

Mieloperoxidasa como indicador de estrés oxidativo en el síndrome metabólico

Myeloperoxidase as an Indicator of Oxidative Stress in Metabolic Syndrome

MARÍA L. GARAGIOLA¹, MARIANA TARÁN¹, MARÍA P. SCRIBANO¹, ARIEL BALCEDA¹, EMILIA GARCÍA¹, ISMAEL FONSECA³, MÓNICA MOYA^{1,2}, MARÍA C. BAEZ^{1,2}

RESUMEN

Introducción: Los incrementos en la actividad de la mieloperoxidasa (MPO) serían el nexo entre el aumento de la respuesta inflamatoria y el estrés oxidativo (EO) en el síndrome metabólico (SM).

Objetivo: Determinar la actividad de la enzima MPO asociada con EO en animales con SM y establecer su relación con las probables lesiones cardiovasculares.

Material y métodos: Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, que se dividieron en: Grupo A, control (n = 12) y Grupo B, inducción de SM (n = 12). El SM se indujo con la administración de fructosa al 10% diluida en agua de bebida durante 6 semanas. Se cuantificaron insulina (µU/ml), glucemia (mg/dl), perfil lipídico (mg/dl), HOMA (homeostatic model assessment), MPO (UI/ml) y actividad de la superóxido dismutasa (SOD) (U/ml). Se estudió la histología de la aorta torácica y el corazón por microscopía óptica.

Resultados: Se observaron niveles de glucemia (176 ± 17,3 mg/dl), insulina (29,5 ± 4,52 µU/ml), HOMA (11 ± 1,3), colesterol total (133 ± 9,6 mg/dl) y triglicéridos (75 ± 12,9 mg/dl) incrementados significativamente en el Grupo B en comparación con el Grupo A: glucemia (115 ± 1,1 mg/dl), insulina (4 ± 0,82 µU/ml), HOMA (3 ± 0,38), colesterol total (69,7 ± 1,6 mg/dl) y triglicéridos (46,2 ± 6 mg/dl) (p < 0,001 para todas las variables); se verificó disminución significativa de los valores de HDL (28,3 ± 1,14 mg/dl) en el Grupo B en comparación con el Grupo A (61 ± 1,01 mg/dl) (p < 0,001), validando así el modelo experimental de SM. La actividad de la MPO se incrementó significativamente en el Grupo B (181,3 ± 15,7 UI/ml) respecto del Grupo A (116,07 ± 4,2 UI/ml) (p < 0,001). Similar comportamiento presentó la actividad antioxidante de la SOD en el Grupo B (181 ± 6 U/ml) respecto del Grupo A (138 ± 3,6 U/ml) (p < 0,01). Las microscopías ópticas de corazón y de aorta torácica evidenciaron cambios histopatológicos en los animales con SM inducido.

Conclusión: Los incrementos de la MPO y la SOD en el Grupo B demostrarían la presencia de EO, con repercusión a nivel vascular en el SM.

Palabras clave: Mieloperoxidasa - Estrés oxidativo - Síndrome metabólico - Insulinorresistencia - Riesgo cardiovascular

ABSTRACT

Background: Increased myeloperoxidase (MPO) activity would be the link between the rise of the inflammatory response and oxidative stress (OS) in metabolic syndrome (MS).

Objective: The aim of this study was to determine the enzymatic activity of MPO associated with OS in animals with MS and establish their relationship with probable cardiovascular injury.

Methods: Male Wistar rats were divided into two groups: Group A, control (n=12) and Group B, induced MS (n=12). Metabolic syndrome was produced by 6-week administration of 10% fructose diluted in the drinking water. Insulin (mU/ml), glucose (mg/dl), lipid panel (mg/dl), HOMA (homeostatic model assessment), MPO (IU/ml) and superoxide dismutase (SOD) activity (U/ml) were measured. Light microscopy was used for the histological study of the heart and thoracic aorta.

Results: Group B showed significantly increased levels of plasma glucose (176±17.3 mg/dl), insulin (29.5±4.52 mU/ml), HOMA (11±1.3), total cholesterol (133±9.6 mg/dl) and triglycerides (75±12.9 mg/dl) compared with Group A: plasma glucose (115±1.1 mg/dl), insulin (4±0.82 mU/ml), HOMA (3±0.38), total cholesterol (69.7±1.6 mg/dl) and triglycerides (46.2±6 mg/dl), (p<0.001 for all variables). A significant decrease in HDL (28.3±1.14 mg/dl) in Group B vs. Group A (61±1.0 mg/dl) (p<0.001) validated the experimental MS model. Myeloperoxidase activity increased significantly in Group B (181.3±15.7 IU/ml) vs. Group A (116.07±4.2 IU/ml) (p<0.001). A similar behavior was seen with SOD antioxidant activity in Group B (181±6 U/ml) vs. Group A (138±3.6 U/ml) (p <0.01). Light microscopy of the heart and thoracic aorta revealed histopathological changes in animals with induced MS.

Conclusion: Increased MPO and SOD in Group B would indicate the presence of OS in MS, with consequences at the vascular level.

Key words: Myeloperoxidase - Oxidative Stress - Metabolic Syndrome - Insulin Resistance - Cardiovascular Risk

REV ARGENT CARDIOL 2016;84:538-542. <http://dx.doi.org/10.7775/rac.es.v84.i6.9946>

Recibido: 27/10/2016 - Aceptado: 18/11/2016

Dirección para separatas: Garagiola María Luz - Cátedra de Física Biomédica. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba - e-mail: garagiolamarialuz@hotmail.com

¹ Cátedra de Física Biomédica. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba

² Física Biomédica. Facultad de Medicina, Universidad Nacional de La Rioja

³ II Cátedra de Anatomía Patológica, Facultad de Ciencias médicas. Universidad Nacional de Córdoba

FUENTES DE APOYO:

- Secretaría de Ciencia y Técnica (SECYT) de la Universidad Nacional de Córdoba
- Ciencia y Técnica (CYCYT) de la Universidad Nacional de La Rioja
- PID 2010, MINCYT, Ministerio de Industria de la Provincia de Córdoba

Abreviaturas

ECV	Enfermedad cardiovascular	HOMA	Homeostatic model assessment
EO	Estrés oxidativo	LDL	Lipoproteínas de baja densidad
ERN	Especies reactivas del nitrógeno	MPO	Mieloperoxidasa
ERO	Especies reactivas del oxígeno	SM	Síndrome metabólico
HDL	Lipoproteínas de alta densidad	SOD	Superóxido dismutasa

INTRODUCCIÓN

Actualmente se propone al estrés oxidativo (EO) como potencial inductor de inflamación, con implicación en el desarrollo de patologías crónicas a nivel sistémico, como el síndrome metabólico (SM). La presencia de EO implica un desequilibrio en el metabolismo óxido-reducción generado por la producción no controlada de especies reactivas del oxígeno (ERO) y del nitrógeno (ERN). (1, 2) Es conocido que la sobreproducción de ERO y ERN a nivel de la pared vascular genera disfunción endotelial, condición que incrementaría el riesgo de desarrollo de enfermedades cardiovasculares (ECV).

El estado prooxidativo desencadenado por el EO puede inducir insulinoresistencia al provocar la fosforilación de los receptores de insulina e incremento en los niveles de citocinas proinflamatorias, ambas condiciones que se expresan en el SM. (3) Se ha postulado además que la excesiva formación de especies reactivas repercutiría directamente en la acción insulínica, modificando los mecanismos enzimáticos antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD). La enzima SOD cataliza la descomposición de oxidantes nocivos neutralizando su toxicidad y evitando que sus concentraciones se conviertan en patológicas; (4) de esta forma, el EO condicionaría la disfuncionalidad del endotelio. (5)

En la búsqueda continua de nuevos marcadores prooxidantes que permitan identificar los determinantes del SM adquiere importancia la enzima mieloperoxidasa (MPO). (6) La actividad excesiva de la MPO puede inducir daño a tejidos por la producción de oxidantes y, consecuentemente, formar especies reactivas de lípidos y proteínas. En estudios recientes se ha demostrado que la exposición de lipoproteínas de baja densidad (LDL) a leucocitos activados produce, a través de la MPO, especies nitrogenadas y halogenadas que facilitan procesos de peroxidación lipídica, nitración proteica y conversión a formas proaterogénicas de LDL en la pared vascular. (7) Además, la MPO participa en la generación de lipoproteínas de alta densidad (HDL) disfuncionales transformando sus propiedades antiinflamatorias en proinflamatorias. (8)

Asimismo, los estados proinflamatorio y prooxidativo se han relacionado con daño en el miocardio y deterioro endotelial, (9) de lo que se desprende la importancia de la implementación de biomarcadores oxidativos como la MPO en etapas asintomáticas del SM. Esta enzima podría definir el riesgo cardiovascular y sería una prueba indicativa para dicha patología. (10)

El objetivo de esta investigación fue determinar la actividad de la MPO asociada con el EO en animales con

SM y establecer su relación con las probables lesiones cardiovasculares.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Se realizó un estudio experimental y analítico utilizando ratas macho de la cepa Wistar, endocriadas en el Instituto de Fisiología de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba, de un peso promedio de 280 ± 20 g, alimentadas con dieta balanceada para ratas con un mínimo de 17% de contenido proteico.

Grupos estudiados

Se utilizaron 24 ratas macho, divididas en dos grupos, cada uno de los cuales estuvieron constituidos por 12 animales; se estudiaron en forma secuencial y se encuadraron en las diferentes situaciones experimentales:

- Grupo A: Control, animales sin intervención (n = 12).
- Grupo B: SM inducido con dieta hídrica suplementaria con fructosa al 10% en agua de bebida durante 6 semanas (n = 12).

Inducción del síndrome metabólico

El SM se indujo mediante la administración de fructuosa al 10% diluida en agua de bebida durante 6 semanas. (11) Para corroborar que los animales hubieran presentado SM, se determinaron los niveles de glucosa, insulina, triglicéridos, colesterol total y colesterol HDL en ayunas y se realizó el cálculo de HOMA (*homeostatic model assessment*).

Determinaciones bioquímicas

Obtención del plasma

La sangre se obtuvo por decapitación de los animales, previamente anestesiados con ketamina (Ketal®) (16,25 mg/kg) y xylazina 2% (Alfasan®) (2 mg/kg), a los 42 días de administración de fructosa o agua común y luego de 24 horas de ayuno. La sangre así obtenida se recolectó en cápsulas de Petri con una mezcla de anticoagulante constituido por oxalato de amonio y de potasio en una proporción de 2:1. Para las determinaciones de SOD y MPO se utilizaron muestras de sangre anticoagulada con EDTA. Posteriormente, la sangre se centrifugó a 3.000 rpm durante 15 minutos para obtener el plasma y el lisado de glóbulos rojos.

Se procedió a la cuantificación de las siguientes variables:

- Glucemia: Los niveles plasmáticos de glucosa se determinaron utilizando *kits* comerciales (Wiener, Buenos Aires, Argentina) por espectrofotometría según método enzimático; los resultados se expresaron en mg/dl. (12)
- Insulinemia: Los niveles de insulina se cuantificaron por radioinmunoanálisis; los resultados se expresaron en μ U/ml. (13)
- El modelo de evaluación de homeostasis (HOMA) se utilizó como índice para medir el grado de resistencia a la insulina y se calculó mediante la fórmula $[\text{insulina (mU/ml)} \times \text{glucemia (mmol/L)}] / 22,5$. (14)
- Perfil lipídico: Se realizó el análisis del perfil lipídico por

método enzimático; (15) los resultados se expresaron en mg/dl.

- MPO: La actividad enzimática de la MPO se cuantificó por ELISA; los resultados se expresaron en UI/ml. (16)
- Actividad enzimática de la SOD: Se cuantificó la actividad enzimática por espectrofotometría en lisado de glóbulos rojos utilizando *kit* de Randox; los resultados se expresaron en U/ml. (17)

Obtención del material para anatomía patológica por microscopía óptica

En todos los grupos estudiados se seleccionaron muestras de corazón, en los que se realizaron 16 cortes de 4 μ m en sentido longitudinal, y muestras de aorta torácica desde su origen hasta la última porción torácica, donde se realizaron 30 secciones de 4 μ m cada una. El material procesado para anatomía patológica se conservó en formol *buffer* al 10% y se coloreó con hematoxilina-eosina. Posteriormente, los preparados se analizaron por microscopía óptica con una amplificación de 40 \times , 60 \times y 400 \times .

Análisis estadístico

Se realizaron comparaciones de todas las combinaciones posibles de pares de medias por ANOVA multivariado y como prueba *post hoc* se utilizó Hotelling. Se estableció un nivel de significación de $p < 0,05$ para todos los casos.

Consideraciones éticas

En los procedimientos realizados se respetaron las normas y los protocolos aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Facultad de Ciencias Médicas de Universidad Nacional de Córdoba, basado en las normativas de la American Physiological Society, "Principios Rectores en el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio" (NIH Publication 85-23, 1996).

RESULTADOS

Las características bioquímicas para validar el modelo de SM en los grupos estudiados se detallan en la Tabla 1.

Los niveles de glucemia, insulinemia, colesterol total y triglicéridos incrementados juntamente con un HOMA elevado y valores disminuidos de HDL en el Grupo B (SM) validan el modelo experimental (véase Tabla 1).

La cuantificación de la MPO evidenció un aumento estadísticamente significativo de la actividad en el grupo con SM inducido ($181,3 \pm 15,7$ U/ml) respecto

Tabla 1. Niveles plasmáticos de glucosa, insulina y perfil lipídico en el Grupo A (control) y el Grupo B (síndrome metabólico)

	Control (A)	SM (B)
Glucemia (mg/dl)	115 \pm 1,1	176 \pm 17,3*
Insulinemia (μ U/ml)	4 \pm 0,82	29,5 \pm 4,52*
HDL (mg/dl)	61 \pm 0,01	28,3 \pm 1,14*
Colesterol total (mg/dl)	69,7 \pm 1,6	133 \pm 9,6*
Triglicéridos (mg/dl)	46,2 \pm 6	75 \pm 12,9*
HOMA	3 \pm 0,38	11 \pm 1,3*

Los resultados se expresan como media \pm error estándar de la media. n = 12. * $p < 0,001$ vs. ratas control (A). SM: Síndrome metabólico. HDL: Lipoproteínas de alta densidad. HOMA: *Homeostatic model assessment*.

del grupo control ($116,07 \pm 4,2$ U/ml) ($p < 0,001$); el incremento de la actividad indicaría el estado proinflamatorio en los animales con SM, como se grafica en la Figura 1.

Los resultados de la actividad enzimática de la SOD en lisado de glóbulos rojos en ratas con SM y ratas control se muestran en la Figura 2.

La persistencia del estímulo proinflamatorio y prooxidativo en el Grupo B (SM) (181 ± 6 U/ml) generó un incremento significativo en la actividad enzimática de la SOD cuando se comparó con el Grupo A (control) ($138 \pm 3,6$ U/ml) ($p < 0,01$).

El incremento enzimático de MPO y SOD en animales con SM inducido experimentalmente respecto del grupo control indicaría la persistencia del estímulo proinflamatorio y prooxidativo en el grupo con SM.

En las Figuras 3 y 4 puede observarse la repercusión a nivel vascular y cardíaco en ratas con SM inducido experimentalmente.

DISCUSIÓN

En el modelo experimental de SM se pudo observar que las ratas que reciben fructosa en el agua de bebida en forma crónica se constituyen en un modelo útil para el

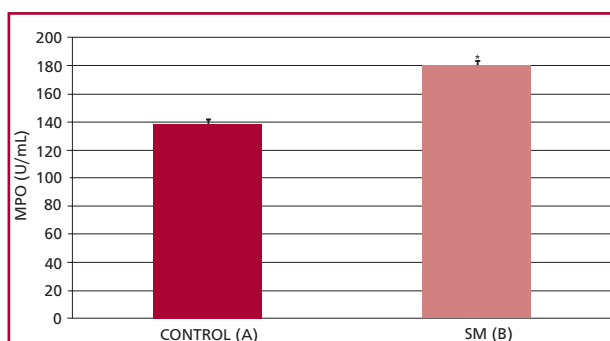


Fig. 1. Cuantificación de la "Actividad de mieloperoxidasa (MPO)" en ratas control (A) y con síndrome metabólico (SM [B]). Los valores están expresados como media \pm error estándar de la media. n = 12. * $p < 0,001$ vs. ratas control (A).

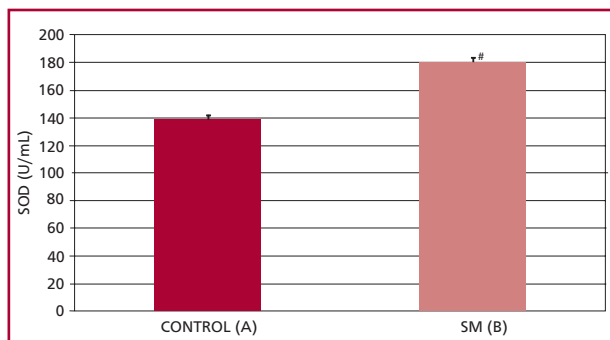


Fig. 2. Análisis de la actividad enzimática de la superóxido dismutasa (SOD) en ratas control (A) y con síndrome metabólico (SM [B]). Los valores están expresados como media \pm error estándar de la media. n = 12. # $p < 0,01$ vs. ratas control (A).

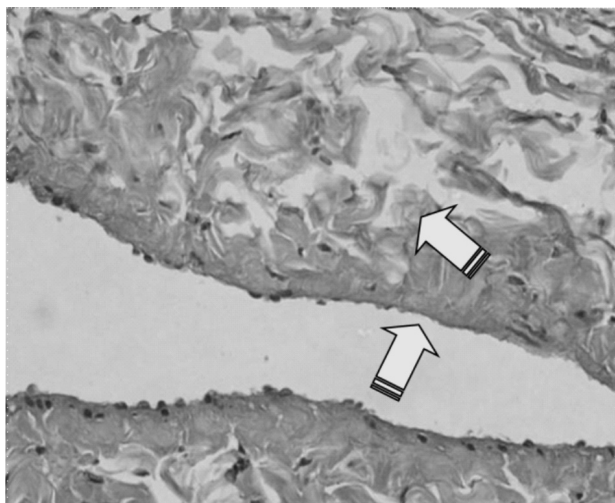


Fig. 3. Microscopía óptica de aorta torácica de ratas con síndrome metabólico inducido que muestra denudación endotelial con hematomas adheridos, engrosamiento intimal, cambios mixoides en la matriz extracelular y desorganización de la lámina muscular interna en la mayoría de los cortes (*cabeza de flecha*) (HE 60×).

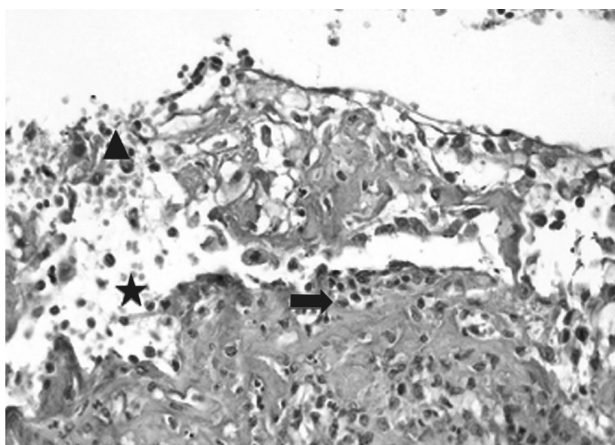


Fig. 4. Microscopía óptica cardíaca de ratas con síndrome metabólico inducido que evidencia pericardio fibrolipomatoso (*estrella*), con presencia de exudado fibrinoleucocitario con detritos celulares (*triángulo*) e infiltrado inflamatorio mononuclear y polimorfonuclear neutrófilo (*flecha*). Se observan, además, vasos de paredes engrosadas con intenso infiltrado inflamatorio mononuclear y polimorfonuclear neutrófilo (fenómenos de vasculitis) (HE 60).

diagnóstico de los factores que configuran el SM, que se induce por cambios en la ingesta y expresa numerosas alteraciones similares al sujeto humano con SM. (18) La administración de fructosa al 10% generó en el Grupo B (SM) hiperglucemia, hipertrigliceridemia, disminución de niveles de HDL y aumento de niveles circulantes de colesterol total junto con hiperinsulinemia, corroborando que el modelo experimental presenta las manifestaciones características del SM. Además, la evaluación de la homeostasis glucemia/insulina, parámetro HOMA, constituye un modelo útil para cuantificar la insulinorresistencia, reflejando la función de las células beta, y necesita solo una muestra

de suero en ayuno. En nuestros resultados se observó un incremento del valor de HOMA en el grupo con SM, lo cual demuestra la presencia de insulinorresistencia.

La enzima MPO es un importante factor de riesgo cardiovascular al generar un aumento en la respuesta inflamatoria capaz de potenciar los efectos oxidativos de su cosustrato peróxido de hidrógeno (H_2O_2), con un rol principal en el daño e inflamación endotelial. (19)

Varias investigaciones describen la asociación de estados de inflamación crónica, insulinorresistencia con aumento en la actividad de la MPO, (20) incremento del EO, disfunción endotelial y su repercusión sobre el riesgo cardiovascular. (21) En nuestro trabajo, la relación positiva significativa entre los valores en ayuno de glucosa/insulina (HOMA) y la actividad de la MPO refuerzan la probable participación de la disglucemia en la alteración de la homeostasis del metabolismo redox en animales con SM.

El aumento en la actividad de la SOD asociada con modificaciones de glucemia en ayuno, insulinorresistencia, dislipidemia por disminución de HDL e hipertrigliceridemia e incremento de los componentes proinflamatorios y prooxidativos son indicadores del EO presente en el modelo experimental de SM. Esta situación refleja la importancia de la SOD como mecanismo antioxidante endógeno que intenta compensar el aumento de radicales libres, aunque no siempre es suficiente, ya sea por su baja productividad o por superar la tasa de producción enzimática. (22-24) Simultáneamente con los parámetros bioquímicos analizados en este modelo experimental, los resultados histopatológicos analizados por microscopía óptica de aorta torácica y de corazón objetivan la repercusión a nivel vascular de esta patología. (25)

Es probable que las señales proinflamatorias y prooxidativas desencadenadas por los biomarcadores presentes en el modelo experimental de SM activen el endotelio utilizando el radical superóxido para generar la reacción en cadena de radicales libres que inician la peroxidación lipídica, causando pérdida de la estructura y de la función celular, como se observa en la histopatología de corazón y aorta torácica. (26) Varios autores han expresado la combinación del estado proinflamatorio, insulinorresistencia y obesidad con la progresión de la disfunción endotelial, (27-29) siendo un factor común para el desarrollo de SM y ECV.

Los resultados de este trabajo demostrarían que la insulinorresistencia evidenciada por hiperinsulinismo, HOMA modificado, niveles disminuidos de HDL e hipertrigliceridemia se asocian con propiedades proinflamatorias y disfunción endotelial demostrada en el modelo experimental de SM.

CONCLUSIÓN

El incremento en la actividad enzimática de la MPO y la SOD en el grupo con SM inducido juntamente con los hallazgos anatomopatológicos demostrarían el aumento del EO y justificarían la utilidad de estos

marcadores para la evaluación del riesgo cardiovascular en estadios tempranos del SM.

Declaración de conflicto de intereses

Los autores declaran que no poseen conflicto de intereses.

(Véanse formularios de conflicto de intereses de los autores en la web/ Material suplementario).

BIBLIOGRAFÍA

1. Scribano MP, Baez MC, Becerra F, Tarán MD, Signorini F, Balceda AG, et al. Effects of atorvastatin on oxidative stress biomarkers and mitochondrial morphofunctionality in hyperfibrinogenemia-induced atherogenesis. *Adv Med* 2014, Article ID 947258.
2. Pastori D, Carnevale R, Pignatelli P. Is there a clinical role for oxidative stress biomarkers in atherosclerotic diseases? *Intern Emerg Med* 2014;9:123-31. <http://doi.org/bv7c>
3. Dabrowski P, Majdan M. Insulin resistance and metabolic syndrome- a different image of disorders in rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. *Wiad Lek* 2015;68:235-41.
4. Karbach S, Wenzel P, Waisman A, Münzel T, Daiber A. eNOS uncoupling in cardiovascular diseases- the role of oxidative stress and inflammation. *Curr Pharm Des* 2014;20:3579-94. <http://doi.org/bv7d>
5. Yubero-Serrano EM, Delgado-Lista J, Peña-Orihuela P, Perez-Martinez P, Fuentes F, Marin C, et al. Oxidative stress is associated with the number of components of metabolic syndrome: LIPGENE study. *Exp Mol Med* 2013;45:e28. <http://doi.org/bv7f>
6. Da Fonseca LJ, Nunes-Souza V, Guedes G da S, Schettino-Silva G, Mota-Gomes MA, Rabelo LA. Oxidative status imbalance in patients with metabolic syndrome: role of the myeloperoxidase/hydrogen peroxide axis. *Oxid Med Cell Longev* 2014;2014:898501. <http://doi.org/bv7g>
7. Sokolov AV, Kostevich VA, Runova OL, Gorudko IV, Vasilyev VB, Cherenkevich SN, et al. Proatherogenic modification of LDL by surface-bound myeloperoxidase. Sokolov AV, *Chem Phys Lipids* 2014;180:72-80. <http://doi.org/bv7h>
8. Yixin T, Qian X, Haiyang P, Zhaoya L, Tianlun Y, Zaixin Y, et al. The role of vascular peroxidase 1 in ox-LDL-induced vascular smooth muscle cell calcification. *Atherosclerosis* 2015;243:357-63. <http://doi.org/bv7j>
9. Zhang X, Dong L, Wang Q, Xie X. The relationship between fasting plasma glucose and MPO in patients with acute coronary syndrome. *BMC Cardiovasc Disord* 2015;25:15:93.
10. Shi P, Goodson JM, Hartman ML, Hasturk H, Yaskell T, Vargas J, et al. Continuous metabolic syndrome scores for children using salivary biomarkers. *PLoS One* 2015;10:e0138979. <http://doi.org/bv7k>
11. Renna N, Vázquez M, González S, Lama C, Cruzado M, Miatello R. Expresión vascular de factores de transcripción proinflamatorios en un modelo de síndrome metabólico. *Rev Argent Cardiol* 2007;75:36-41.
12. Esposito K, Nappo F, Marfella R, Giugliano G, Giugliano F, Ciotola M, et al. Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans: role of oxidative stress. *Circulation* 2002;106:2067-72. <http://doi.org/fdwjv2>
13. National Diabetes Data Group: Classification and diagnosis of diabetes and other categories of glucose intolerance. *Diabetes* 1979;28:1039-57. <http://doi.org/bscx>
14. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28:412-9. <http://doi.org/dbht47>
15. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001;285:2486-97. <http://doi.org/d39ksv>
16. Bergmeyer HU. Methods of enzymatic analysis. Vch Pub; 3 Sub edition, 1983.
17. Woolliams JA, Wiener G, Anderson PH, McMurray CH. Variation in the activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase and in the concentration of copper in the blood in various breed crosses of sheep. *Res Vet Sci* 1983;34:253-6.
18. Ajiboye TO, Raji HO, Adeleye AO, Adigun NS, Giwa OB, Ojewuyi OB, et al. Hibiscus sabdariff calyx palliates insulin resistance, hyperglycemia, dyslipidemia and oxidative rout in fructose-induced metabolic syndrome rats. *J Sci Food Agric* 2016;96:1522-31. <http://doi.org/bv7m>
19. Rovira-Llopis S, Rocha M, Falcon R, de Pablo C, Alvarez A, Jover A, et al. Is myeloperoxidase a key component in the ROS-induced vascular damage related to nephropathy in type 2 diabetes? *Antioxid Redox Signal* 2013;19:1452-8. <http://doi.org/bv7n>
20. Victor M, Rovira-Llopis S, Bañuls C, Diaz-Morales N, Martinez de Marañon A, Rios-Navarro C, et al. Insulin resistance in PCOS patients enhances oxidative stress and leukocyte adhesion: Role of myeloperoxidase. *PLoS One* 2016;11:e0151960. <http://doi.org/bv7p>
21. Prieto D, Contreras C, Sánchez A. Endothelial dysfunction, obesity and insulin resistance. *Curr Vasc Pharmacol* 2014;12:412-26. <http://doi.org/bv7q>
22. Feoli AM, Macagnan FE, Piovesan CH, Bodanese LC, Siqueira IR. Xanthine oxidase activity is associated with risk factors for cardiovascular disease and inflammatory and oxidative status markers in metabolic syndrome: effects of a single exercise session. *Oxid Med Cell Longev* 2014;2014:587083. <http://doi.org/bv7r>
23. Vavrova L, Kodydkova J, Zeman M, Dusejovska M, Macasek J, Stankova B, et al. Altered activities of antioxidant enzymes in patients with metabolic syndrome. *Obes Facts* 2013;6:39-47. <http://doi.org/bv7s>
24. El Assar M, Ruiz de Adana JC, Angulo J, Pindado Martínez ML, Hernández MA, Rodríguez-Mañas L. Preserved endothelial function in human obesity in the absence of insulin resistance. *J Transl Med* 2013;11:263. <http://doi.org/bv7t>
25. Suman RK, Mohanty IR, Borde MK, Maheshwari U, Deshmukh YA. Development of an experimental model of diabetes co-existing with metabolic syndrome in rats. *Advances in Pharmacological Sciences Article ID 9463476*.
26. Bernabé García J, Zafrilla Rentero P, Mulero Cánovas J, Gómez Jara P, Leal Hernández M, Abellán Alemán J. Biochemical and nutritional markers and antioxidant activity in metabolic syndrome. *Endocrinol Nutr* 2014;61:302-8. <http://doi.org/f2p5rz>
27. Mahendra JV, Kumar SD, Anuradha TS, Prashanth T, Nagaraj RS, Vishali V. Plasma fibrinogen in type 2 diabetic patients with metabolic syndrome and its relation with ischemic heart disease (IHD) and retinopathy. *J Clin Diagn Res* 2015;9:BC18-BC21.
28. Sung KC, Ryu S, Lee JY, Lee SH, Cheong ES, BChir Wild SH, et al. Fatty liver, insulin resistance, and obesity: relationships with increase in coronary artery calcium over time. *Clin Cardiol* 2016;39:321-8. <http://doi.org/bv7v>
29. Bhatia LS, Curzen NP, Calder PC. Non-alcoholic fatty liver disease: a new and important cardiovascular risk factor? *Eur Heart J* 2012;33:1190-200. <http://doi.org/bv7w>