

---

## ARTÍCULOS ORIGINALES

---

### Alteraciones del estado redox celular en pacientes cubanos con trastornos del espectro autista.

### Alterations in the cellular redox state in Cuban patients with autistic spectrum disorders.

*Deinys Carmenates Naranjo,<sup>I</sup> Giselle Monzón Benítez,<sup>II</sup> Roberto Lardoeyt Ferrer,<sup>III</sup> Gretel Riverón Forment,<sup>IV</sup> Giselle Lemus Molina,<sup>V</sup> Olivia Martínez Bonne,<sup>VI</sup> Mildrey Cásido Rodríguez,<sup>VII</sup> Arianne Llamos Paneque.<sup>VIII</sup>*

#### Resumen

El autismo es un trastorno del comportamiento con déficit marcado de la comunicación e interacción social. Constituye a su vez uno de los problemas más complejos desde el punto de vista personal, familiar y social, que puede presentarse en la infancia. Se ha sugerido que el estrés oxidativo juega un papel en la fisiopatología que subyace en la aparición de las conductas que definen el autismo. Con el objetivo de medir los marcadores de daño oxidativo y de defensa antioxidante en pacientes con trastornos del espectro autista se realizó la presente investigación. Se estudiaron 15 casos y 30 controles. A los integrantes de ambos grupos se les determinaron los marcadores de daño oxidativo y los de defensa antioxidante. Los niveles plasmáticos de malonildialdehído y de los productos avanzados de oxidación de proteínas resultaron más elevados en los casos que en los controles. La media del nivel de actividad intraeritrocitaria de la catalasa fue menor en los casos ( $p=0,000003$ ), mientras que no se encontraron diferencias entre las medias de los niveles de actividad de la superóxido dismutasa en ambos grupos. Las concentraciones plasmáticas de tioles libres fueron superiores ( $p=0,020$ ) en los pacientes en comparación con los controles. Los resultados del estudio sugieren la presencia de condiciones de estrés oxidativo en los pacientes con trastornos del espectro autista. Las evidencias deberán ser replicadas en un mayor número de casos por su posible utilidad en estrategias terapéuticas.

**Palabras clave:** Trastorno del espectro autista, daño oxidativo, estrés oxidativo, enzimas antioxidantes, estado Redox, autismo.

#### Abstract

Autism is a behavior disorder with a marked communication and social interaction deficit. In turn, it also constitutes one of the most complex problems from the personal, familial and social points of view that can appear in infancy. It has been suggested that oxidative stress plays a role in the physiopathology that lies behind the emergence of conducts defining autism. The present investigation was carried out with the objective of measuring oxidative damage and antioxidant defense markers in patients with autistic spectrum disorders. A total of 15 cases and 30 controls were studied, determining the oxidative damage and antioxidant defense markers to all of them. Plasmatic level values of malondialdehyde and advanced protein oxidation products turned out to be higher in the cases than in controls. The catalase mean intraerythrocytic activity level was less in the cases ( $p=0,000003$ ), while no differences were found between the superoxide dismutase mean activity level values in both groups. Free thiols plasmatic concentrations were greater ( $p=0,020$ ) in patients as compared with controls. Results of this study suggest the presence of oxidative stress conditions in those patients with autistic spectrum disorders. These evidences must be obtained for a greater number of cases due to their possible usefulness in therapeutic strategies.

**Keywords:** Autistic spectrum disorders, oxidative damage, oxidative stress, antioxidant enzymes, redox state, autism.

---

<sup>I</sup> Máster en Ciencias en Asesoramiento Genético. Licenciada en Defectología. Profesor Instructor. Centro Nacional de Genética Médica. La Habana, Cuba. E-mail: [deinys@infomed.sld.cu](mailto:deinys@infomed.sld.cu).

<sup>II</sup> Especialista de Primer Grado en Genética Clínica. Profesor Instructor. Centro Nacional de Genética Médica. La Habana. Cuba.

<sup>III</sup> Doctor en Ciencias Médicas. Especialista de Segundo Grado en Genética Clínica. Profesor Titular. Investigador Titular. Centro Nacional de Genética Médica. La Habana. Cuba.

---

## **Introducción**

Los trastornos del espectro autista (TEA) comprenden un grupo heterogéneo de trastornos, tanto en su etiología como en su presentación clínica, que se inician en la infancia y duran toda la vida, teniendo en común la afectación en la reciprocidad social, comunicación verbal y no verbal y la presencia de patrones repetitivos y restrictivos de la conducta.<sup>1</sup> La prevalencia de TEA oscila entre 1/54 en varones y 1/252 en hembras, con una prevalencia total de 11,3 por cada 1000 a los 8 años.<sup>2</sup> El autismo es un síndrome que compromete la calidad de vida de quien lo sufre y de su familia, dificulta la relación social y el aprendizaje lo que influye en la independencia, autocuidado y vida productiva del paciente.

En la última década, la investigación relacionada con esta entidad se multiplicó en forma importante y con esto se inició un camino del cual todavía queda mucho por recorrer, pero que ya comienza a mostrar evidencias en cuanto a la etiología y a los mecanismos que subyacen en las dificultades del autista.

La etiología genética es la más sustentada y existen diferentes mecanismos genéticos en los TEA. Un 10% de los casos de TEA se asocian a causas sindrómicas, de origen monogénico identificado, como es el caso del síndrome Frágil X, la fenilcetonuria, la esclerosis tuberosa, el síndrome Rett, entre otros. Un 5 % se asocia a alteraciones cromosómicas raras, como es el caso de la duplicación de la región 15q11-q13 de origen materno, la trisomía 21, 45X (síndrome de Turner), 47XYY, 47XXY. Otro 5 % se asocia a variaciones en el número de copias de partes del genoma, que se repiten más o menos veces, comúnmente denominados variantes de copia numérica, (CNV del inglés *copy number variants*). Otro 5 %, está asociado a variaciones genéticas penetrantes y poco frecuentes en la población. El otro 75 % de las causas sigue siendo, en principio, multifactoriales desconocidas, con factores ambientales modulando la expresión genética y factores como la edad paterna, que podrían asociarse a un incremento de mutaciones genéticas.<sup>3</sup>

En determinadas condiciones, sean patológicas o no,

cuando las concentraciones de las especies oxidantes se elevan, aumentan las modificaciones oxidativas de las macromoléculas esenciales. A su vez, estos eventos conducen a la afectación de las vías de señalización que son controladas por el estado redox celular y se establece lo que se ha denominado como estrés oxidativo (EO).<sup>4</sup>

Se ha sugerido que el EO juega un papel en la fisiopatología que subyace en la aparición de las conductas que definen el autismo.<sup>5</sup> En la presente investigación nos propusimos medir los marcadores de daño oxidativo y de defensa antioxidante en pacientes cubanos con trastornos del espectro autista.

## **Métodos**

Se realizó un estudio observacional analítico, de casos y controles. Los casos (n=15) se seleccionaron en la consulta especializada del Hospital Pediátrico Pedro Borrás, se seleccionaron niños con diagnóstico de trastorno de espectro autista, menores de 11 años, de ambos sexos y sin distinción de color del piel. Como grupo control se seleccionaron 30 niños aparentemente sanos, de edad y sexo similares a los casos. Se verificó la no utilización previa de suplementos antioxidantes en ambos casos.

Los pacientes fueron atendidos en la consulta de genética clínica del Hospital Pediátrico Pedro Borrás, durante el año 2012, y para la realización de estudios de EO a todos los pacientes se les tomó muestra de sangre las cuales fueron procesadas en el Centro Nacional de Genética Médica (CNGM).

## **Variables**

Para las determinaciones de EO se extrajeron 5 mL de sangre venosa en un tubo con EDTA. El plasma se separó por centrifugación (250 g durante 15 minutos a 4 °C) y los eritrocitos se lavaron 3 veces con solución fría de NaCl 0,9 %. Para obtener el lisado de eritrocitos se lisaron con agua destilada fría.<sup>6</sup> Todas las muestras se almacenaron a -20 °C hasta la determinación de los marcadores, que no superó los 10 días.

<sup>IV</sup> Máster en Ciencias en Bioquímica Clínica. Licenciada en Bioquímica. Investigador Auxiliar. Centro Nacional de Genética Médica. La Habana. Cuba.

<sup>V</sup> Licenciada en Tecnología de la Salud. Aspirante a Investigador. Centro Nacional de Genética Médica. La Habana. Cuba.

<sup>VI, VII</sup> Técnico en Investigación, Innovación y Desarrollo. Centro Nacional de Genética Médica. La Habana. Cuba.

<sup>VIII</sup> Especialista de Segundo Grado en Genética Clínica. Profesora Asistente. Hospital Pediátrico Pedro Borrás. Municipio Plaza de la Revolución. La Habana. Cuba.

### **Marcadores de daño oxidativo:**

#### *1-Determinación de la concentración de malonildialdehído.*

La concentración plasmática de malonildialdehído (MDA) se determinó a partir del método descrito en el ensayo BIOXYTECH® LPO-586™ (*OXIS Research, Portland, USA*). Los resultados fueron expresados en  $\mu\text{mol/L}$ .<sup>7</sup>

#### *2-Determinación de la concentración de los productos avanzados de la oxidación de proteínas.*

La determinación en plasma de los productos avanzados de la oxidación de proteínas (PAOP) se realizó mediante la técnica espectrofotométrica descrita por Witko Sarsat.<sup>7</sup> Los resultados fueron expresados en  $\mu\text{mol/L}$ .

### **Marcadores de defensa antioxidant:**

#### *1-Actividad de la enzima Cu-Zn superóxido dismutasa intraeritrocitaria.*

La actividad intraeritrocitaria de la enzima Cu-Zn superóxido dismutasa (SOD1) se determinó mediante la técnica espectrofotométrica descrita por Marklund S y Marklund G.<sup>8</sup> Este es un método cinético indirecto, que se basa en la capacidad de esta enzima para inhibir la reacción de autooxidación del pirogalol. Para el cálculo de la actividad se tiene en cuenta que 1 unidad de actividad enzimática (UAE) es capaz de inhibir el 50 % de la autooxidación del pirogalol. Las unidades fueron expresadas en % de inhibición/ minuto/ g de hemoglobina (U/ g Hb).

#### *2-Actividad de la enzima catalasa intraeritrocitaria.*

La determinación de la actividad enzimática de la catalasa (CAT) se realizó mediante la técnica referida por Aebi H.<sup>9</sup> Este ensayo cinético directo se basa en la medición de la variación de la densidad óptica que tiene lugar como resultado de la descomposición del peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Las unidades de actividad enzimática fueron expresadas en mmoles de  $\text{H}_2\text{O}_2$  transformados /minuto/ g de Hemoglobina (U/ g Hb).

#### *3-Actividad de la enzima glutatió peroxidasa celular.*

La determinación de la actividad enzimática intraeritrocitaria de la glutatió peroxidasa celular (c-GPx) se realizó mediante la técnica referida por Paglia DE y Valentine WN.<sup>10</sup> Las unidades de actividad enzimática fueron expresadas en mU/ml.

#### *4-Actividad enzimática de glutatió reductasa.*

La determinación de la actividad enzimática intraeritrocitaria de la glutatió reductasa (GR) se

realizó mediante la técnica referida por Carlberg I y Mannervik B.<sup>11</sup> Este ensayo se basa en la oxidación de NADPH a NADP<sup>+</sup>, catalizada por la enzima presente en la muestra. Se definió como 1 UAE la cantidad de enzima que es capaz de catalizar la reducción de un  $\mu\text{mol}$  de GSSG por minuto a pH 7,2 y 25 °C. Las unidades de actividad enzimática fueron expresadas en mU/mL.

#### *5-Determinación de la concentración de tioles libres.*

La determinación de las concentraciones plasmáticas de tioles proteicos referidos como glutatió reducido (GSH) se realizó mediante la técnica referida por Sedlak J y Lidsay RH.<sup>12</sup> El GSH presente en la muestra desproteinizada reacciona con el reactivo de Ellman (5,5 ‘-ditiobis-2-nitrobenzoico, DTNB) para rendir un compuesto coloreado que absorbe la luz a 412 nm. Los resultados fueron expresados en  $\mu\text{mol/L}$ .

### **Procesamiento estadístico**

En este estudio se determinaron los estadísticos descriptivos de tendencia central para los marcadores de EO. Se compararon las medias aritméticas, de cada una de las variables de respuesta para ambos grupos (pacientes y controles) a través de la utilización de la prueba t de *Student* de muestras no pareadas. Como criterio de significación estadística se tomó  $p<0,05$ . Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS versión 13.0 para Windows.

### **Aspectos éticos**

Los participantes fueron incluidos en el estudio a partir de que sus representantes legales, o tutores emitieran voluntariamente su consentimiento, luego de la explicación verbal y escrita de los métodos, riesgos y beneficios contemplados en el estudio., siguiendo los principios éticos de la Declaración de Helsinki de 1975, modificada en el 2013. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética del Centro Nacional de Genética Médica.

### **Resultados**

La edad promedio de los niños incluidos en el estudio fue de 4 años, con predominio del sexo masculino. En relación con las variables de daño oxidativo, se evidenciaron diferencias significativas en correspondencia con los niveles plasmáticos de malonildialdehído (MDA) y de los productos avanzados de oxidación de proteínas (PAOP) en los casos en comparación con los controles (Tabla 1).

**Tabla 1.** Resultados de los marcadores de daño oxidativo en los pacientes con trastornos del espectro autista y el grupo control.

Marcadores	Pacientes n=15	Controles n=30	p
MDA ( $\mu\text{mol/l}$ )	0,86	0,62	0,008
PAOP ( $\mu\text{mol/l}$ )	66,7	39,49	0,036

La media del nivel de actividad intraeritrocitaria de la catalasa fue menor en los casos ( $p=0.000003$ ), mientras que no se encontraron diferencias entre las medias de los niveles de actividad de la superóxido dismutasa en ambos grupos (Tabla 2).

**Tabla 2.** Resultados de los marcadores de capacidad de defensa antioxidante en los pacientes con trastorno del espectro autista y el grupo control.

Marcadores	Pacientes n=5	Controles n=15	p
SOD1 (U/ml)	176,66	175,81	0,812
CAT (U/ml)	42,76	72,56	0,000003
GPx (mU/ml)	45 828,09	36 900,60	0,30
Gred (mU/ml)	129,36	115,97	0,87
GSH ( $\mu\text{mol/l}$ )	34,42	18,86	0,020

Las actividades intraeritrocitarias de la glutatión peroxidasa y de la glutatión reductasa, no difirieron entre los grupos estudiados. Por otra parte, Las concentraciones plasmáticas de tioles libres, referidos como glutatión reducido (GSH), fueron superiores ( $p=0,020$ ) en los pacientes en comparación con los controles.

## Discusión

En el presente estudio se aplicaron una serie de métodos y herramientas bioquímicas con el objetivo de conocer el estado redox de pacientes con TEA y con ello contribuir al conocimiento que se genera en torno a esta área de la investigación.

Cuando las concentraciones de oxidantes se elevan se producen alteraciones en la homeostasis redox, con daño a las biomoléculas y alteraciones funcionales.

El cerebro es muy sensible al estrés oxidativo debido al alto requerimiento de energía, las grandes cantidades de hierro y lípidos y las catecolaminas autooxidables y los niveles bajos de ciertas moléculas antioxidantes endógenas.

Diversos reportes indican el aumento de los procesos de peroxidación lipídica, alteraciones de los fosfolípidos de las membranas celulares, la variación de los mecanismos de defensa antioxidantante, con disminución

de los niveles de proteínas séricas antioxidantes, como la transferrina y la ceruloplasmina, aspectos que en su conjunto sugieren modificaciones en la homeostasis redox en los niños autistas.<sup>13</sup>

Con todos estos datos, se ha propuesto una teoría etiopatogénica que implicaría un aumento del estrés oxidativo, una alteración del metabolismo de los lípidos de membrana, una respuesta inmunoinflamatoria anómala y una alteración del balance entre los mecanismos excitadores y supresores de la actividad neuronal. Esta vía etiopatogénica bioenergética supondría un claro nexo entre el autismo, la epilepsia y la disfunción energética mitocondrial, compartiendo los tres pilares de una alteración del metabolismo oxidativo.

La peroxidación lipídica (POL) es un proceso deletéreo que afecta los ensamblajes lipídicos y proteicos, como es el caso de las membranas celulares y las lipoproteínas plasmáticas y usualmente está asociado a un mal funcionamiento celular.<sup>14,15</sup> Como parte de los productos tóxicos derivados de la POL se encuentra el MDA. En los pacientes con TEA se pudo constatar un incremento significativo en las concentraciones plasmáticas de este indicador con respecto a los sujetos aparentemente sanos. Este comportamiento está en correspondencia con otros hallazgos reportados, donde se ha encontrado el incremento en los niveles de este producto de la POL en los pacientes y en los mismos se sugiere que esto conlleva a la pérdida del equilibrio redox celular en los TEA.<sup>16-18</sup>

Otra de las biomoléculas que pueden ser afectadas por las especies reactivas del oxígeno (ERO) son las proteínas, a través de su interacción directa con éstas o a través de la oxidación de lípidos y azúcares que luego son capaces de reaccionar con las proteínas y afectar su estructura y función.<sup>19</sup> En este sentido se apreció un incremento en la concentración de los PAOP, marcador que refleja el grado de oxidación de las proteínas plasmáticas, en especial de la albúmina, mediado por la acción de oxidantes clorinados, como el ácido hipocloroso, el que es liberado fundamentalmente por los neutrófilos activados, por lo que es considerado además, como un marcador de inflamación.<sup>18,19</sup> Los resultados respecto a este indicador resultan interesantes, teniendo en cuenta que los procesos inflamatorios juegan un determinado papel en la fisiopatología de los TEA.<sup>20</sup>

La actividad de las enzimas antioxidantes también está condicionada por la generación de las ERO,<sup>21</sup> el aumento o disminución de éstas puede observarse en diferentes estados fisiopatológicos donde el EO es

causa o consecuencia de estos. Los pacientes mostraron disminución significativa de la actividad de CAT con respecto a los controles sin cambios en la actividad de la SOD1. En concordancia con estos hallazgos, en estudios similares se reporta la disminución en la actividad de esta enzima, lo que puede conducir a la acumulación del peróxido de hidrógeno y por tanto a la presencia de condiciones oxidativas a nivel sistémico en estos pacientes.<sup>22</sup> En relación con la SOD1, resultados similares fueron obtenidos por otros autores, los que no reportan cambios en la actividad de esta enzima en los pacientes con TEA.<sup>23</sup>

Las actividades de la GPx y la GR, enzimas que participan en el denominado “ciclo redox del glutatión”, no difirieron entre pacientes y controles. Estos hallazgos coinciden con los reportados por otros autores.<sup>22</sup>

La determinación de los tioles proteicos libres permite la cuantificación de los grupos sulfidrilos, referidos fundamentalmente a los residuos de cisteínas libres y al GSH presentes en una muestra desproteinizada.<sup>24</sup> Este compuesto es muy estudiado en las enfermedades relacionadas con el EO, ya que es uno de los más sensibles a las perturbaciones oxidativas. Además, los niveles de GSH en sangre reflejan su contenido

en tejidos menos accesible y de esta manera es un indicador del estado redox.<sup>25</sup> Los resultados obtenidos, mostraron un incremento en las concentraciones plasmáticas de tioles libres en los pacientes. En tal sentido se ha descrito que en condiciones oxidativas moderadas o leves, las concentraciones en sangre de los compuestos con grupos tioles, tales como el glutatión reducido y las cisteínas, se encuentran incrementadas. Esto tiene lugar porque se produce la activación de enzimas que participan en la síntesis del glutatión ( $\gamma$ -glutamilcisteína sintasa y la cistationina- $\beta$ -sintasa), lo que provoca un aumento en su concentración así como su transporte hacia la sangre. Además se sugiere que las concentraciones sanguíneas de estos compuestos no necesariamente reflejan el contenido intracelular de estos metabolitos.<sup>26</sup>

En resumen los resultados del estudio sugieren la presencia de alteraciones en la homeostasis redox en los pacientes con trastornos del espectro autista. Estas evidencias podrían fundamentar la aplicación de estrategias terapéuticas novedosas basadas en la utilización de agentes protectores con capacidad antioxidante, como una alternativa en el tratamiento de estos pacientes.

## Referencias bibliográficas

1. American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 4th ed. Washington, DC: American Psychiatric Association; 1994.
2. Wingate M, Mulvihill B, Kirby RS, Pettygrove S, Cunniff C, Meaney F, et al. Prevalence of Autism Spectrum Disorders-Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network. 14 Sites, United States, 2008. MMWR Surveill Summ. 2012;61(3):1-19.
3. Hallmayer J, Cleveland S, Torres A, Phillips J, Cohen B, Torigoe T, et al. Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism. Arch Gen Psychiatry. 2011;68(11):1095-102.
4. Jones DP. Redefining Oxidative Stress. Antioxidants & Redox Signaling. 2006;8:1865-79.
5. Coleman M. Advances in autism research. Dev Med Child Neurol. 2005;47:148.
6. Guo Z, Kozlov S, Lavin M, Person MD, Paull TT. ATM Activation by Oxidative Stress. Science. 2010;330(6003):517-21.
7. Witko SV, Friedlander M, Nguyen KT, Capeillère BC, Thu NA, Zingraff J, et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. Kidney International. 1996;49:1304-13.
8. Marklund S, Marklund G. Involvement of superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. Eur J Biochem. 1974;47:469-74.
9. Aebi H. Catalase in vitro. Meth Enzymol. 1984;105:121.
10. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. J Lab Clin Med. 1967;70:158-169.
11. Carlberg I, Mannervik B. Glutathione reductase. Meth Enzymol. 1985;113:485-90.
12. Sedlak J, Lidsay RH. Estimation of total protein bound and non-protein sulphhydryl group in tissue with Ellman's reagent. Anal. Biochem 1968;25:192-205
13. Chauhan A, Chauhan V. Oxidative stress in autism. Pathophysiology. 2006;13:171-81.
14. Kühn H, Borchert A. Regulation of enzymatic lipid peroxidation: the interplay of peroxidizing and peroxide reducing enzymes. Free Radic Biol Med. 2002;33(2):154-72.
15. Imai H, Nakagawa Y. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. Free Radic Biol Med. 2003;34(2):145-69.

16. Levraud J, Iwase H, Shao ZH, Vanden Hoek TL, Schumacker T. Cell death during ischemia: relationship to mitochondrial depolarization and ROS generation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;284(2):H549-58.
17. Stadtman ER, Levine RL. Protein oxidation. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;899:191-208.
18. Ghezzo A, Visconti P, Abruzzo PM, Bolotta A, Ferreri C, et al. Oxidative Stress and Erythrocyte Membrane Alterations in Children with Autism: Correlation with Clinical Features. *PLoS ONE* 2013;8(6):e66418
19. Grune T, Merker K, Sandig G, Davies KJ. Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;305(3):709-18.
20. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen-Khoa T, Capeillère-Blandin C, Nguyen AT, Canteloup S, et al. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocytes activation in chronic renal failure. *J Immunol.* 1998;161:2524-2532.
21. Headlam HA, Davies MJ. Cell-mediated reduction of protein and peptide hydroperoxides to reactive free radicals. *Free Radic Biol Med.* 2003;34(1):44-55.
22. Vergani Lauraa, Lanza Cristina, Rivaro Paola, Abelmoschi M. Luisa, Genti Shyti, Veneselli Edvige, Minniti Giuseppe, Grasselli Elena, Canesi Laura, Voci Adriana. Metals, metallothioneins and oxidative stress in blood of autistic children. *Research in Autism Spectrum Disorders.* 2010.
23. Geier, Kern, & Geier. A prospective study of oxidative stress biomarkers in autistic disorders. *Electronic Journal of Applied Psychology: Innovations in Autism.* 2009;5(1):2-10.
24. Myhrstad MC, Carlsen H, Nordström O, Blomhoff R, Moskaug JØ. Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the gamma-glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter. *Free Radic Biol Med.* 2002;32(5):386-93.
25. Novo E, Parola M. Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2008;1:5.
26. Castellano-Higuera A, González-Reimers E, Alemán-Valls MR, Abreu-González P, Santolaria-Fernández F, Vega-Prieto de la M, Gómez-Sirvent JL and Pelazas-gonzález R. Cytokines and Lipid Peroxidation in Alcoholics UIT Chronic Hepatitis C Virus Infection. *Alcohol & Alcoholism.* 2008;43(2):137-42.