasia o de tejido neoplásico en numerosos tipos de cánceres de mama, pulmón y próstata. Asimismo, este marcador correlaciona de manera directamente proporcional con la capacidad metastizante (colonizante) del tumor. La cantidad de tejido requerida para el análisis se puede obtener a través de una punción por aguja y su determinación podría ser de enorme valor tanto en el seguimiento clínico del paciente con cáncer, como en la evaluación de la eficacia de estrategias terapéuticas que se implementen con fines paliativos.

Determinación de biomarcadores de estrés oxidativo-nitrosativo y perfil hormonal en pacientes varicocelectomizados

Se sabe que el varicocele es una afección en aumento dentro de las poblaciones latinoamericanas por causas que no han sido aún debidamente esclarecidas. En general, afecta con mayor frecuencia al testículo izquierdo y su etiología es multifactorial y muy controvertida. Sin embargo, el desbalance hormonal (10) y el estrés oxidativo (11) jugarían un importante rol en la evolución hacia la esterilidad. Argentina obedece al comportamiento general observado mundialmente en cuanto a la progresiva pérdida de capacidad reproductiva masculina (se pueden consultar datos aportados por el Observatorio de Salud Sexual y Reproductiva de Argentina; http://www.ossyr.org.ar/linea_tiempo.html). La incidencia del varicocele en la población Argentina es muy alta (aproximadamente del 15%), contribuyendo –específicamente el varicocele izquierdo– a la tasa de infertilidad con aproximadamente el 41% de los casos (10). Diversos autores han demostrado que la infertilidad masculina y el varicocele están innegablemente asociados a elevados niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS) en plasma seminal y espermatozoides, reducción de la capacidad antioxidante total (12) (13), y anomalías morfológicas en los espermatozoides maduros (14). El-Demerdash *et al.* (15) demostraron que los antioxidantes preservan la calidad del semen en ratas macho intoxicadas con cadmio bajo condiciones de estrés oxidativo, lo que abrió la posibilidad de utilizar antioxidantes en humanos con esta dolencia a fin de mitigar los daños y preservar la capacidad reproductiva sin necesidad de corrección quirúrgica.

Tras implementar estrategias protectivas que recurrieron a mezclas de antioxidantes lipofílicos e hidrosolubles se obtuvieron resultados que fueron desde altamente positivos a negativos o nulos. Las controversias entre datos de diferentes laboratorios, podrían atribuirse a diferencias en los criterios utilizados para la selección de los pacientes estudiados (por ejemplo, diagnósticos y/o hábitos de vida diferentes, variaciones en el *status* nutricional, empleo de medicamentos para otras dolencias, tiempo de evolución desde la lesión primaria, edad, raza, hábitos higiénico-sanitarios, etc.). La falta de evidencias concluyentes acerca de la relación entre perfil hormonal, características del semen, y sistema de defensa antioxidante en pacientes varicocelectomizados, fueron las razones fundamentales que dieron lugar al estudio realizado por investigadores del INBIOLP. Se investigó específicamente la posible existencia de una correlación entre biomarcadores de estrés oxidativo y nitrosativo con la evolución pre- y post-quirúrgica de pacientes con varicocele en testículo izquierdo, a través del seguimiento de la evolución de la patología durante los periodos pre- y post-quirúrgicos, en comparación con resultados obtenidos en muestras de sangre y semen de donantes sanos (16). La propuesta concreta consistió en obtener información acerca de: (i) la conveniencia de administrar antioxidantes a estos pacientes para mejorar su estado clínico, y (ii) la posibilidad de evaluar biomarcadores de estrés oxidativo y/o hormonal no convencionales, como índices potenciales de predicción de la fertilidad. Con esta finalidad se analizaron características del semen y perfil hormonal en 36 hombres infértiles con varicocele izquierdo y 33 controles sanos, ambos seleccionados según estrictos criterios de inclusión/exclusión basados en meta-análisis de estudios realizados en otras partes del mundo. En plasma, eritrocitos (obtenidos de venas antecubital y espermática), y espermatozoides de semen obtenido bajo condiciones estándar, se determinaron niveles de antioxidantes (liposolubles e hidrosolubles), oligoelementos, y actividades enzimáticas del sistema de defensa antioxidante (16). La comparación entre ambos grupos, a diferentes tiempos antes y después de la varicocelectomía, demostró niveles deprimidos de antioxidantes liposolubles e hidrosolubles en los pacientes, y elevadas actividades enzimáticas antioxidantes, que se normalizaron post-varicocelectomía. Los niveles de zinc y selenio en plasma seminal, peroxidación proteica, y daños en la integridad del ADN se mantuvieron elevados hasta un mes post-cirugía; las hormonas luteinizante y folículo estimulante exhibieron un comportamiento bifásico que se normalizó recién a los 3 meses post-cirugía, en tanto que las concentraciones bajas de testosterona libre o unida se normalizaron rápidamente (30 días). Las alteraciones hormonales podrían ser el resultado de un efecto indirecto de las especies reactivas del oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS respectivamente) sobre la función de las células de Leydig y/o Sertoli. Esta hipótesis estuvo basada en experimentos realizados durante

años en modelos de animal entero y células de Leydig en cultivo sometidos a estrés oxidativo y/o nitrosativo por manipulación dietaria con diferentes fuentes lipídicas, o por efecto de polucionantes ambientales generadores de ROS y/o RNS tal como fuera demostrado por Hurtado de Catalfo *et al.* (14) (17) (18) y Astiz *et al.* (19-21). Una vez probada la estrecha relación entre varicocele, perfil hormonal, y estrés oxidativo post-quirúrgico, los autores del trabajo concluyeron que: (i) el uso de biomarcadores de estrés oxidativo y nitrosativo no convencionales, así como la determinación de testosterona libre y unida, son confiables biomarcadores de utilidad clínica para evaluar la evolución de pacientes varicolectomizados; (ii) la administración de antioxidantes de naturaleza liposoluble (tales como el α -tocoferol) mejoraría las condiciones clínicas de hombres infértiles con varicocele en el estadio pre-quirúrgico y durante la convalecencia post-varicolectomía (16).

Utilidad clínica de las determinaciones de cobre, ceruloplasmina y metalotioneínas en pacientes con enfermedades neurodegenerativas y sus parientes directos

Está ampliamente demostrado que el cobre (Cu) es un metal de transición que en cantidades traza juega un rol crucial para la fisiología humana. Sirve como cofactor en reacciones redox que llevan a cabo reacciones bioquímicas involucradas en el crecimiento, diferenciación celular, señales y cascadas de transducción, y muchos otros aspectos del metabolismo normal. A pesar de que la deficiencia de Cu ha sido estudiada extensamente y se la ha asociado a muchas enfermedades humanas, en general relacionadas con los trastornos de neurotransmisión, anemias normocíticas/hipocrómicas, leucopenia, neutropenia y osteoporosis (22-24), se ha prestado mucho menor atención al estudio de la sobrecarga de cobre y su papel en la etiología o en la progresión de patologías humanas. Entre estas patologías se pueden incluir a la disfunción inmunológica (25) (26), la promoción del cáncer (27) (28), la mayor incidencia de riesgo aterogénico (29), la disfunción hepática (30), y otros efectos deletéreos asociados a su actividad pro-oxidante de acuerdo con la evidencia experimental revisada por Arnal *et al.* (31). De hecho, la sobrecarga de cobre es un hecho mucho más frecuente de lo que se supone, debido por ejemplo a excesivas cantidades de este metal en el agua de bebida, vivienda cercana a zonas agropecuarias, empleo de prótesis médicas con aleaciones especiales, o incluso la utilización de dispositivos intrauterinos a base de cobre tal como fuera demostrado por Arnal *et al.* tanto en humanos (31) (32) como en cultivos de células de origen humano (33) (34).

Especial atención se debe prestar al efecto de la sobrecarga de cobre y su incidencia en la etiopatogenia de enfermedades neurodegenerativas humanas. El mal de Parkinson (PD), la enfermedad de Alzheimer (AD), y la demencia vascular (VD) son algunas de los desórdenes neurodegenerativos más prevalentes en Argentina y el mundo que se hallan directamente vinculados a la sobrecarga de cobre (35-38). Al parecer, la fracción de Cu circulante no complejado a ceruloplasmina (CNCC) sería la responsable de los daños observados en todos estos procesos neurodegenerativos (38).

La ceruloplasmina (CRP) es la principal proteína complejante de cobre presente en el plasma humano (39), y desde hace muchos años es considerada en bioquímica clínica como un reactante o biomarcador de fase subaguda que responde a cuadros de tipo inflamatorio (39) (40). Muchas enfermedades neurodegenerativas, especialmente las de mayor incidencia tales como AD, PD y VD, cursan con un componente inflamatorio o gliosis reaccional acompañante en mayor o menor medida en cuanto al deterioro clínico, que es la resultante de la activación glial por efecto de la sobreproducción de ROS y/o RNS (peroxinitrito especialmente) en el SNC (41) (42). Sin embargo, existe considerable controversia sobre la posible utilidad clínica de la determinación de CRP circulante como biomarcador periférico del daño o progresión en cuadros de neurodegeneración humana, y algo similar sucede con la fracción de Cu libre (43).

Por otra parte, la superfamilia de las metalotioneínas (MTs) es inducida por muchos metales tóxicos incluyendo al Cu. Estas proteínas están también involucradas en el almacenamiento y en la distribución del Cu, y se les atribuye actividad captadora (*scavenger*) de radicales libres (44) (45). En consecuencia, las MTs vienen ganando popularidad como atenuadoras de los efectos tóxicos del Cu y como biomarcadores de exposición medioambiental a este metal de transición (46). El efecto neuroprotectivo de las MTs (47) (48) sugiere que el Cu (así como otros metales pesados) efectivamente tiene un rol crucial en la etiopatogénesis de la neurodegeneración. Sin embargo, no parece haber a la fecha evidencia concluyente que demuestre la incumbencia de un mecanismo Cu-dependiente que incida específicamente en la evolución del PD. A pesar de lo dicho, algunos autores insisten en que las cupremias elevadas están directamente asociadas a la disminución de la *performance* cognitiva en todos los cuadros de neurodegeneración ya sea que estos cursen o no con un significativo y rápido deterioro de las funciones superiores (49).

En virtud a estos conocimientos previos, investigadores del INIBIOLP estudiaron con mayor detalle los niveles de CRP, Cu (libre y CNCC), MTs y numerosos marcadores de producción de ROS y RNS y de daño asociado a lípidos (peroxidación) y proteínas (carbo-

nilos proteicos) en la sangre de pacientes AD, PD y VD y en sus parientes directos (hijos/as), a fin de establecer: (i) la posible correlación entre cada uno de estos biomarcadores y la progresión de las patologías, (ii) su utilidad potencial como biomarcadores específicos, y (iii) el valor predictivo que pudieran tener para anticipar la evolución hacia un proceso neurodegenerativo en una población considerada en riesgo por su carga genética, tal como lo es la de los parientes directos de pacientes.

Cristalli *et al.* (50) y Arnal *et al.* (51) concluyeron algunas cuestiones centrales derivadas de estos estudios, la principal de las cuales es que existe una indudable y significativa asociación entre el Cu plasmático libre y los cuadros neurodegenerativos. Se encontraron niveles elevados de Cu en pacientes y en parientes de pacientes con VD, y además existió una correlación directa entre este marcador y la progresión del cuadro clínico en esta clase de pacientes. Se encontró también un aumento del nivel plasmático de CRP en todos los grupos estudiados (AD, PD y VD) en respuesta al componente inflamatorio de cada patología, aunque solo en los pacientes VD correlacionó positiva y significativamente con la progresión del cuadro clínico. La concentración de MTs aumentó progresivamente con la gravedad del cuadro en pacientes VD, y se hallaron incrementados los cocientes Cu/CRP y Cu/MTs como indicadores de posible utilidad clínica en la progresión de AD, pero no de PD ni de VD. Asimismo, se encontró una correlación negativa entre la prueba de desempeño cognitivo MMSE (del inglés: *mini-mental state examination test*) y los niveles de CNCC con dependencia lineal para AD y PD, y polinomial cuadrática para VD. Se demostró una clara dependencia del progreso de AD con el marcador CNCC, y se estableció el valor predictivo de la determinación de Cu y del cociente Cu/CRP como evaluadores de riesgo en parientes directos de pacientes VD (50) (51).

Los trastornos cognitivos tienen una gran incidencia y prevalencia dentro de la población de ancianos, y aproximadamente un tercio sufre de cuadros de demencia, exhibe un deterioro progresivo de sus capacidades ejecutivas, y tiene alta mortalidad (52). En la actualidad está ampliamente aceptado que el desempeño cognitivo predice con gran exactitud la chance de institucionalización y sobrevida (52). Por lo tanto, resulta razonable tener en cuenta cualquier esfuerzo destinado a evaluar y/o predecir este tipo de enfermedades y su progresión clínica. Obviamente, este tema es complejo y requiere de mayores esfuerzos para ser investigado apropiadamente. Por lo tanto se hace perentorio extender estas investigaciones en un estudio longitudinal a gran escala para obtener mayores elementos de juicio en la evaluación de los biomarcadores propuestos y de su real utilidad clínica.

Utilidad clínica de biomarcadores de estrés oxidativo-nitrosativo en fumigadores profesionales expuestos a agroquímicos de uso frecuente en nuestro país y el mundo

En regiones de Argentina en donde se producen frutas y verduras, se utilizan agroquímicos (fungicidas, insecticidas, herbicidas, acaricidas, nematocidas, etc.) para eliminar plagas que atentan contra la productividad y la calidad de los alimentos. Estas sustancias son aplicadas por fumigadores profesionales que realizan trabajos en forma estacional, ligados a los ciclos de labores agropecuarias y a los periodos específicos de las cosechas. En este sentido, Argentina sigue la tendencia mundial en cuanto al empleo de especies transgénicas resistentes a agroquímicos específicos, y la implementación de las técnicas de siembra directa que utilizan herbicidas de alto impacto (como el glifosato en el cultivo de la soja resistente a este agroquímico). Tal como fuera revisado por Astiz *et al.* (53), la exposición laboral a plaguicidas puede ocurrir durante el proceso de manufactura, almacenamiento, y/o aplicación. Se sabe con certeza que la manipulación de pesticidas implica un riesgo importante para la salud que muchas veces es desconocido por los fumigadores (54). Los efectos tóxicos de la exposición aguda a altas dosis de plaguicidas son fácilmente reconocibles a través de signos y síntomas característicos, mientras que los efectos resultantes de la exposición a dosis bajas por periodos prolongados suelen ser muy difíciles de detectar (55) (56).

Investigadores del INIBIOLP especializados en el estudio de estrés oxidativo por una parte y en sistemas de defensa antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos por otra parte, estudiaron de forma sistemática el riesgo asociado a la manipulación de plaguicidas en una muestra representativa de trabajadores del agro expertos en técnicas de fumigación que no presentaban sintomatología clínica alguna a juzgar por los resultados de sus exámenes obligatorios impuestos por el sistema de aseguradores de salud. Estos sistemas de contralor periódico pautan por ley la determinación de marcadores de tipo convencional. Arnal *et al.* (57) y Astiz *et al.* (58) establecieron que estos trabajadores estaban expuestos en forma crónica aunque intermitente a mezclas de organofosforados (OP), ditiocarbamatos, piretroides, y fungicidas a base de cobre, utilizados en el tratamiento de plantaciones de cítricos de una amplia zona de la Pcia. de Entre Ríos, en el Litoral Argentino. Actualmente el monitoreo del estado de salud de estos trabajadores se está volviendo indispensable, no sólo para lograr la evaluación del riesgo que implica una exposición laboral de este tipo (56), sino también para justificar políticas a favor de la eliminación/reducción de la exposición y la provisión de información confiable

y apropiada acerca de las normas de protección primaria en la aplicación de plaguicidas. En la Argentina, el estado de salud de los fumigadores se evalúa con una batería de análisis de laboratorio de rutina que incluye biomarcadores hematológicos, hepáticos, pancreáticos y renales. Además se mide la actividad de colinesterasa plasmática como principal blanco de inhibición de insecticidas organofosforados (OPs) y carbamatos (56) (59-61). Sin embargo, los estudios de Astiz y Arnal demostraron que estos biomarcadores de rutina fallan en la detección de efectos sub-sintomáticos y sub-clínicos de la intoxicación por agroquímicos (57) (58).

Por otro lado, se sabe que la exposición a plaguicidas incrementa la producción de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno y provoca alteraciones en los sistemas de defensa antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (62-64). Existen numerosos trabajos que demuestran los efectos de plaguicidas en animales de experimentación (53) (62) (63); sin embargo, muy pocos proveen información detallada acerca de la exposición de poblaciones humanas a diferentes mezclas de plaguicidas en forma simultánea (57) (58) (64-66).

Idealmente, un biomarcador demuestra un cambio en la actividad enzimática o en la concentración de una especie química como resultado de una noxa, y lo hace con absoluta dependencia de la intensidad y/o el tiempo de aplicación de esa noxa. Sería deseable que también lo hiciera con elevadas especificidad y selectividad de modo tal que se incremente su poder discriminatorio y su potencialidad clínica. En la mayoría de los casos estos biomarcadores están ligados a la hiperproducción de una o más especies reactivas (ROS/RNS) en cuyo caso se los cataloga como BEON (biomarcadores de estrés oxidativo-nitrosativo). Este concepto se aplica de la misma manera a los productos derivados de la oxidación de lípidos, proteínas, y ADN, y al consumo de antioxidantes (67) (68) ya sean lipofílicos o hidrofílicos. Muchos BEON han sido propuestos como biomarcadores para la evaluación de riesgo en poblaciones expuestas a noxas medio-ambientales como los agroquímicos (69) (70) pero nunca se los ha utilizado sistemáticamente en el monitoreo clínico mediante pruebas de laboratorio. Por estas razones se investigó a los BEON como indicadores no-tradicionales (o emergentes) de exposición a plaguicidas y además se evaluó su utilidad clínica al compararlos con los biomarcadores de uso rutinario. Específicamente, se estudió un grupo de fumigadores (F) (25 ± 5 años) expuestos a plaguicidas por al menos 10 años y se los comparó con un grupo control (C) de voluntarios no expuestos. Los fumigadores mostraron parámetros hematológicos, hepáticos, renales y pancreáticos dentro de los valores de referencia incluyendo a la actividad de colinesterasa. Sin embargo, todas las determinaciones fueron significativamente diferentes respecto a los valores obtenidos para el grupo C ($p < 0,01$) (57) (58). Los BEON tales

como el α -tocoferol y la capacidad antioxidante total (FRAP), resultaron menores en el grupo F, al tiempo que se encontraron elevados los niveles de nitritos y nitratos, carbonilos proteicos, sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, cobre, y proteínas secuestradoras de metales (ceruloplasmina y metalotioneínas) (57) (58). Los resultados demostraron fehacientemente que los ensayos de *screening* de laboratorio resultaron ser muy poco sensibles en la detección de intoxicaciones sub-clínicas y también sugirieron que los BEON deberían ser apropiadamente validados para ser incluidos en la caracterización del riesgo de exposición ocupacional a plaguicidas. En base a estos resultados, se consideró que evaluar los riesgos reales para la salud de fumigadores profesionales no solamente podría evitar los efectos perjudiciales de esta actividad prolongada en el tiempo, y concientizar a las empresas a fin de brindar un marco de protección eficiente a sus empleados, sino que también constituyen un basamento científico sobre el cual establecer nueva legislación y adecuar las denominadas "buenas prácticas agropecuarias". En suma, este tipo de determinaciones protegería a la comunidad expuesta, optimizaría las inversiones o los costos en salud pública, y alentaría la creación de normas que regulen en forma estricta a este tipo de actividades, especialmente aquellas cuestiones relacionadas con la toxicidad inaparente, el manipuleo de maquinaria *ad-hoc*, el uso de la indumentaria adecuada, el correcto desecho de los recipientes contenedores, entre muchas otras cuestiones inherentes al empleo de agroquímicos potencialmente peligrosos (71).

Marcadores emergentes en diabetes *mellitus* tipo 2

La cantidad de evidencia experimental y epidemiológica reunida en torno a las características evolutivas del cuadro clínico de la diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) hacen aún más sorprendente el hecho de no haberse aceptado internacionalmente y de manera indiscutible un protocolo que combine a los hipoglucemiantes orales (HO) con apropiadas dosis de insulina (I). En algún momento este tipo de recomendaciones farmacológicas o terapéuticas estuvo en franca discusión (72) (73); sin embargo, hoy en día existen ya sobradas razones para considerar a la administración de algún tipo de insulina como imprescindible en la mayoría de los pacientes DM2 (sino en todos ellos). Ya en 2006 se estableció cabalmente que no existe ningún esquema farmacológico a base de hipoglucemiantes orales (solos o en combinación) que a través del control de la glucemia disminuya o prevenga las complicaciones tardías de esta enfermedad (74). Desde hace décadas se ha intentado evaluar si el control de la glucemia es un marcador confiable de evolución clínica, hasta que quedó claramente es-

tablecido que aún en personas con DM2 con glucemia aceptable y estable en el tiempo, los hipoglucemiantes orales no evitaron el deterioro metabólico subyacente que conduce a los pacientes a inflamación, estado dislipémico, pro-trombótico y pro-agregante, disfunción endotelial, insuficiencia renal y daños al sistema nervioso central y periférico.

A partir del año 2000 quedó fehacientemente establecido que el estado de estrés oxidativo inherente a la etiopatogenia y a la evolución de la DM2 requiere de intervenciones farmacológicas y/o dietarias tendientes a neutralizarlo, especialmente por su rol crítico a la hora de provocar disfunción endotelial en estos pacientes (75). El grupo ACCORD, formado para delinear las mejores estrategias de tratamiento para pacientes DM2, publicó en 2007 el informe de su investigación multicéntrica en algo más de 10.000 pacientes estableciendo claramente que la "normalización" del nivel de glucemia en sangre, lo mismo que el de fructosamina o Hb A_{1c}, no constituyen parámetros confiables en cuanto al riesgo cardiovascular por dislipemia y disfunción endotelial, y recomendaron terapias combinadas con hipoglucemiantes orales, antioxidantes y dosis de insulina de las denominadas "premezcladas" (de largo efecto) y regulares o de corta acción (76). Más recientemente se recomendó la administración preferencial de metformina como hipoglucemiante oral en pacientes DM2 (que no reciben tratamiento con insulina) debido a sus efectos antioxidantes y antiinflamatorios destacables en relación a otras drogas del mismo tipo (77). Los marcadores de normalización de la glucemia tales como la hemoglobina glicosilada continúan siendo extremadamente confiables para monitorear -promedialmente- el nivel de glucosa durante los tres meses precedentes al análisis (78) y hay muchos autores que aún actualmente le adjudican gran valor predictivo en cuanto al riesgo cardiovascular (79). Sin embargo, otros piensan que no reflejan los diversos riesgos subyacentes que se desarrollan a lo largo del curso clínico, y que están especialmente relacionados con la inflamación y la incompetencia endotelial o las enfermedades degenerativas concomitantes (80)(81).

Con el fin de complementar la terapia basada solamente en hipoglucemiantes orales se han hecho diversos intentos que abarcaron desde el empleo de antioxidantes (82-84) - estrategia con la cual no todos los autores encontraron resultados positivos (85) - hasta las recomendaciones dietarias tendientes a regular el nivel de adiponectina (86), la suplementación con arginina o moduladores de la óxido-nítrico sintetasa (87), vitaminas, ácidos grasos o componentes dietarios muy específicos (88-90). Sin embargo, ninguno de estos intentos resultó tan beneficioso como la implementación de un régimen farmacológico mixto con hipoglucemiantes orales (HO) y diferentes tipos de insulina (I) (91-93). Investigadores del INIBIOLP propusieron

entonces la hipótesis que todos los marcadores de inflamación, agregación plaquetaria, dislipemia y estrés oxidativo que conforman la constelación de parámetros que caracterizan la disfunción endotelial se mejorarían significativamente en pacientes tratados con HO+I respecto de los que reciben HO solamente. Esta postura es coincidente con las estrategias terapéuticas más modernas en donde se han hecho estudios retrospectivos (meta-análisis) para el ajuste del tipo y dosis de insulina a emplear a fin de evitar los riesgos por hipoglucemia que acompañan a la administración de la hormona (94). No obstante este riesgo (que puede ser ponderado apropiadamente para cada paciente), se considera que los beneficios del empleo de insulina a largo plazo justifican ampliamente su recomendación por sobre los esquemas que combinan diferentes tipos de hipoglucemiantes orales como único recurso farmacológico (95)(96). Incluso, para el confort de los pacientes, ya han avanzado significativamente los estudios tendientes a emplear insulina en forma de un preparado oral en lugar de la tradicional administración por inyección subcutánea (97).

Los estudios llevados a cabo en el INIBIOLP durante los últimos años abordaron el problema de introducir nuevos biomarcadores que justifiquen desde el punto de vista bioquímico el empleo de terapias combinadas a base de hipoglucemiantes orales e insulina en DM2. Algunas de estas investigaciones se basaron en estudios previos llevados a cabo en animales de experimentación sobre todo en combinación con investigadores del CENEXA de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNLP (98-100). Los estudios en humanos fueron realizados por Marra *et al.* (101) determinando una batería de biomarcadores de dislipemia/riesgo aterogénico, inflamación y disfunción endotelial en una población constituida por 38 controles clínicamente sanos, 32 pacientes diabéticos tipo 2 (DM2) tratados con hipoglucemiantes orales (HO) y 34 pacientes DM2 tratados con una combinación de HO e insulina, pareados por edades y sexos. En todos los pacientes DM2 se encontraron elevados los marcadores de agregación plaquetaria, inflamación y reactantes de fase aguda/crónica (fibrinógeno -Fib-, factor von Willebrand - vWF -, proteína-C reactiva, factor de necrosis tumoral- α , ceruloplasmina, tromboxano B-2, interleuquina-6) y de riesgo aterogénico (endotelina-1, apolipoproteína A, cocientes entre lípidos mayoritarios y lipoproteínas), conjuntamente con deterioro sustancial de biomarcadores de estrés oxidativo (α -tocoferol, capacidad antioxidante total, cociente glutatión reducido/oxidado) y de daño por peroxidación (carbonilos proteicos, sustancias reactivas al tiobarbiturato, productos avanzados de glicosilación). Si bien ambas poblaciones tuvieron marcadores patológicos, la administración de insulina significó una mejoría respecto a la subpoblación que no la recibió. La administración de insulina en combinación con hipoglucemiantes ora-

les modificó significativamente y de manera beneficiosa a todos los biomarcadores de inflamación, riesgo aterogénico y disfunción endotelial confirmando la hipótesis operacional sobre la cual se basó el estudio. Estos efectos fueron independientes del tipo de insulina administrada. A su vez los estudios de correlación y regresión demostraron que existe una clara dependencia entre el deterioro evaluado por cualquiera de los marcadores y el tiempo de evolución clínica, y una compleja interrelación entre ellos, que se ve positivamente mejorada por efecto de la hormona. Los resultados apoyaron la implementación de una terapia combinada de hipoglucemiantes orales e insulina como una mejor opción para disminuir las complicaciones de la DM2, siempre que se tomen los recaudos pertinentes para evitar el riesgo de hipoglucemia sobre todo en pacientes susceptibles. Parte de los hallazgos encontrados en ese trabajo ratificaron estudios previos en donde se reportó una clara condición de estrés oxidativo en pacientes con DM2 y un cuadro pro-inflamatorio concomitante (102) (105), pro-aterogénico (dislipémico y pro-agregante) (106)(108) que acompañan (algunos causativamente) a una disfunción endotelial (109-110). Otros hallazgos constituyeron un aporte completamente novedoso en cuanto al empleo de los biomarcadores emergentes como evaluadores pronósticos y, más específicamente, de eficacia terapéutica en pacientes DM2. Un corolario importante derivado de esos estudios lo constituyeron las inter-relaciones entre biomarcadores para los diferentes aspectos pronósticos o evolutivos de la enfermedad. Otros autores ya habían explorado estas interdependencias. Por ejemplo, con anterioridad a este estudio se investigaron las correlaciones entre los niveles de insulina y HOMA (*homoeostasis model assessment*), o insulina y óxido nítrico o factor von Willebrand (112), fibrinógeno y depuración de creatinina o relación albúmina/creatinina, BMI (índice de masa corporal), IL-6 (interleuquina-6) o PCR (proteína C reactiva) (114), FNT- α (factor de necrosis tumoral alfa) e insulina, BMI, y HOMA (115), etc. Sin embargo, los datos de la investigación no solamente demostraron una compleja red de interconexiones entre los biomarcadores de inflamación, daño por estrés oxidativo, y disfunción endotelial; sino que agregaron una clara definición entre estas correlaciones para las dos poblaciones en estudio demostrando que la insulina (sin importar la forma farmacéutica empleada) mejoró substancialmente la condición de los pacientes DM2. Desde hace bastante se conocían las propiedades anti-inflamatorias de la insulina y el efecto restaurador de la dislipemia como así también su acción normalizadora del cociente Ox-LDL/C-LDL en pacientes DM2 (116). El surgimiento de nuevos biomarcadores, especialmente los vinculados al metabolismo lipídico y al riesgo aterogénico, ha venido revolucionando la capacidad predictiva de enfermedad aterogénica en huma-

nos. El cociente de apolipoproteínas Apo-B/Apo-A y triglicéridos/C-HDL, conjuntamente con la determinación de la concentración de Lp(a), se ha constituido en biomarcadores con elevada capacidad predictiva o evolutiva de riesgo cardiovascular en DM2 (101-108). Se sabe que en los pacientes tratados con insulina se incrementan significativamente los receptores para LDL y se mejoran substancialmente el metabolismo de estas partículas lipoproteicas tal como fuera demostrado por vez primera por Duvillard *et al.* (117). Asimismo se cree que la insulina disminuye la glicación de los receptores LDL que de este modo quedan mejor protegidos frente al estrés oxidativo, y también el nivel de triglicéridos en estas mismas partículas lipoproteicas (114). También se sabe que la administración de insulina reduce *per se* - y no a través del control de la glucemia - los niveles de reactantes de fase aguda o crónica (PCR, CRP, Fib, vWF), disminuye la acumulación de especies reactivas del oxígeno (ROS), la producción de interleuquinas (IL-1 y -6, especialmente), las moléculas de adhesión como el VCAM-1, y tiende a restaurar el nivel de endotelina-1 y de FNT- α (113) en coincidencia con los resultados de Marra *et al.* (101). Esto refuerza la idea de proponer a estos biomarcadores como herramientas útiles en la práctica clínica. A pesar de que aún la patogénesis de la disfunción endotelial no se halla completamente dilucidada, se conocen fehacientemente cuáles son los marcadores específicos de esta complicación en la DM2. Dentro de las múltiples alteraciones observables, el incremento del nivel de óxido nítrico (probablemente como respuesta compensatoria a su menor biodisponibilidad) es característico y ha sido varias veces demostrado (113). A su vez, los productos de glicosilación avanzados (AGEs) se acumulan en los tejidos, y específicamente en las paredes arteriales en función del tiempo de evolución clínica, aumentando la acumulación de ROS, la producción de citoquinas proinflamatorias, y favoreciendo la modificación de las proteínas de la matriz intercelular. Los niveles de productos avanzados de glicosilación (AGEs), sustancias reactivas al tiobarbiturato (TBARS) y carbonilos proteicos (PCs) elevados reflejan estos efectos deletéreos. Estos marcadores son considerados como muy sensibles y tempranos indicadores del daño tisular en los pacientes DM2 especialmente en relación con la disfunción renal, la neuritis/vasculitis periférica, y el daño a la nefrona (118), y todos ellos resultaron substancialmente disminuidos por la administración de insulina (101). Se constató asimismo que las correlaciones entre estos biomarcadores son menos significativas en los pacientes DM2 tratados con la hormona en comparación con los no tratados. Esto último ya constituye una fuerte evidencia experimental a favor del empleo de insulina en pacientes DM2. De modo que a manera de conclusiones se puede decir que se demos-

tró que la administración de insulina en combinación con hipoglucemiantes orales modificó significativamente y de manera beneficiosa a todos los biomarcadores de inflamación, riesgo aterogénico y disfunción endotelial, que los efectos fueron independientes del tipo de insulina administrada, y que existe una clara dependencia entre el deterioro evaluado por cualquiera de los marcadores y el tiempo de evolución clínica, como así también una compleja inter-relación entre ellos, que se ve positivamente mejorada por efecto de la hormona. Los resultados apoyaron la implementación de una terapia combinada de hipoglucemiantes orales e insulina como una mejor opción para disminuir las complicaciones de la DM2, siempre que se tomen los recaudos pertinentes para evitar el riesgo de hipoglucemia sobre todo en pacientes susceptibles.

CORRESPONDENCIA

DR. CARLOS ALBERTO MARRA.

INBIOLP (Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata), CCT - La Plata, CONICET-UNLP,

Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular,

Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata, Calle 60 y 120 (1900) LA PLATA, Argentina.

Tel: +54-221-489-4894 #104/107; FAX: +54-221-425-8988

E-mail: camarra@med.unlp.edu.ar / contactocarlos@hotmail.com

Referencias bibliográficas

- Smith RE, Lespi P, Di Luca M, Bustos C, Marra FA, de Alaniz MJT, *et al.* A reliable biomarker derived from plasmalogens to evaluate malignancy and metastatic capacity of human cancers. *Lipids* 2008; 43 (1): 79-89.
- Mangold HK, Paltauf F. Ether lipids as chemical indicators in neoplasms. En: Mangold HK, Paltauf F, editors. *Ether lipids. Biochemical and biomedical aspects.* London: Academic Press; 1983. p. 248-51.
- Lin HJ, Ho FC, Lee CL. Abnormal distribution of O-alkyl groups in the neutral glycerolipids from human hepatocellular carcinomas. *Cancer Res* 1978; 38 (4): 946-9.
- Giai M, Roagna R, Ponzzone R, Biglia N, Sgro L, Perona M, *et al.* TPS and CA 15.3 serum values as a guide for treating and monitoring breast cancer patients. *Anticancer Res* 1996; 16 (2): 875-81.
- De La Lande B, Hacene K, Floiras JL, Alatrakchi N, Pichon MF. Prognostic value of CA 15.3 kinetics for metastatic breast cancer. *Int J Biol Markers* 2002; 17 (4): 231-8.
- Sawabata N, Okada M, Higashiyama K, Nakagawa, M, Miyake, H, Maeda A, *et al.* Diagnostic strategy based on preoperative serum CEA levels in clinical stage IA NSCLC. *J Clin Oncol* 2006; 24 Supl 18: 17011.
- Dnistrian AM, Schwartz MK, Greenberg EJ, Smith CA, Schwartz DC. Evaluation of CA M26, CA M29, CA 15-3 and CEA as circulating tumor markers in breast cancer patients. *Tumour Biol* 1991; 12 (2): 82-90.
- Daoud E, Bodor G. CA-125 concentrations in malignant and nonmalignant disease. *Clin Chem* 1991; 37 (11): 1968-74.
- Roulston JE. Screening with tumor markers: critical issues. *Mol Biotechnol* 2002; 20 (2): 153-62
- Naughton CK, Nangia AK, Agarwal A. Varicocele and male infertility: Part II. Pathophysiology of varicoceles in male infertility. *Hum Reprod Update* 2001; 7 (5): 473-81.
- Chen SS, Chang, LS, Wei YH. Oxidative damage to proteins and decrease of antioxidant capacity in patients with varicocele. *Free Radic Biol Med* 2001; 30 (11): 1328-34.
- Alkan I, Simsek F, Haklar G, Kervancioglu E, Ozveri H, Yalcin S. Reactive oxygen species production by the spermatozoa of patients with idiopathic infertility: relationship to seminal plasma antioxidants. *J Urol* 1997; 157 (1): 140-3.
- Hendin BN, Kolettis PN, Sharma RK, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Varicocele is associated with elevated spermatozoal reactive oxygen species production and diminished seminal plasma antioxidant capacity. *J Urol* 1999; 161 (6): 1831-4.
- Hurtado de Catalfo GE, Astiz M, Alaniz MJT de, Marra CA. Frequently-used agrochemicals lead to functional and morphological spermatozoa alterations in rats. *J Toxicol Environ Health Sci* 2011; 3 (7): 180-92.
- El-Demerdash FM, Yousef MI, Kedwany FS, Baghdadi HH. Cadmium-induced changes in lipid peroxidation, blood hematology, biochemical parameters and semen quality of male rats: protective role of vitamin E and beta-carotene. *Food Chem Toxicol* 2004; 42 (10): 1563-71.
- Hurtado de Catalfo GE, Ranieri-Casilla A, Marra FA, de Alaniz MJ, Marra CA. Oxidative stress biomarkers and hormonal profile in human patients undergoing varicocelectomy. *Int J Androl* 2007; 30 (6): 519-30.
- Hurtado de Catalfo GE, de Alaniz MJ, Marra CA. Influence of commercial dietary oils on lipid composition and testosterone production in interstitial cells isolated from rat testis. *Lipids* 2009; 44 (4): 345-57.
- Hurtado de Catalfo GE, de Alaniz MJ, Marra CA. Dietary lipids modify redox homeostasis and steroidogenic status in rat testis. *Nutrition* 2008; 24 (7-8): 717-26.
- Astiz M, de Alaniz MJ, Marra CA. Antioxidant defense system in rats simultaneously intoxicated with agrochemicals. *Environ Toxicol Pharmacol* 2009; 28 (3): 465-73.
- Astiz M, Hurtado de Catalfo GE, de Alaniz MJ, Marra CA. Involvement of lipids in dimethoate-induced inhibition of testosterone biosynthesis in rat interstitial cells. *Lipids* 2009; 44 (8): 703-18.
- Astiz M, Hurtado de Catalfo G, de Alaniz MJ, Marra CA. Exogenous arachidonate restores the dimethoate-induced inhibition of steroidogenesis in rat interstitial cells. *Lipids* 2012; 47 (6): 557-69.

22. Kanumakala S, Boneh A, Zacharin M. Pamidronate treatment improves bone mineral density in children with Menkes disease. *J Inher Metab Dis* 2002; 25 (5): 391-8.
23. Fraga CG. Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health. *Mol Aspects Med* 2005; 26 (4-5): 235-44.
24. Halfdanarson TR, Kumar N, Li CY, Phyliky RL, Hogan WJ. Hematological manifestations of copper deficiency: a retrospective review. *Eur J Haematol* 2008; 80 (6): 523-31.
25. Elsabbagh HS, El-Tawil OS. Immunotoxicity of cupravit and previcur fungicides in mice. *Pharmacol Res* 2001; 43 (1): 71-6.
26. Wataha JC, Lockwood PE, Schedle A, Noda M, Bouillaguet S. Ag, Cu, Hg and Ni ions alter the metabolism of human monocytes during extended low-dose exposures. *J Oral Rehabil* 2002; 29 (2): 133-9.
27. Burrell R. Human immune toxicity. *Mol Aspects Med* 1993; 14 (1): 1-81.
28. Leone N, Courbon D, Ducimetiere P, Zureik M. Zinc, copper, and magnesium and risks for all-cause, cancer, and cardiovascular mortality. *Epidemiology* 2006; 17 (3): 308-14.
29. Ferns GA, Lamb DJ, Taylor A. The possible role of copper ions in atherogenesis: The Blue Janus. *Atherosclerosis* 1997; 133 (2): 139-52.
30. Sokol RJ, Devereaux MW, O'Brien K, Khandwala RA, Loehr JP. Abnormal hepatic mitochondrial respiration and cytochrome C oxidase activity in rats with long-term copper overload. *Gastroenterology* 1993; 105 (1): 178-87.
31. Arnal N, Alaniz MJT de, Marra CA. Involvement of copper overload in human diseases. En: Giménez S, editor. *Metal in Biological Systems. Research Signpost Kerala. India* 2010. p. 1-28.
32. Arnal N, de Alaniz, MJ, Marra C.A. Alterations in copper homeostasis and oxidative stress biomarkers in women using the intrauterine device TCu380A. *Toxicol Lett* 2010; 192 (3): 373-8.
33. Arnal N, de Alaniz MJ, Marra CA. Cytotoxic effects of copper overload on human-derived lung and liver cells in culture. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1820 (7): 931-9.
34. Arnal N, de Alaniz MJ, Marra CA. Carnosine and neocuproine as neutralizing agents for copper overload-induced damages in cultured human cells. *Chem Biol Interact* 2011; 192 (3): 257-63.
35. Halliwell B. The wanderings of a free radical. *Free Radic Biol Med* 2009; 46 (5): 531-42.
36. Squitti R, Lupoi D, Pasqualetti P, Dal Forno G, Vernieri F, Chiovenda P *et al.* Elevation of serum copper levels in Alzheimer's disease. *Neurology* 2002; 59 (8): 1153-61.
37. Squitti R, Pasqualetti P, Cassetta E, Dal Forno G, Cesaretti S, Pedace F *et al.* Elevation of serum copper levels discriminates Alzheimer disease from vascular dementia. *Neurology* 2003; 60 (12): 2013-4.
38. Squitti R, Pasqualetti P, Dal Forno G, Moffa F, Cassetta E, Lupoi D, *et al.* Excess of serum copper not related to ceruloplasmin in Alzheimer disease. *Neurology* 2005; 64 (6): 1040-6.
39. Wirth PL, Linder MC. Distribution of copper among components of human serum. *J Natl Cancer Inst* 1985; 75 (2): 277-84.
40. Linder MC, Hazegh-Azam M. Copper biochemistry and molecular biology. *Am J Clin Nutr* 1996; 63 (5): 797S-811S.
41. Chorsky RL, Yaghamai F, Hill WD, Stopa EG. Alzheimer's disease: a review concerning immune response and microischemia. *Med Hypoth* 2001; 56 (1): 124-7.
42. Orr CF, Rowe DB, Halliday GM. An inflammatory review of Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 2002; 68 (5): 325-40.
43. De Luigi A, Fragiaco C, Lucca U, Quadri P, Tettamanti M, Grazia de Simoni M. Inflammatory markers in Alzheimer's disease and multi-infarct dementia. *Mech Ageing Dev* 2001; 122 (16): 1985-95.
44. Vasak M. Advances in metallothionein structure and functions. *J Trace Elements Med Biol* 2005; 19 (1): 13-7.
45. Selvaraj A, Balamurugan K, Yepiskoposyan H, Zhou H, Egli D, Georgiev O, *et al.* Metal-responsive transcription factor (MTF-1) handles both extremes, copper load and copper starvation, by activating different genes. *Genes Dev* 2005; 19 (8): 891-6.
46. Hylland K, Haux C, Hogstrand C. Hepatic metallothionein and heavy-metals in dab Limanda limanda from the German Bight. *Mar Ecol Prog Ser* 1992; 91 (1-3): 89-96.
47. Ebadi M, Brown-Borg H, El Refaey H, Singh BB, Garrett S, Shavali S, *et al.* Metallothionein-mediated neuroprotection in genetically engineered mouse models of Parkinson's disease. *Brain Res Mol Brain Res* 2005; 134 (1): 67-75.
48. Ebadi M, Sharma SK, Ghafourifar P, Brown-Borg H, El Refaey H. Peroxynitrite in the pathogenesis of Parkinson's disease and the neuroprotective role of metallothioneins. En: Packer L, Cadenas E, editors. *Methods Enzymol. Nitric Oxide, Part E.* Elsevier Inc; 2005; 396 p. 276-98.
49. Smorgon C, Mari E, Atti AR, Dalla Nora E, Zamboni PF, Calzoni F, *et al.* Trace elements and cognitive impairment: an elderly cohort study. *Arch Gerontol Geriatr Suppl* 2004; 9: 393-402.
50. Cristalli DO, Arnal N, Marra FA, de Alaniz MJ, Marra CA. Peripheral markers in neurodegenerative patients and their first-degree relatives. *J Neurol Sci* 2012; 314 (1-2): 48-56.
51. Arnal N, Cristalli DO, Alaniz MJT de, Marra CA. Clinical utility of copper, ceruloplasmin, and metallothionein plasma determinations in human neurodegenerative patients and their first-degree relatives. *Brain Res* 2010; 1319: 118-30.
52. St. John P, Montgomery P. Are cognitively intact seniors with subjective memory loss to develop dementia? *Int J Geriatr Psychiatry* 2002; 17 (9): 814-20.
53. Astiz M, Zirulnik F, Giménez MS, Alaniz MJT de, Marra CA. Overview of glyphosate toxicity and its commercial

- formulations evaluated in laboratory animal tests. *Curr Top Toxicol* 2009; 6: 1-15.
54. Mekonnen Y, Agonafir T. Pesticide sprayers' knowledge, attitude and practice of pesticide use on agricultural farms of Ethiopia. *Occup Med* 2002; 52 (6): 311-5.
 55. Banerjee BD, Seth V, Bhattacharya A, Pasha ST, Chakraborty AK. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers. *Toxicol Lett* 1999; 107 (1-3): 33-47.
 56. He F. Biological monitoring of exposure to pesticides: current issues. *Toxicol Lett* 1999; 108 (2-3): 277-83.
 57. Arnal N, Astiz M, de Alaniz M.J, Marra C.A. Clinical parameters and biomarkers of oxidative stress in agricultural workers who applied copper-based pesticides. *Ecotoxicol Environ Saf* 2011; 74 (6): 1779-86.
 58. Astiz M, Arnal N, de Alaniz MJ, Marra C.A. Occupational exposure characterization in professional sprayers: clinical utility of oxidative stress biomarkers. *Environ Toxicol Pharmacol* 2011; 32 (2): 249-58.
 59. Lotti M. Cholinesterase inhibition: complexities in interpretation. *Clin Chem* 1995; 41 (12 Pt 2): 1814-8.
 60. Remor AP, Totti CC, Moreira DA, Dutra GP, Heuser VD, Boeira JM. Occupational exposure of farm workers to pesticides: Biochemical parameters and evaluation of genotoxicity. *Environ Int* 2009; 35 (2): 273-8.
 61. Singh VK, Jyoti, Reddy MM, Kesavachandran C, Rastogi SK, Siddiqui MKJ. Biomonitoring of organochlorines, glutathione, lipid peroxidation and cholinesterase activity among pesticide sprayers in mango orchards. *Clin Chim Acta* 2007; 377 (1-2): 268-72.
 62. Astiz M, de Alaniz MJ, Marra CA. The impact of simultaneous intoxication with agrochemicals on the antioxidant defense system in rat. *Pestic Biochem Physiol* 2009; 94 (2-3): 93-9.
 63. Astiz M, de Alaniz MJ, Marra CA. Effect of pesticides on cell survival in liver and brain rat tissues. *Ecotoxicol Environ Saf* 2009; 72 (7): 2025-32.
 64. López O, Hernández AF, Rodrigo L, Gil F, Pena G, Serrano JL *et al.* Changes in antioxidant enzymes in humans with long-term exposure to pesticides. *Toxicol Lett* 2007; 171 (3): 146-53.
 65. Muniz JF, McCauley L, Scherer J, Lasarev M, Koshy M, Kow YW. *et al.* Biomarkers of oxidative stress and DNA damage in agricultural workers: a pilot study. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 227 (1): 97-107.
 66. Prakasam A, Sethupathy S, Lalitha S. Plasma and RBCs antioxidant status in occupational male pesticide sprayers. *Clin Chim Acta* 2001; 310 (2): 107-12.
 67. Griffiths HR, Møller L, Bartosz G, Bast A, Bertoni-Freddari C, Collins A. *et al.* Biomarkers. *Mol Aspects Med* 2002; 23 (1-3): 101-208.
 68. Knudsen LE, Hansen AM. Biomarkers of intermediate endpoints in environmental and occupational health. *Int J Hyg Environ Health* 2007; 210 (3-4): 461-70.
 69. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem* 2006; 52 (4): 601-23.
 70. de Zwart LL, Meerman JHN, Commandeur JNM, Vermeulen NP. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radic Biol Med* 1999; 26 (1-2): 202-26.
 71. Bhalli JA, Ali T, Asi MR, Khalid Z.M, Ceppi M, Khan QM. DNA damage in Pakistani agricultural workers exposed to mixture of pesticides. *Environ Mol Mutagen* 2009; 50 (1): 37-45.
 72. Weissman P. Reappraisal of the pharmacologic approach to treatment of type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 2002; 90 (5A): 42G-50G.
 73. American Diabetes Association Task Force for Writing Nutrition Principles and Recommendations for the Management of Diabetes and Related Complications. American Diabetes Association position statement: evidence-based nutrition principles and recommendations for the treatment and prevention of diabetes and related complications. *J Am Diet Assoc* 2002; 102 (1): 109-18.
 74. Garg SK, Ulrich HC. Achieving goal A1c in diabetes mellitus: practical strategies for success with insulin therapy. *Insulin* 2006; 1 (3): 109-21.
 75. Chowienczyk PJ, Brett SE, Gopaul NK, Meeking D, Marchetti M, Russell-Jones DL, *et al.* Oral treatment with an antioxidant (raxofelast) reduces oxidative stress and improves endothelial function in men with type II diabetes. *Diabetologia* 2000; 43 (8): 974-7.
 76. Gerstein HC, Riddle MC, Kendall DM, Cohen RM, Golland R, Feinglos MN, Kirk JK, *et al.* Glycemia treatment strategies in the Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes (ACCORD) trial. *Am J Cardiol* 2007; 99 (12A): 34i-43i.
 77. Chakraborty A, Chowdhury S, Bhattacharyya M. Effect of metformin on oxidative stress, nitrosative stress and inflammatory biomarkers in type 2 diabetes patients. *Diab Res Clin Pract* 2011; 93 (1): 53-62.
 78. Chonchol M, Katz R, Fried LF, Sarnak MJ, Siscovick DS, Newman AB, *et al.* Glycosylated hemoglobin and the risk of death and cardiovascular mortality in the elderly. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2010; 20 (1): 15-21.
 79. Van Hateren KJ, Landman GW, Kleefstra N, Drion I, Groenier KH, Houweling ST, *et al.* Glycaemic control and the risk of mortality in elderly type 2 diabetic patients (ZODIAC-20). *Int J Clin Pract* 2011; 65 (4):415-19.
 80. Huang ES, Liu JY, Moffet HH, John PM, Karter AJ. Glycemic control, complications, and death in older diabetic patients: the diabetes and aging study. *Diabetes Care* 2011; 34 (6):1329-1336.
 81. Dailey G. Overall mortality in diabetes mellitus: where do we stand today? *Diabetes Technol Ther* 2011; 13 Supl 1: S65-S74.
 82. Palacka P, Kucharska J, Murin J, Dostalova K, Okkelova A, Cizova M, *et al.* Complementary therapy in diabetic patients with chronic complications: a pilot study. *Bratisl Lek Listy* 2010; 111 (4): 205-11.
 83. Suksomboon N, Poolsup N, Sinprasert S. Effects of vitamin E supplementation on glycaemic control in type 2 diabetes: systematic review of randomized controlled trials. *J Clin Pharm Ther* 2011; 36 (1):53-63.

84. Garcia-Medina JJ, Pinazo-Duran MD, Garcia-Medina M, Zanon-Moreno V, Pons-Vazquez S. A 5-year follow-up of antioxidant supplementation in type 2 diabetic retinopathy. *Eur J Ophthalmol* 2011; 21 (5): 637-43.
85. Golbidi S, Ebadi SA, Laher I. Antioxidants in the treatment of diabetes. *Curr Diabetes Rev* 2011; 7 (2): 106-25.
86. González-Rodríguez DC, Solano RL, González-Martínez JC. Adiponectina, insulina y glicemia, en individuos con sobrepeso u obesidad sometidos a un régimen de alimentación rico en carbohidratos complejos. *Arch Latinoam Nutr* 2009; 59 (3): 296-303.
87. Das UN, Reposs G, Dain A, Eynard AR. L-arginine, NO and asymmetrical dimethylarginine in hypertension and type 2 diabetes. *Front Biosci* 2011; 16: 13-20.
88. Abete I, Goyenechea E, Zulet MA, Martínez JA. Obesity and metabolic syndrome: potential benefit from specific nutritional components. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2011; 21 Supl 1: B1-15.
89. Mitri J, Muraru MD, Pittas AG. Vitamin D and type 2 diabetes: a systematic review. *Eur J Clin Nutr* 2011; 65 (9): 1005-15.
90. Kelley DS, Adkins Y, Woodhouse LR, Swislocki A, Mackey BE, Siegel D. Docosahexaenoic acid supplementation improved lipocentric but not glucocentric markers of insulin sensitivity in hypertriglyceridemic men. *Metab Syndr Relat Disord* 2012; 10 (1): 32-8.
91. Blicklé JF, Hancu N, Piletic M, Profozic V, Shestakova M, Dain MP, *et al.* Insulin glargine provides greater improvements in glycaemic control vs. intensifying lifestyle management for people with type 2 diabetes treated with OADs and 7-8% A1c levels. The TULIP study. *Diabetes Obes Metab* 2009; 11 (4): 379-86.
92. Ametov AS, Kochergina II, Ulanova KA. Effect of insulin therapy on insulin resistance and risk for ischemic heart disease and death for cardiovascular pathology in patients with diabetes mellitus type 2. *Ter Arkh* 2010; 82 (3): 42-6.
93. Porcellati F, Bolli GB, Fanelli CG. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of basal insulins. *Diabetes Technol Ther* 2011; 13 Sup 1: S15-24.
94. Tibaldi JM. Intensifying insulin therapy in type 2 diabetes mellitus: dosing options for insulin analogue premixes. *Clin Ther* 2011; 33 (11): 1630-42.
95. Mori Y. Exploring an optimal approach to the use of oral hypoglycemic agents based on CGM results: implications for combination therapy with oral hypoglycemic agents. *Nihon Rinsho* 2010; 69 (8): 1505-14.
96. Kerr D, Olateju T. Using insulin in type 2 diabetes: in need of a renaissance? *J Diabetes Sci Technol* 2011; 5 (4): 829-33.
97. Kapitzka C, Zijlstra E, Heinemann L, Castelli MC, Riley G, Heise T. Oral insulin: a comparison with subcutaneous regular human insulin in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2010; 33 (6): 1288-90.
98. Rebolledo OR, Marra CA, Raschia A, Rodríguez S, Gagliardino JJ. Abdominal adipose tissue: early metabolic dysfunction associated to insulin resistance and oxidative stress induced by an unbalanced diet. *Horm Metab Res* 2008; 40 (11): 794-800.
99. Rebolledo A, Rebolledo OR, Marra CA, García ME, Roldán Palomo AR, Rimorini L, Gagliardino JJ. Early alterations in vascular contractility associated to changes in fatty acid composition and oxidative stress markers in perivascular adipose tissue. *Cardiovasc Diabetol* 2010; 9 (1): 65-73.
100. García ME, Marra CA, Rebolledo OR. Glycoxidative stress-induced damage on lipid profile in a fructose-enriched diet model of insulin resistance in rats. *Arch Physiol Biochem* 2010; 116 (1): 42-9.
101. Marra FA, Alaniz MJT de, Marra CA. Biomarkers of atherogenesis and endothelial dysfunction in diabetic type 2 patients under hypoglycemic agents or a combination of hypoglycemic drugs plus insulin therapy. *Horm Metab Res* 2012; no publicado.
102. Clapp BR, Hingorani AD, Kharbada RK, Mohamed-Ali V, Stephens JW, Vallance P, *et al.* Inflammation-induced endothelial dysfunction involves reduced nitric oxide bioavailability and increased oxidant stress. *Cardiovasc Res* 2004; 64 (1): 172-8.
103. Accinni R, Rosina M, Bamonti F, Della Noce C, Tonini A, Bernacchi F, *et al.* Effects of combined dietary supplementation on oxidative and inflammatory status in dyslipidemic subjects. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2006; 16 (2): 121-7.
104. Glorian M, Limon I. L'athérosclérose, une maladie inflammatoire. *Rev Fr Lab* 2007; 389: 43-8.
105. Sprague AH, Khalil RA. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochem Pharmacol* 2009; 78 (6): 539-52.
106. Rivara ML, Di Genaro G, González Romero DJ. Homocisteína y enfermedad vascular oclusiva. *Rev Postgrad Cat Med* 2006; 154: 24-30.
107. Avramoglu RK, Basciano H, Adeli K. Lipid and lipoprotein dysregulation in insulin resistant states. *Clin Chim Acta* 2006; 368 (1-2): 1-19.
108. Gómez M, Valle V, Arós F, Sanz G, Sala J, Fiol M, *et al.* LDL oxidada, lipoproteína(a) y otros factores de riesgo emergentes en el infarto agudo de miocardio (estudio FORTIAM). *Rev Esp Cardiol* 2009; 62 (4): 373-82.
109. Salcedo E, Zaro MJ, Rosino A, Martínez de Artola V. Estudio de la Lp(a) como marcador bioquímico de enfermedad ateromatosa. *Rev Serv Anal Clin HVR* 2010; 11: 1-9.
110. Badimón L, Martínez-González J. Disfunción endotelial. *Rev Esp Cardiol (Supl.)* 2006; 6 Supl A: 21-30.
111. Imrie H, Abbas A, Kearney M. Insulin resistance, lipotoxicity and endothelial dysfunction. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1801 (3): 320-6.
112. Herrera MD, Mingorance C, Rodríguez-Rodríguez R, Alvarez de Sotomayor M. Endothelial dysfunction and aging: an update. *Ageing Res Rev* 2010; 9 (2): 142-52.
113. Ouviaña SM, Palmer L, Sasetti B. Endotelina-1, óxido nítrico y factor von Willebrand en pacientes hipertensos diabéticos de tipo 2. *Acta Bioquim Clin Latinoam* 2004; 38 (4): 471-6.

114. Le DS, Miles R, Savage PJ, Cornell E, Tracy RP, Knowler WC, *et al.* The association of plasma fibrinogen concentration with diabetic microvascular complications in young adults with early-onset of type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2008; 82 (3): 317-23.
115. Mishima Y, Kuyama A, Tada A, Takahashi K, Ishioka T, Kibata M. Relationship between serum tumor necrosis factor- α and insulin resistance in obese men with Type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 2011; 52 (2): 119-23.
116. Galland F, Duvillard L, Petit JM, Lagrost L, Vaillant G, Brun JM, *et al.* Effect of insulin treatment on plasma oxidized LDL/LDL-cholesterol ratio in type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab* 2006; 32 (6): 625-31.
117. Duvillard L, Florentin E, Lizard G, Petit JM, Galland F, Monier S, *et al.* Cell surface expression of LDL receptor is decreased in type 2 diabetic patients and is normalized by insulin therapy. *Diabetes Care* 2003; 26 (5): 1540-4.
118. Pandey KB, Mishra N, Rizvi SI. Protein oxidation biomarkers in plasma of type 2 diabetic patients. *Clin Biochem* 2010; 43 (4-5): 508-11.

Aceptado para su publicación el 10 de mayo de 2013