

Evaluación de actividad de la enzima arginasa en pacientes con diabetes mellitus en Veracruz, México.

Juan Carlos Pérez-Acosta¹, Silvia Garrido-Llanos², Blanca Estela Trejo-Sánchez³, José Rubén García-Sánchez⁴, Ivonne María Olivares-Corichi⁴, José Arnold González-Garrido^{1*}.

¹Licenciatura de Q.F.B., División Académica de Ciencias Básicas. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Cunduacán, Tabasco, México. ²Hospital General Córdoba. Departamento de Bioquímica Clínica. Córdoba, Veracruz. ³Universidad Juárez Autónoma de Tabasco-División Académica de Ciencias Básicas, Laboratorio Clínico de Ciencias Básicas, Cunduacán, Tabasco. ⁴Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional. Sección de Investigación y Posgrado.

ABSTRACT

Activity evaluation of the arginase enzyme in patients with diabetes mellitus in Veracruz, Mexico.

Introduction. Diabetes mellitus (DM) is a chronic disease that increases its frequency every year, and the search for strategies that are helpful in prevention or control are the objective in several studies. DM can decrease the bioavailability of nitric oxide (NO) by various mechanisms, presenting endothelial dysfunction. Several studies in animal models and in vitro studies suggest the participation of arginase in DM, being a direct competitor for the substrate of nitric oxide synthase (NOs), decreasing NO production.

Objectives. In this study, the activity of the enzyme arginase was determined in DM patients as a possible marker of the progress of the disease.

Material and Methods. A cross-sectional study was carried out, in which fasting blood tests of 12 hours were used, anthropometric parameters, glucose levels, cholesterol were determined, and plasma arginase activity was evaluated.

Results and conclusions. A total of 104 patients participated, 37 controls and 67 with DM. The results suggest that the activity of arginase does not play a role as a marker of the disease in patients with DM who do not show signs of advanced disease.

RESUMEN

Introducción. La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad crónica que incrementa su frecuencia cada año y la búsqueda de estrategias que sean de ayuda en la prevención o control son el objetivo en diversos estudios. La DM puede disminuir la biodisponibilidad de óxido nítrico (ON) mediante diversos mecanismos, presentándose la disfunción endotelial.

Historial del artículo

Recibido: 2 feb 2019
Aceptado: 23 abr 2019
Disponible online: 1 sep 2019

Palabras clave

Diabetes mellitus, arginasa, biomarcador.

Keywords

diabetes mellitus, arginase, biomarker.

Copyright © 2019 por autores y Revista Biomédica.

Este trabajo está licenciado bajo las atribuciones de la Creative Commons (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

*Autor para correspondencia:

José Arnold González Garrido, Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular Aplicada. Centro de Investigación de Ciencia y Tecnología Aplicada de Tabasco. Correo electrónico: arnold.gonzalez@ujat.mx <http://revistabiomedica.mx>

Diversos estudios en modelos animales y estudios *in vitro* sugieren la participación de arginasa en la DM, al ser un competidor directo por el sustrato de la sintasa de óxido nítrico (NOs) disminuyendo la producción de ON.

Objetivo. En este estudio, se determinó la actividad de la enzima arginasa como un posible marcador en el progreso de pacientes con DM.

Material y Métodos. Estudio transversal en el que participaron 104 personas 37 controles y 67 con DM, de las cuales se utilizaron muestras de suero de pacientes con ayuno de 12 horas. Se obtuvieron los parámetros antropométricos, los niveles de glucosa, colesterol y triglicéridos y se evaluó la actividad de la arginasa.

Resultados y conclusiones. Los resultados encontrados sugieren que la actividad de la arginasa no tiene un papel como marcador de la enfermedad en pacientes con DM que no presentan signos avanzados.

INTRODUCCIÓN

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2016, en México se identifica a la diabetes entre las primeras causas de muerte (1). Recientemente, se ha descrito en modelos animales diabéticos que el aumento de la actividad de arginasa tiene un importante papel en el desarrollo de complicaciones relacionadas con esta patología como lo son: hipertensión, retinopatía diabética y disfunción endotelial vascular (2). Diversos estudios en tejidos han demostrado que la función vascular adecuada está asociada a la producción de óxido nítrico (ON). El ON desarrolla funciones vasodilatadoras y antiinflamatorias las cuales se encuentran comprometidas en la diabetes (3).

La diabetes puede disminuir la biodisponibilidad del ON por diversos mecanismos, en el que se incluye la formación de peroxinitritos al reaccionar directamente con radicales libres. La formación de peroxinitritos lleva al desacople de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) y/o el aumento de la enzima arginasa (4). Una excesiva actividad de ésta puede causar una disminución en la producción de ON por la eNOS al competir por el mismo

sustrato L-arginina (5). La enzima arginasa cataliza la hidrólisis de L-arginina a urea y ornitina, que es metabolizada hacia la formación de poliaminas vía ornitina descarboxilasa y prolina vía ornitina aminotransferasa. Las poliaminas, como la putrescina y espermina, tienen un papel importante en la proliferación celular y la prolina en la síntesis de colágeno, mientras que ambas son importantes en la regeneración de tejidos (6,7). Por otro lado, se ha descrito que las enfermedades cardiovasculares están fuertemente asociadas con la DM y, además, que la actividad aumentada de la enzima arginasa está asociada con el desarrollo de diversas condiciones patológicas, entre las que se encuentran: disfunción endotelial, envejecimiento, hipertensión, aterosclerosis, daño vascular, inflamación y disfunción eréctil (4, 8-10). Los incrementos de la actividad de arginasa en tejidos y cultivos celulares se asocian con niveles incrementados de glucosa en la DM y sugiere estar involucrada en el desarrollo de disfunción vascular, por ser un competidor directo de la eNOS. Además, se observó que al realizar una inhibición de la enzima arginasa se mantienen las funciones vasculares y el control del incremento en las especies reactivas de oxígeno producidas por condiciones de hiperglucemia (10-12). En el estudio de Kövamees *et al* se demostró que pacientes con DM, que presentaban complicaciones como daño vascular, mantenían niveles mayores de actividad de la enzima arginasa (13). Dado los hallazgos anteriores y tomando en cuenta que en esas investigaciones los modelos de estudio presentaban un grado avanzado de DM, se planteó evaluar el papel de la actividad de arginasa como un posible marcador sistémico del progreso de la diabetes, evaluando pacientes sin signos de una enfermedad avanzada.

MATERIAL Y MÉTODOS

El Hospital General Yanga es un hospital de segundo nivel que se encuentra ubicado en la parte sur de la ciudad de Córdoba, Veracruz, México. El estudio se realizó en el Departamento de Bioquímica Clínica del hospital, durante el período comprendido del 1 de enero del 2017 al 30 de abril del 2017. Este estudio se realizó de acuerdo con los principios éticos

establecidos en la Declaración de Helsinki de 1975 (revisada en 1983), cumpliéndose todos los acuerdos vigentes hasta el momento y fue consistente con las guías de buenas prácticas clínicas. El protocolo fue aprobado por el comité de investigación y ética del hospital y el consentimiento informado por escrito fue obtenido de cada uno de los participantes. Se conformaron tres grupos de estudio: pacientes control, pacientes DM tipo I (DMI) y pacientes DM tipo II (DMII).

Criterios de inclusión para pacientes con DM. Pacientes masculinos de consulta externa, de entre 30-40 años, con diagnóstico de diabetes mellitus, que no presentan otros procesos de afectación vascular como proteinuria, hiperlipidemia, hipertensión ni síndrome metabólico y que hayan aceptado participar firmando la carta de consentimiento informado.

Criterios de inclusión para pacientes control. Pacientes masculinos de 30-40 años, no diagnosticados con DM ni hiperglucemia (> 100 mg/dl) y que hayan firmado la carta de consentimiento informado.

La metodología para selección de los pacientes fue de manera aleatoria. A todos los grupos se les determinaron sus datos antropométricos en los que se incluyó edad, índice de masa corporal (IMC) y presión arterial. Posteriormente, se realizó una toma de muestra sanguínea por punción venosa, se obtuvo el suero procurando la ausencia de hemólisis, para la determinación de los niveles de glucosa, colesterol y triglicéridos en ayuno, así como de la actividad de la enzima arginasa.

Procesamiento de muestras. Los analitos (glucosa, colesterol y triglicéridos) se determinaron en el suero de los pacientes, con ayuno de doce horas, mediante reacciones colorimétricas, usando el equipo ILAB 650 (Instrumentation Laboratory).

Se determinó la actividad de la enzima arginasa de cada uno de los participantes, mediante la técnica descrita por *Corraliza* y colaboradores (14), que es un método colorimétrico de valoración cuantitativa. Se mezclaron 10 μ l del suero del paciente con 80 μ l de buffer pH 7.4 y se activó la enzima arginasa con $MnCl_2$, incubando la mezcla durante 10

minutos a 56 °C. Posteriormente se adicionó el sustrato L-arginina y se incubó durante una hora, a 37 °C. Transcurrido el tiempo, se detuvo la reacción agregando una mezcla de ácidos (H_2SO_4 , H_3PO_4 y H_2O , en proporciones 1:3:7). Una vez completada la reacción se adicionó α -isonitrosopropiofenona, el contenido de cada tubo fue mezclado e incubados durante 45 minutos al punto de ebullición. Finalizado el tiempo de incubación, se determinó la absorbancia a 545 nm. A cada muestra se le determinó la cantidad de urea. Las determinaciones de la actividad de arginasa fueron ajustadas entre los mg de proteína, la cantidad de proteína fue determinada por el método de Lowry (15). Finalmente, la actividad de la enzima arginasa se reportó en nmol urea/mg de proteína.

El daño a proteínas se determinó cuantificando grupos carbonilos, que es uno de los biomarcadores más utilizados de daño a proteína por oxidación. Este método se basa en hacer reaccionar los grupos carbonilo presentes en la proteína con el compuesto 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), formando dinitrofenilhidrazonas que son un producto estable, detectable a 370 nm de longitud de onda, con un coeficiente de extinción molar de 22,000/M-1 cm^{-1} = 22,000/106 nmol/ml (16).

Se tomaron 50 μ l de plasma y se mezclaron con 500 μ l de DNPH 10 mM, preparada con HCl 2.5M y para cada tubo problema se dispuso de su respectivo blanco, el cual contenía 50 μ l de plasma y 500 μ l de HCl 2.5 M; posteriormente se incubaron a temperatura ambiente, protegidos de la luz, por una hora; agitándolos gentilmente cada 15 minutos. Al concluir el tiempo se agregó 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 5% y se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos y el sobrenadante se desechó, quedando una pastilla, la cual fue rota con una varilla de vidrio agregando 1 ml de TCA al 2.5%; se centrifugó a 3500 rpm por 10 minutos, se eliminó el sobrenadante, la pastilla se disolvió en 2 ml de etanol/acetato de etilo (1:1), se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos, se decantó el sobrenadante y se dejó secar por 5 minutos; finalmente se disolvió en 1 ml de guanidina 6M, pH 2.3 y se incubó por 10 minutos a una temperatura de 37°C; las lecturas de

absorbancia fueron medidas a una longitud de onda de 370 nm.

El coeficiente de extinción molar de la dinitrofenilhidrazina se utilizó para cuantificar los nmol de osazona y los resultados obtenidos se ajustaron por mg de proteína, para reportarse como nmol de osazonas/mg proteína.

Análisis estadístico. Para determinar diferencias estadísticamente significativas se utilizó ANOVA y la correlación de Pearson entre la actividad de arginasa y los niveles de glucosa. Los resultados se expresaron como promedios \pm error estándar y se consideró significativo si $p \leq 0.05$. Los análisis fueron realizados en el programa Prism 5.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA).

RESULTADOS

Se incluyeron 67 pacientes con diagnóstico de DM, los cuales se dividieron en dos grupos: 21 pacientes diagnosticados con DMI y 46 pacientes con DMII. Para el grupo control, fueron seleccionados 37 pacientes sanos. En la **Tabla 1** se muestran las características antropométricas y los datos bioquímicos de los grupos de estudio, donde se puede observar que mostraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a los valores de IMC y los niveles de glucosa. Los valores de IMC encontrados en los grupos con DM indican la presencia de sobrepeso y un incremento en los niveles de glucosa en comparación con el grupo control

Tabla 1.
Datos antropométricos y bioquímicos de los grupos de estudio

	Grupos de estudio			Valores de referencia
	Control n=37	DMI n=21	DMII n=46	
Edad	36 \pm 5.8	35.6 \pm 5.1	36.5 \pm 5.2	
IMC	22.8 \pm 2.8	27.9 \pm 2.1*	27.5 \pm 2.2*	
Presión sistólica	98.6 \pm 3.45	99.1 \pm 3.8	98.7 \pm 4.1	
Presión diastólica	74.1 \pm 5.1	75.4 \pm 4.5	74.5 \pm 6.2	
Glucosa(mg/dl)	85.5 \pm 10	210.0 \pm 25.5*	220.0 \pm 16.5*	<110 mg/dl
Colesterol (mg/dl)	165.2 \pm 10.5	170.1 \pm 9.5	165.2 \pm 10.2	<200 mg/dl
Triglicéridos (mg/dl)	150.5 \pm 15.5	160.2 \pm 9.9	160.5 \pm 9.5	<150 mg/dl

Datos expresados como promedio \pm desviación estándar analizados por ANOVA.

* $p \leq 0.05$ Control vs DMI, Control vs DMII.

En cuanto a la evaluación de la actividad de la arginasa, los resultados indicaron una tendencia hacia niveles menores de actividad en el grupo con DM (0.3384 ± 0.01 nmol urea/mg proteína) en comparación con los controles (0.4293 ± 0.02 nmol urea/mg proteína). Por otro lado, al analizar por separado los grupos con DM se observaron niveles bajos de arginasa similares; y así, para el de DMI se obtuvo 0.3276 ± 1.16 nmol urea/mg proteína y para el de DMII fue de 0.3434 ± 0.17 nmol urea/mg proteína (**Figura 1A**). Adicionalmente, se valoró el marcador de daño a proteínas mediante el análisis de los grupos carbonilos totales, los resultados mostraron incremento marcado en los

pacientes con DMI (1.03 ± 0.2 nmol de osazonas/mg proteína) en comparación con el grupo control ($0.67 \pm .02$ nmol de osazonas/mg proteína) (**Figura 1B**). Estos resultados indican que la sola presencia de hiperglucemia en los grupos de DM no muestra un incremento en la actividad de arginasa a nivel sistémico como se ha descrito en investigaciones previas con pacientes o modelos animales diabéticos, que presentan signos de un daño vascular u otras patologías. Adicionalmente, en cuanto al análisis de Pearson, no hubo correlación entre la actividad de la enzima arginasa y los niveles de glucosa en los grupos de estudio (**Figura 2**).

Figura 1.

Determinación de la actividad de arginasa (A) y grupos carbonilo (B) en los grupos de estudio. Se muestran datos expresados como medias \pm desviación estándar analizados por ANOVA. * $p < 0.05$.

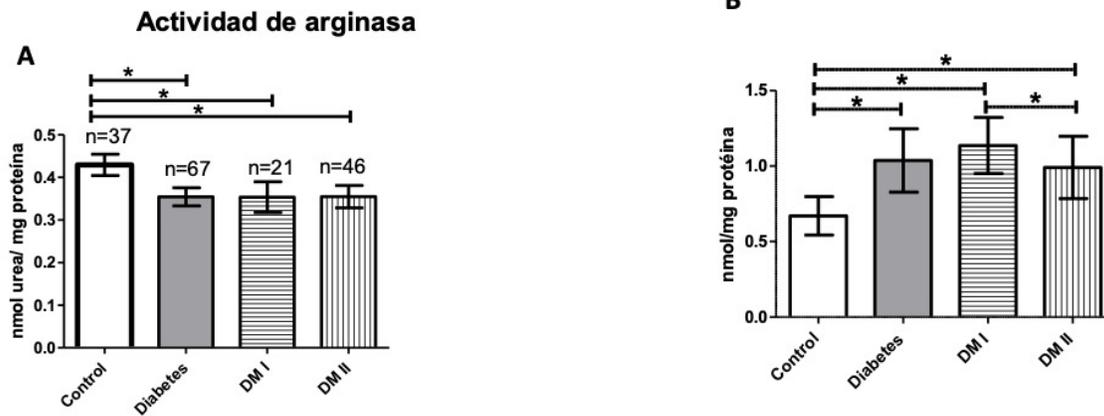
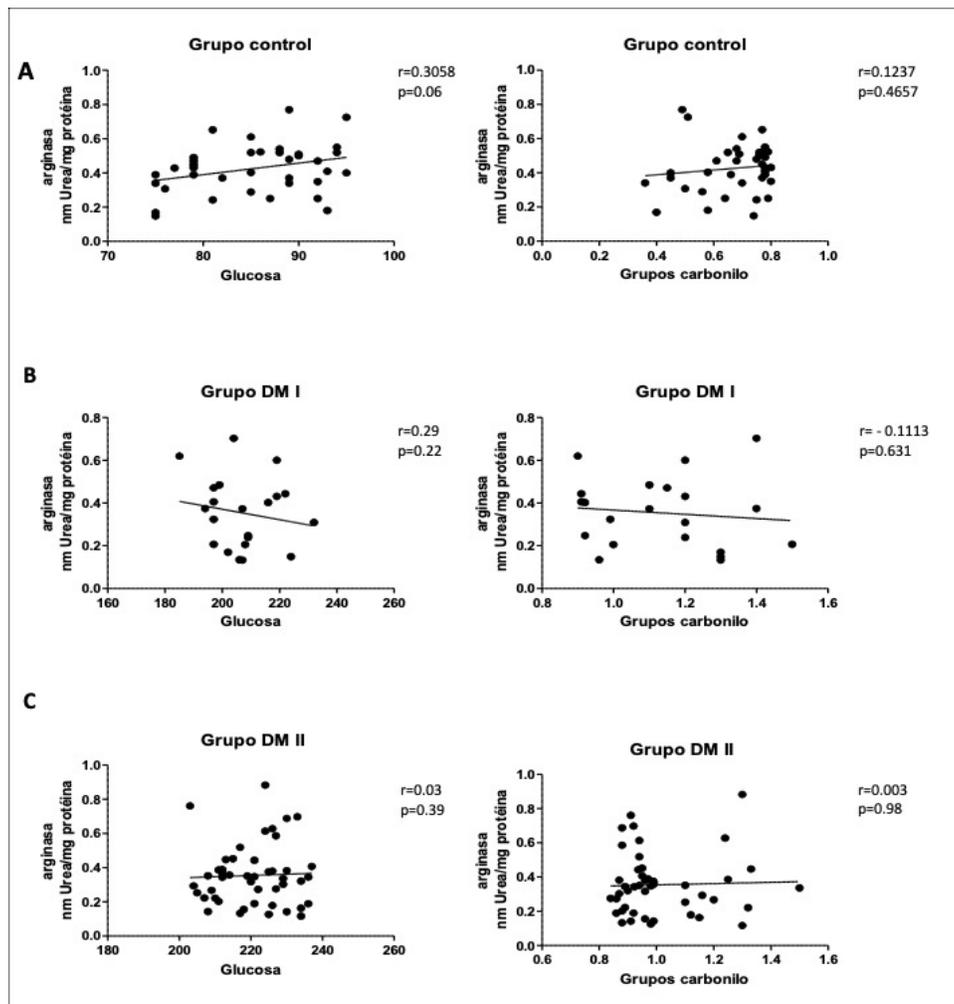


Figura 2.

Correlación de Pearson entre la actividad de arginasa y los niveles de glucosa (columna izquierda) y entre la actividad de arginasa y grupos carbonilo (columna derecha). A) grupo control, B) grupo diabetes mellitus tipo I (DMI) y C) grupo diabetes mellitus tipo II (DMII).



DISCUSIÓN

Recientemente, se ha establecido que la actividad de la enzima arginasa tiene un papel fundamental en el desarrollo de distintas complicaciones relacionadas con la diabetes (2-4) e igualmente que, inhibiendo la actividad de esta enzima en modelos animales con daño renal, estos han mostrado una mejoría, asociándolo a una disminución en albuminuria, cambios histopatológicos asociados con nefropatía diabética y reducción de la infiltración de macrófagos en el riñón (17). El objetivo de este estudio fue determinar si la actividad de la enzima arginasa sistémica puede ser un marcador de progresión de la enfermedad en los pacientes con DM.

La diabetes se caracteriza por la presencia de disfunción vascular, asociada al estado de estrés oxidativo e inflamación (18), ambos relacionados con un incremento en la expresión y actividad de la arginasa. Se ha descrito que los niveles altos de glucosa se asocian con un aumento en la actividad de la arginasa en células endoteliales coronarias y se sugiere que este efecto es dependiente de las Rho quinasas (19). Nuestros resultados muestran una disminución de la actividad de arginasa a nivel sistémico en pacientes con DM, en comparación con otros estudios en tejidos o modelos animales y pacientes con DM u otras enfermedades (20-23). Esto apoyaría la hipótesis de que la actividad de arginasa va aumentando conforme avanza la enfermedad. Por ejemplo, en el estudio de Kashyap et al, se describe que la actividad de arginasa sistémica se incrementa en pacientes con diabetes mellitus tipo II en una etapa avanzada, en comparación con sujetos control sanos y esta correlacionada positivamente con los niveles plasmáticos de glucosa en ayunas (21). Esto difiere con nuestro estudio, en donde observamos que pacientes con DM, en etapas iniciales, la actividad de arginasa disminuye. De igual manera, es importante señalar que, al comparar los resultados encontrados con lo reportado, observamos que, en su grupo de estudio, los pacientes diabéticos presentaron incremento de colesterol y triglicéridos, contrario a nuestros resultados, donde se observaron niveles normales de ambos. Por otra parte, estudios previos realizados en mujeres con preclamsia, se

observó un comportamiento similar de la actividad de la enzima arginasa, en comparación con pacientes control (24).

De acuerdo con los resultados y lo descrito en la literatura podríamos sugerir las siguientes causas de la disminución de la actividad de arginasa a nivel sistémico en los inicios de la DM: a) La disminución de arginasa en el plasma de pacientes con DM sugiere una falta de sustrato, ya que la DM conlleva un estado crónico de inflamación y enfermedad hepática, siendo esto posible factor para un decremento del sustrato arginina y, por ende, de la actividad de arginasa. Sin embargo, se ha reportado que pacientes pediátricos sin signos de daño vascular, presentan una actividad disminuida de la enzima arginasa (23). b) La actividad de arginasa disminuida a nivel sistémico sugiere un pronóstico previo a un grado avanzado de disfunción endotelial, esto puede explicarse debido a que la enzima arginasa es intracelular, por lo que, para tener una mayor actividad de ésta a nivel sistémico, debería presentarse un gran daño de la pared o lisis celular. Esto apoya, que la disparidad de nuestros resultados con los previamente reportados en otras investigaciones puede deberse al tiempo que los pacientes llevan con la enfermedad, ya que los incluidos en el estudio aún no mostraban signos de enfermedad renal, daño vascular, retinopatía ni pie diabético; que a la larga se presentan en la DM. c) Estos resultados, comparados con los estudios previos, sugieren que en los pacientes con DM que presentan incremento en los niveles de glucosa, pero que no manifiestan signos de afectación vascular; la actividad de arginasa plasmática no incrementa, sino que tiende a disminuir. Por otra parte, la hiperglucemia produce daño celular, debido principalmente al incremento de moléculas susceptibles a estrés oxidativo por especies reactivas de oxígeno (ERO) (25), lo que provocaría un catabolismo acelerado de poliaminas, que conllevaría un efecto negativo en la proliferación celular y la síntesis de colágeno, sugiriendo una asociación al daño de los nervios y vasos sanguíneos, como los que se presentan en pacientes que padecen pie diabético y un daño vascular avanzado (6,7, 26).

Además, se ha descrito que el incremento de ERO produce daño a proteínas y pérdida de su actividad (27, 28), y como se observa en la **Figura 1B** en los pacientes con DM existen niveles aumentados de este marcador, lo que sugiere que la disminución observada en la actividad de la enzima arginasa, es resultado del daño por el incremento de las ERO en la proteína.

Finalmente, se puede concluir que la actividad de arginasa sistémica en pacientes con DM en etapa inicial y que no presentan las complicaciones de la enfermedad se encuentra disminuida en comparación con el grupo control. Sin embargo, es necesario realizar otros abordajes que permitan plantearnos la posibilidad de que la actividad de esta enzima a nivel sistémico podría ser un apoyo para el médico en el control y/o manejo del paciente con diabetes.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al PRODEP por el apoyo al proyecto UJAT-PTC-261. Los autores declaran no tener conflicto de interés.

REFERENCIAS

1. OMS (Organización Mundial de la Salud). Prevalencia de la diabetes y de los factores de riesgo conexos en México. 1. 2016;1.
2. Lamuchi-Deli N, Aberomand M, Babaahmadi-Rezaei H, Mohammadzadeh G. Effects of the hydroalcoholic extract of *Zingiber officinale* on arginase i activity and expression in the retina of streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Endocrinol Metab*. 2017;15(2): 1-7. DOI: 10.5812/ijem.42161
3. Shi Y, Vanhoutte PM. Macro- and microvascular endothelial dysfunction in diabetes. *J Diabetes [Internet]*. 2017;9(5):434–49. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/1753-0407.12521>
4. Caldwell RB, Toque HA, Narayanan SP, Caldwell RW. Arginase: An old enzyme with new tricks. *Trends Pharmacol Sci*. 2015;36(6):395–405. DOI: 10.1016/j.tips.2015.03.006.
5. Durante W, Johnson FK, Johnson RA. Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007;34(9):906–11. DOI: 10.1111/j.1440-1681.2007.04638.x .
6. Lange PS, Langley B, Lu P, Ratan RR. Novel roles for arginase in cell survival, regeneration, and translation in the central nervous system. *J Nutr*. 2004;134(10 Suppl):2812S–2817S; discussion 2818S–2819S. DOI: 134/10/2812S [pii].
7. Li H, Meininger CJ, Hawker JR, Haynes TE, Kepka-Lenhart D, Mistry SK, et al. Regulatory role of arginase I and II in nitric oxide, polyamine, and proline syntheses in endothelial cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001;280(1):E75–82. DOI: doi.org/10.1152/ajpendo.2001.280.1.E75.
8. Qin Z, Hou X, Weisbrod RM, Seta F, Cohen RA, Tong X. Nox2 mediates high fat high sucrose diet-induced nitric oxide dysfunction and inflammation in aortic smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol*. 2014;72:56–63. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2014.02.019.
9. Shemyakin A, Kövamees O, Rafnsson A, Böhm F, Svenarud P, Settergren M, et al. Arginase inhibition improves endothelial function in patients with coronary artery disease and type 2 diabetes mellitus. *Circulation*. 2012;126(25):2943–50. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.140335.
10. Shatanawi A, Romero M, Iddings J, Chandra S, Umapathy N, Verin A, et al. Angiotensin II-induced vascular endothelial dysfunction through RhoA/Rho kinase/p38 mitogen-activated protein kinase/arginase pathway. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2011;300(5):C1181–92. DOI: 10.1152/ajpcell.00328.2010.
11. Patel C, Rojas M, Narayanan SP, Zhang W, Xu Z, Lemtalsi T, et al. Arginase as a mediator of diabetic retinopathy. *Front Immunol*. 2013;4:1–11. DOI: 10.1152/ajpcell.00328.2010.
12. Chandra S, Romero MJ, Shatanawi A, Alkilany AM, Caldwell RB, Caldwell RW. Oxidative species increase arginase activity in endothelial cells through the RhoA/Rho kinase pathway. *Br J Pharmacol*. 2012;165(2):506–19. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2011.01584.x
13. Kövamees O, Shemyakin A, Checa A, Wheelock CE, Lundberg JO, Östenson CG et al. Arginase Inhibition Improves Microvascular Endothelial Function in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*, 2016, 101(11):3952–58.
14. Corraliza IM, Campo ML, Soler G, Modolell M. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *J Immunol Methods*. 1994;174(1–2):231–5. DOI: 10.1016/0022-1759(94)90027-2.
15. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265–75.
16. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein Carbonyl Groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin. Chim. Acta*. 329:1-2, 23-38, 2003.
17. Morris SM, Gao T, Cooper TK, Kepka-Lenhart D, Awad AS. Arginase-2 mediates diabetic renal injury. *Diabetes*. 2011; 60(11):3015–22. DOI: 10.1016/0304-3894(92)87011-4.

18. Paneni F, Beckman JA, Creager MA, Cosentino F. Diabetes and vascular disease: Pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy. *Eur Heart J*. 2013; 34(31):2436-43. doi: 10.1093/eurheartj/eh149.
19. Yao L, Chandra S, Toque HA, Bhatta A, Rojas M, Caldwell RB, et al. Prevention of diabetes-induced arginase activation and vascular dysfunction by Rho kinase (ROCK) knockout. *Cardiovasc Res*. 2013; 97(3):509-19. DOI: 10.1093/cvr/cvs371.
20. Jung C, Figulla HR, Lichtenauer M, Franz M, Pernow J. Increased levels of circulating arginase I in overweight compared to normal weight adolescents. *Pediatr Diabetes*. 2014;15(1):51-6. DOI: 10.1111/pedi.12054.
21. Kashyap SR, Lara A, Zhang R, Park YM, DeFronzo RA. Insulin reduces plasma arginase activity in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*. 2008; 31(1):134-9. DOI: 10.2337/dc07-1198.
22. Morris CR, Poljakovic M, Lavrisha L, Machado L, Kuypers FA, Morris SM. Decreased Arginine Bioavailability and Increased Serum Arginase Activity in Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004; 170(2):148-53. DOI: 10.1164/rccm.200309-1304OC.
23. Dimitriades V, Rodriguez PC, Zabaleta J, Ochoa A. Arginase I levels are decreased in the plasma of pediatric patients with Atopic Dermatitis. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2014; 113(3): 271-275. DOI: 10.1016/j.anai.2014.06.010.
24. González JA, Olivares IM, Tovar JM, Hernández NA, Méndez E, Ceballos GM, et al. Influence of the AT2 receptor on the L-arginine-nitric oxide pathway and effects of (-)-epicatechin on HUVECs from women with preeclampsia. *Journal of Human Hypertension* 2013; (27) 355-361
25. Gálvan MF, Calderón JV, Inrago M, Torres A, Zamarripa R, Meléndez CD, et al. Oxidative stress in patients with different clinical expression of metabolic syndrome. *Med Int Méx*. 2014; 30(6): 651-659
26. Tsao CF, Huang WT, Liu TT, Wang PW, Liou CW, Lin TK. Expression of high-mobility group box protein 1 in diabetic foot atherogenesis. *Genet.Mol.Res*. 2015; 14 (2): 4521-4531. DOI: 10.4238/2015.May.4.10
27. Rincón Víquez MJ, García-Sánchez JR, Tapia González MA, Gutiérrez López L, Ceballos-Reyes GM, Olivares-Corichi IM. Insulin polymers in the plasma of obese subjects are associated with elevated levels of carbonyl groups and are decreased by (-)-epicatechin. *Horm Metab Res*. 2014; 46 (7):499-504.
28. Luna C, Estévez M. Oxidative damage to food and human serum proteins: Radical-mediated oxidation vs. glyco-oxidation. *Food Chem*. 2018 Nov 30; 267: 111-118. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.06.154.