







INVESTIGAÇÃO

Rubeose facial diabética não está associada a estresse oxidativo e autofluorescência da pele^{☆,☆☆}

Aleksejs Zavorins ^{a,*}, Alise Silova ^b, Julija Voicehovska ^c e Janis Kisis ^a

^a Departamento de Infectologia e Dermatologia, Riga Stradins University, Riga, Letônia

^b Laboratório Científico de Bioquímica, Riga Stradins University, Riga, Letônia

^c Departamento de Doenças Internas, Riga Stradins University, Riga, Letônia

Recebido em 10 de agosto de 2018; aceito em 22 de outubro de 2018

Disponível na Internet em 14 de novembro de 2019

PALAVRAS-CHAVE

Angiopatas diabéticas;
Eritema;
Face;
Produtos finais de glicação avançada;
Estresse oxidativo;
Manifestações cutâneas

Resumo

Introdução: A rubeose facial diabética é um eritema facial persistente em pacientes com diabetes. A patogênese real não foi estudada. No entanto, especula-se que seja uma microangiopatia diabética cutânea.

Objetivo: Examinar a correlação entre a gravidade do eritema facial e as possíveis causas das complicações diabéticas microvasculares, a saber, estresse oxidativo, hiperglicemia e acúmulo cutâneo de produtos finais de glicação avançada.

Métodos: Pacientes diagnosticados com diabetes tipo 2 (n = 32) foram incluídos no estudo. O índice de eritema facial foi medido com Mexameter MX18. A acumulação cutânea de glicação avançada foi estimada medindo a autofluorescência da pele com glicação avançada Reader (DiagnOptics Technologies BV – Groningen, Holanda). Os níveis de hemoglobina glicada, estado antioxidante total e malondialdeído foram mensurados pelo ensaio TBARS. A correlação entre as variáveis selecionadas foi avaliada pelo teste de Spearman; valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Resultados: Observou-se uma correlação estatisticamente significativa entre estado antioxidante total e o índice de eritema facial ($\rho = 0,398$; $p = 0,024$). A correlação entre o índice de eritema facial e malondialdeído, autofluorescência da pele, hemoglobina glicada, índice de massa corporal, duração do diabetes e idade não foi estatisticamente significativa.

Limitações do estudo: Este foi um estudo observacional. A elevação do estado antioxidante total pode ter sido causada por vários fatores que também podem ter influenciado o desenvolvimento de rubeose facial, incluindo hiperbilirrubinemia e hiperuricemia.

DOI referente ao artigo:

<https://doi.org/10.1016/j.abd.2019.09.016>

[☆] Como citar este artigo: Zavorins A, Silova A, Voicehovska J, Kisis J. Rubeosis faciei diabetorum is not associated with oxidative stress and skin autofluorescence. An Bras Dermatol. 2019;94:561–6.

^{☆☆} Trabalho realizado no SIA “Veselības Centre 4” e no Laboratório Científico de Bioquímica, Riga Stradins University, Riga, Letônia.

* Autor para correspondência.

E-mail: aleksejs.zavorins@gmail.com (A. Zavorins).

Conclusões: Os resultados foram diferentes do esperado. O estado antioxidante total estava positivamente correlacionado com o índice de eritema facial; no entanto, não houve correlação com estresse oxidativo e autofluorescência da pele. Novos estudos devem ser realizados para revelar a causa da elevação do estado antioxidante total em pacientes com rubrose facial. © 2019 Publicado por Elsevier España, S.L.U. em nome de Sociedade Brasileira de Dermatologia. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Introdução

Diabetes *mellitus* (DM) é uma doença caracterizada por hiperglicemia persistente, seja por destruição autoimune de células β pancreáticas e produção deficiente de insulina (DM1), seja pela falência dos tecidos periféricos em responder adequadamente à insulina (DM2). DM também pode ser causado por doença pancreática ou trauma, bem como gravidez, certos defeitos genéticos, medicamentos e endocrinopatias.¹ O DM2 é responsável por até 90% de todos os casos de diabetes, estando fortemente associado à obesidade e a uma predisposição genética.^{1,2} A prevalência global de DM foi estimada em 8,8% em 2017.² O DM está associado ao desenvolvimento de complicações macro e microvasculares, nomeadamente retinopatia, neuropatia e nefropatia. A prevalência de retinopatia entre os pacientes com DM é estimada em 34,6%; aproximadamente um terço desenvolve retinopatia diabética com risco de perda de visão.³ Neuropatia e nefropatia diabéticas são causas comuns de amputações de membros inferiores e doença renal terminal, respectivamente.^{4,5} O desenvolvimento de complicações microvasculares está relacionado à hiperglicemia crônica, como demonstrado no Estudo Prospectivo de Diabetes do Reino Unido (UKPDS) e no Estudo de Controle e Complicações do Diabetes/Estudo das Intervenções e Complicações do Diabetes (DCCT/EDIC).⁶⁻⁸ Portanto, o papel do diagnóstico e do tratamento precoces do DM não pode ser subestimado.

A rubrose facial diabética é uma manifestação cutânea do DM. É caracterizada por um eritema facial difuso e persistente, mais comum entre os pacientes diabéticos. O aumento do número e diâmetro das vênulas superficiais nas regiões malares de pacientes diabéticos foi descrito histologicamente.⁹ Devido à falta de estudos recentes nesse campo, a prevalência e a patogênese da rubrose diabética não são conhecidas. No entanto, especula-se que seja um tipo de microangiopatia diabética e, portanto, poderia ser usada como um marcador potencial para outras complicações microvasculares diabéticas. A literatura não apresenta nenhum estudo que tenha realmente examinado essa associação.⁹⁻¹¹

O estresse oxidativo é considerado um elo crucial entre a hiperglicemia e o desenvolvimento de microangiopatias diabéticas.^{12,13} Estresse oxidativo é definido como uma produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS), como superóxido, hidroxila e peróxido de hidrogênio, e consequente insuficiência do sistema antioxidante em combatê-la.¹⁴ Brownlee postulou que a hiperglicemia causa superprodução de superóxido pela cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, que por sua vez ativa quatro vias que promovem o dano microvascular no diabetes: um aumento

no fluxo de glicose por meio da via do poli-ol, aumento da produção de produtos finais de glicação avançada (AGEs) derivados de glicose, indução da atividade da proteína quinase-C (PKC) e suprarregulação da atividade da via da hexosamina.¹³⁻¹⁸

Os AGEs são produtos de uma glicação não enzimática ou reação de Maillard, que é aumentada em casos de hiperglicemia e estresse oxidativo.¹⁹ Os AGEs formam ligações cruzadas anormalmente estáveis com colágeno e alteram proteínas intracelulares, incluindo fatores reguladores da transcrição. A glicação relacionada ao AGE das proteínas da cadeia respiratória mitocondrial estimula a produção adicional de ROS.¹⁷ A ativação de receptores de AGEs (RAGEs) induz a expressão do fator nuclear κ B (NF- κ B), pró-inflamatório.²⁰ O fator endotelial de crescimento vascular (VEGF) é uma proteína angiogênica sinalizadora crucial que promove a proliferação e a migração de células endoteliais e aumenta a permeabilidade do vaso.²⁰ O NF- κ B aumenta a expressão do VEGF e desencadeia a neovascularização da retina, que é uma característica da retinopatia diabética proliferativa.²¹ Alterações na microvasculatura conjuntival também foram observadas em pacientes com retinopatia diabética.^{22,23}

Os processos mencionados também poderiam promover a angiogênese na pele facial, manifestada clinicamente como rubrose facial diabética. Portanto, o objetivo deste estudo foi examinar a possível correlação entre estresse oxidativo, hiperglicemia, acúmulo cutâneo de AGEs e o grau de rubrose facial.

Métodos

População de estudo

Pacientes diagnosticados com DM2 (n = 32) de acordo com os critérios diagnósticos da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2011) foram incluídos no estudo.¹ Uma entrevista estruturada foi realizada para obter dados sobre a duração do diabetes, tabagismo, uso de medicamentos e presença de hipertensão. Indivíduos com história de eventos cardiovasculares ou policitemia, bem como sinais clínicos de doença aguda, dano actínico ou condições inflamatórias da pele facial, como dermatite seborreica, lúpus eritematoso sistêmico, rosácea papulopustular, eczema, psoríase e dermatomiosite foram excluídos do estudo. O índice de massa corporal (IMC) foi calculado no exame físico. As medições foram realizadas durante o inverno e início da primavera. Todos os pacientes foram classificados como fototipos I-II de Fitzpatrick, sem sinais de bronzeamento da pele. Esses dados estão resumidos na [tabela 1](#). Todos os participantes

Tabela 1 Características dos pacientes com diabetes *mel-litus* tipo 2

	Média (DP)
Idade (anos)	59,56 (14,85)
Duração do diabetes, anos	9,90 (5,86)
IMC, kg/m ²	32,68 (5,37)
HbA1c, %	7,60 (1,78)
	Quantidade (%)
Sexo (masculino/feminino)	13 (40,6) / 19 (59,4)
Fumantes ativos	5 (15,6)
Hipertensão arterial	23 (71,9)

IMC, índice de massa corporal.

assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido. O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade de Riga Stradins (aprovação n° 79/25.01.2018).

Avaliação do eritema

Mexamater MX18 (Courage & Khazaka electronic GmbH – Colônia, Alemanha), um dispositivo colorimétrico que emite comprimentos de onda específicos e analisa a luz que é refletida da pele, foi usado para avaliar rubeose facial ou eritema facial em pacientes diabéticos e no grupo controle. Isso possibilita calcular a quantidade de luz absorvida pela hemoglobina, apresentando-a como um índice de eritema (IE) em unidades arbitrárias de eritema (0–999 UAE).²⁴ Antes da medição, os pacientes foram autorizados a descansar por 30 minutos em uma sala com uma temperatura estável de 23 °C. O IE foi medido em cinco locais: malar esquerda e direita, região frontal, nariz e mento. O valor médio do IE para cada paciente foi calculado para análise posterior.

Medição de autofluorescência da pele

Os níveis de AGE na pele foram estimados de forma não invasiva pela mensuração da autofluorescência da pele. As medições foram realizadas usando o AGE Reader (DiagnOptics Technologies BV – Groningen, Holanda) em uma sala a 23 °C, com os pacientes em jejum. O mecanismo de ação do AGE Reader se baseia no fato de que certos AGEs têm propriedades fluorescentes. Uma área cutânea de 4 cm² é estimulada por luz ultravioleta. Posteriormente, um espectrômetro óptico detecta a luz emitida pela pele. O software estima a concentração relativa de AGEs na pele e a apresenta em unidades arbitrárias de eritema (UAE). As medidas foram feitas na face interna do antebraço direito, a aproximadamente 5 cm distalmente da fossa cubital.

Análise laboratorial

Amostras de sangue foram coletadas da veia antecubital dos pacientes diabéticos após jejum noturno.

O estado antioxidante total (TAS) foi medido por espectrofotometria automatizada (RX Daytona Analyser; Randox Laboratories, Ltd. – Reino Unido) no plasma de pacientes diabéticos. O kit RANDOX TAS (Cat. NX 2332; Randox Labo-

ratories, Ltd. – Reino Unido) foi utilizado de acordo com as instruções do fabricante. O plasma foi obtido a partir de tubos com heparina de lítio. As amostras foram centrifugadas a 3.500 rpm e armazenadas a –20 °C até a análise. O ABTS® (2,2'-azino-di-3-etilbenzotiazolin sulfonato) é incubado com metamioglobina e H₂O₂ para produzir o radical cátion ABTS^{•+}, caracterizado pela cor azul esverdeada, medido a 600 nm. Os antioxidantes no plasma dos pacientes diminuem a formação dessa cor proporcionalmente à sua concentração.^{25,26}

O malondialdeído (MDA) foi medido por espectrofotometria no plasma de pacientes diabéticos com o leitor de microplaca de absorbância Sunrise (TECAN – Suíça). Utilizou-se o ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) OxiSelect™ (Cat No. STA-330, CellBiolabs, Inc., Estados Unidos) de acordo com as instruções do fabricante. O plasma foi obtido em tubos que continham EDTA. As amostras foram centrifugadas a 3.500 rpm e armazenadas a –80 °C até a análise. As amostras foram incubadas com TBA a 95 °C. Após um breve período de tempo, os resultados foram obtidos espectrofotometricamente. Para avaliar o conteúdo de MDA no plasma dos pacientes, os resultados foram então comparados com a curva padrão para MDA.²⁷

A hemoglobina glicada (HbA1c) foi medida por imunensaio turbidimétrico de inibição (TINIA) em hemolisado, usando o analisador Cobas Integra (Roche – Mannheim, Alemanha).

Análise estatística

Os dados foram analisados no software SPSS (v. 23). A correlação entre as variáveis selecionadas foi avaliada pelo teste de Spearman devido ao pequeno tamanho da amostra e à distribuição não normal de vários dados, como observado pelo teste de Shapiro-Wilk; valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

Resultados

Observou-se uma correlação estatisticamente significativa entre o TAS e índice de eritema facial ($\rho = 0,398$; $p = 0,024$). MDA, autofluorescência da pele, níveis de HbA1c, IMC, duração do diabetes e idade não apresentaram correlação estatisticamente significativa com o índice de eritema facial. Os resultados estão resumidos na [tabela 2](#) e na [figura 1](#).

Discussão

A rubeose facial diabética é uma manifestação cutânea do DM na forma de eritema facial. Embora a literatura não apresente estudos sobre o tema, havia uma crença amplamente aceita de que essa seria uma forma de microangiopatia diabética.¹⁰ Os resultados deste estudo contradizem essa crença.

A hiperglicemia e o acúmulo de AGEs promovem o surgimento de complicações microvasculares no diabetes.^{16,19} O exame de biópsias de pele demonstrou que o acúmulo de AGEs está associado à presença de gravidade das complicações microvasculares no diabetes. Em estudos prospectivos, os níveis de AGEs nas biópsias cutâneas

Tabela 2 Correlação de postos de Spearman entre o eritema facial e vários parâmetros medidos. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos e estão destacados em negrito

	Índice de eritema facial, UAE	
	p de Spearman	valor-p
TAS, mmol/L	0,398	0,024
MDA, mmol/L	0,302	0,093
Autofluorescência da pele, AU	0,157	0,389
HbA1c, %	-0,117	0,525
Idade (anos)	-0,014	0,940
Duração do diabetes, anos	-0,127	0,488
IMC, kg/m ²	0,338	0,058

IMC, índice de massa corporal; MDA, malondialdeído; TAS, estado antioxidante total; UAE, unidades arbitrárias de eritema.

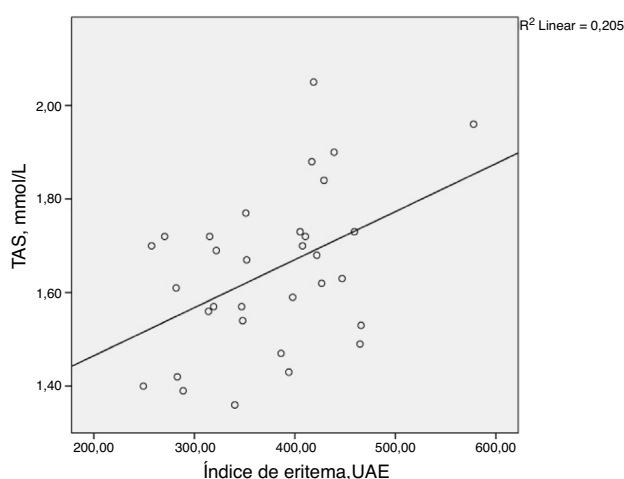


Figura 1 Correlação estatisticamente significativa entre o estado antioxidante total (TAS) e o índice de eritema facial ($p = 0,398$; $p = 0,024$). UAE, unidades arbitrárias de eritema.

poderiam até mesmo prever o risco de desenvolvimento de retinopatia diabética. A autofluorescência da pele é um método não invasivo e validado para estimar os níveis de AGE na pele. A associação entre a autofluorescência da pele e o desenvolvimento de complicações microvasculares diabéticas foi demonstrada em uma revisão sistemática.¹⁹ Esperava-se que pacientes com rubrose facial diabética apresentassem hiperglicemia e acúmulo de AGEs cutâneos mais pronunciados. No entanto, no presente estudo, o índice de eritema facial não estava correlacionado com HbA1c nem com autofluorescência da pele.

O estresse oxidativo é considerado um dos fatores que liga a hiperglicemia ao desenvolvimento de microangiopatias.^{15,16} Vários estudos apontam o aumento do estresse oxidativo em pacientes com DM, que é maior em pacientes com retinopatia diabética, neuropatia e nefropatia.^{28,29} Parecia plausível supor que o estresse oxidativo desempenhasse um papel importante no desenvolvimento da rubrose facial diabética.

MDA é um marcador de peroxidação lipídica, especialmente em caso de estresse oxidativo. Estudos anteriores

observaram uma elevação nesse marcador em casos de diabetes.³⁰ Pacientes com complicações microvasculares no diabetes tendem a apresentar níveis mais altos de MDA do que aqueles com diabetes não complicada, conforme medido pelo ensaio TBARS.³¹ Esse fato é especialmente observado em pacientes diabéticos com neuropatias e feridas crônicas, bem como em casos de retinopatia diabética.^{28,32}

No presente estudo, não se observou uma correlação significativa entre os níveis de MDA e o grau de eritema facial. Ensaio cromatográfico são considerados o padrão ouro para a determinação dos níveis de MDA no plasma devido a sua maior especificidade. No entanto, esse método é dispendioso e oneroso; assim, o ensaio TBARS ainda é amplamente utilizado.³³

O plasma sanguíneo contém vários compostos com propriedades antioxidantes, como bilirrubina, ácido úrico, ácido ascórbico, polifenóis e grupos tiol proteicos. É tecnicamente difícil mensurar a contribuição de cada antioxidante separadamente. Portanto, TAS é um método conveniente para descrever a capacidade antioxidante global de antioxidantes conhecidos e desconhecidos no plasma, considerando seus efeitos sinérgicos e antagonísticos; como esse método não mede a contribuição de enzimas antioxidantes para a capacidade antioxidante do plasma é uma limitação.^{25,34-36}

No presente estudo, o eritema facial em pacientes diabéticos foi positivamente correlacionado com o TAS. Esse achado também foi diferente do esperado. Estudos anteriores relataram níveis de TAS reduzidos em pacientes com diabetes *mellitus*.^{37,38} Níveis mais baixos de TAS foram observados em pacientes com retinopatia diabética quando comparados com aqueles com diabetes não complicada.³⁹ Esse achado é geralmente interpretado como um sinal de estresse oxidativo. Incomumente, alguns estudos relatam um aumento do nível de TAS em pacientes diabéticos.^{40,41} Alterações nos níveis de TAS podem ser mediadas por vários fatores; portanto, os resultados devem sempre ser interpretados com cautela.^{25,34-36} Por exemplo, sabe-se que a bilirrubina eleva os níveis de TAS.⁴² A bilirrubina atua como um antioxidante endógeno e também promove a angiogênese via VEGF. Níveis de bilirrubina sérica clinicamente elevados em pacientes diabéticos têm sido associados a um menor risco para o desenvolvimento de pé diabético e amputação de membros inferiores.^{37,43} Experimentos *in vivo* em ratos diabéticos demonstraram melhor cicatrização da ferida após a aplicação de pomada contendo bilirrubina. Nesse caso, a bilirrubina promoveu a angiogênese na ferida diabética, aumentando a expressão do VEGF.⁴⁴ Além disso, níveis séricos aumentados de ácido úrico também podem influenciar o TAS e têm sido associados a um risco maior de surgimento de retinopatia diabética.^{25,34-36,45} Teoricamente, tanto o ácido úrico quanto a bilirrubina podem causar elevação do TAS, bem como promover o desenvolvimento de rubrose facial diabética. Infelizmente, esses parâmetros não foram avaliados na presente investigação. É aconselhável medir os níveis de bilirrubina e ácido úrico e examinar sua associação com o surgimento de eritema facial em pacientes diabéticos.

Conclusões

A rubeose facial diabética não foi associada a níveis elevados de HbA1c, autofluorescência da pele e MDA. No entanto, observou-se uma correlação positiva significativa com o TAS. Isso contradiz as expectativas originais. A elevação do TAS pode ter sido causada por vários fatores que também podem ter influenciado o desenvolvimento de rubeose facial, incluindo hiperbilirrubinemia e hiperuricemia. Essa hipótese deve ser testada em estudos futuros. A associação direta entre rubeose facial diabética e retinopatia diabética também deve ser investigada.

Suporte financeiro

Riga Stradins University, Bolsas de Doutorado.

Contribuição dos autores

Aleksejs Zavorins: Análise estatística; aprovação da versão final do manuscrito; concepção e planejamento do estudo; elaboração e redação do manuscrito; obtenção, análise e interpretação dos dados; participação efetiva na orientação da pesquisa; participação intelectual em conduta propedêutica e/ou terapêutica de casos estudados; revisão crítica da literatura; revisão crítica do manuscrito.

Alise Silova: Aprovação da versão final do manuscrito; concepção e planejamento do estudo; obtenção, análise e interpretação dos dados; participação efetiva na orientação da pesquisa; participação intelectual em conduta propedêutica e/ou terapêutica de casos estudados; revisão crítica da literatura; revisão crítica do manuscrito.

Julija Voicehovska: Aprovação da versão final do manuscrito; concepção e planejamento do estudo; elaboração e redação do manuscrito; obtenção, análise e interpretação dos dados; participação efetiva na orientação da pesquisa; participação intelectual em conduta propedêutica e/ou terapêutica de casos estudados; revisão crítica da literatura; revisão crítica do manuscrito.

Janis Kisis: Aprovação da versão final do manuscrito; concepção e planejamento do estudo; obtenção, análise e interpretação dos dados; participação efetiva na orientação da pesquisa; participação intelectual em conduta propedêutica e/ou terapêutica de casos estudados; revisão crítica da literatura; revisão crítica do manuscrito.

Conflito de interesses

Nenhum.

Referências

1. Thomas CC, Philipson LH. Update on diabetes classification. *Med Clin North Am.* 2015;99:1–16.
2. Diabetesatlas.org. IDF Diabetes Atlas Brussels. 8th ed. Belgium: International Diabetes Federation; 2017. Available from: <http://www.diabetesatlas.org> [cited 11.11.18].
3. Yau JW, Rogers SL, Kawasaki R, Lamoureux EL, Kowalski JW, Bek T, et al. Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy. *Diabetes Care.* 2012;35:556–64.
4. Moura Neto A, Zantut-Wittmann DE, Fernandes TD, Nery M, Parisi MC. Risk factors for ulceration and amputation in diabetic foot: study in a cohort of 496 patients. *Endocrine.* 2013;44:119–24.
5. Nasri H, Rafeian-Kopaei M. Diabetes mellitus and renal failure: prevention and management. *J Res Med Sci.* 2015;20:1112–20.
6. Stratton IM, Adler AI, Neil HA, Matthews DR, Manley SE, Cull CA, et al. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. *BMJ.* 2000;321:405–12.
7. Diabetes Control and Complications Trial Research Group Nathan DM, Genuth S, Lachin J, Cleary P, Crofford O, et al. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1993;329:977–86.
8. Nathan DM; DCCT/EDIC Research Group. The diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications study at 30 years: overview. *Diabetes Care.* 2014;37:9–16.
9. Gitelson S, Wertheimer-Kapinski N. Color of the face in diabetes mellitus; observations on a group of patients in Jerusalem. *Diabetes.* 1965;14:201–8.
10. Bustan RS, Wasim D, Yderstræde KB, Bygum A. Specific skin signs as a cutaneous marker of diabetes mellitus and the pre-diabetic state – a systematic review. *Dan Med J.* 2017;64, pii: A5316.
11. Namazi MR, Jorizzo JL, Fallahzadeh MK. Rubeosis faciei diabeticorum: a common, but often unnoticed, clinical manifestation of diabetes mellitus. *ScientificWorldJournal.* 2010;10:70–1.
12. Heng LZ, Comyn O, Peto T, Tadros C, Ng E, Sivaprasad S, et al. Diabetic retinopathy: pathogenesis, clinical grading, management and future developments. *Diabet Med.* 2013;30:640–50.
13. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 2001;414:813–20.
14. Wu Y, Tang L, Chen B. Oxidative stress: implications for the development of diabetic retinopathy and antioxidant therapeutic perspectives. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:752387.
15. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes.* 2005;54:1615–25.
16. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res.* 2010;107:1058–70.
17. Chillelli NC, Burlina S, Lapolla A. AGEs, rather than hyperglycemia, are responsible for microvascular complications in diabetes: a “glycoxidation-centric” point of view. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2013;23:913–9.
18. Araki E, Nishikawa T. Oxidative stress: a cause and therapeutic target of diabetic complications. *J Diabetes Investig.* 2010;1:90–6.
19. Bos DC, de Ranitz-Greven WL, de Valk HW. Advanced glycation end products, measured as skin autofluorescence and diabetes complications: a systematic review. *Diabetes Technol Ther.* 2011;13:773–9.
20. Costa PZ, Soares R. Neovascularization in diabetes and its complications. Unraveling the angiogenic paradox. *Life Sci.* 2013;92:1037–45.
21. DeNiro M, Al-Mohanna FA. Nuclear factor kappa-B signaling is integral to ocular neovascularization in ischemia-independent microenvironment. *PLOS ONE.* 2014;9:e101602.
22. Khansari MM, O'Neill W, Penn R, Chau F, Blair NP, Shahidi M. Automated fine structure image analysis method for discrimination of diabetic retinopathy stage using conjunctival microvasculature images. *Biomed Opt Express.* 2016;7:2597–606.
23. Banaee T, Pourreza H, Doosti H, Abrishami M, Ehsaei A, Basiry M, et al. Distribution of different sized ocular surface vessels in diabetics and normal individuals. *J Ophthalmic Vis Res.* 2017;12:361–7.
24. Matias AR, Ferreira M, Costa P, Neto P. Skin colour, skin redness and melanin biometric measurements: comparison study

- between Antera® 3D, Mexameter® and Colorimeter®. *Skin Res Technol.* 2015;21:346–62.
25. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem.* 2004;37:277–85.
 26. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci (Lond).* 1993;84:407–12.
 27. Gavrilov VB, Gavrilova AR, Mazhul' LM. Methods of determining lipid peroxidation products in the serum using a thiobarbituric acid test. *Vopr Med Khim.* 1987;33:118–22.
 28. Sharma S, Saxena S, Srivastav K, Shukla RK, Mishra N, Meyer CH, et al. Nitric oxide and oxidative stress is associated with severity of diabetic retinopathy and retinal structural alterations. *Clin Exp Ophthalmol.* 2015;43:429–36.
 29. Adeshara KA, Diwan AG, Jagtap TR, Advani K, Siddiqui A, Tupe RS. Relationship between plasma glycation with membrane modification, oxidative stress and expression of glucose transporter-1 in Type 2 diabetes patients with vascular complications. *J Diabetes Complicat.* 2017;31:439–48.
 30. Likidlilid A, Patchanans N, Peerapatdit T, Sriratanasathavorn C. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in erythrocytes of Type 2 diabetic patients. *J Med Assoc Thai.* 2010;93:682–93.
 31. Bansal S, Chawla D, Siddarth M, Banerjee BD, Madhu SV, Tripathi AK. A study on serum advanced glycation end products and its association with oxidative stress and paraoxonase activity in type 2 diabetic patients with vascular complications. *Clin Biochem.* 2013;46:109–14.
 32. Arya AK, Pokharia D, Tripathi K. Relationship between oxidative stress and apoptotic markers in lymphocytes of diabetic patients with chronic non-healing wound. *Diabetes Res Clin Pract.* 2011;94:377–84.
 33. Moselhy HF, Reid RG, Yousef S, Boyle SP. A specific, accurate, and sensitive measure of total plasma malondialdehyde by HPLC. *J Lipid Res.* 2013;54:852–8.
 34. Pinchuk I, Shoval H, Dotan Y, Lichtenberg D. Evaluation of antioxidants: scope, limitations and relevance of assays. *Chem Phys Lipids.* 2012;165:638–47.
 35. Bartosz G. Non-enzymatic antioxidant capacity assays: limitations of use in biomedicine. *Free Radic Res.* 2010;44:711–20.
 36. Fraga CG, Oteiza PI, Galleano M. In vitro measurements and interpretation of total antioxidant capacity. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1840:931–4.
 37. Chan KH, O'Connell RL, Sullivan DR, Hoffmann LS, Rajamani K, Whiting M, et al. Plasma total bilirubin levels predict amputation events in type 2 diabetes mellitus: the fenofibrate intervention and event lowering in diabetes (FIELD) study. *Diabetologia.* 2013;56:724–36.
 38. Opara EC, Abdel-Rahman E, Soliman S, Kamel WA, Souka S, Lowe JE, et al. Depletion of total antioxidant capacity in type 2 diabetes. *Metabolism.* 1999;48:1414–7.
 39. Rodríguez-Carrizalez AD, Castellanos-González JA, Martínez-Romero EC, Miller-Arrebillaga G, Villa-Hernández D, Hernández-Godínez PP, et al. Oxidants, antioxidants and mitochondrial function in non-proliferative diabetic retinopathy. *J Diabetes.* 2014;6:167–75.
 40. Savu O, Ionescu-Tirgoviste C, Atanasiu V, Gaman L, Papacocea R, Stoian I. Increase in total antioxidant capacity of plasma despite high levels of oxidative stress in uncomplicated type 2 diabetes mellitus. *J Int Med Res.* 2012;40:709–16.
 41. Kharroubi AT, Darwish HM, Akkawi MA, Ashareef AA, Almasri ZA, Bader KA, et al. Total antioxidant status in type 2 diabetic patients in Palestine. *J Diabetes Res.* 2015;2015:461271.
 42. Rodrigues C, Rocha S, Nascimento H, Vieira E, Santos R, Santos-Silva A, et al. Bilirubin levels and redox status in a young healthy population. *Acta Haematol.* 2013;130:57–60.
 43. Chen J, Wang J, Zhang X, Zhu H. Inverse relationship between serum bilirubin levels and diabetic foot in Chinese patients with type 2 diabetes mellitus. *Med Sci Monit.* 2017;23:5916–23.
 44. Ram M, Singh V, Kumawat S, Kant V, Tandan SK, Kumar D. Bilirubin modulated cytokines, growth factors and angiogenesis to improve cutaneous wound healing process in diabetic rats. *Int Immunopharmacol.* 2016;30:137–49.
 45. Kuwata H, Okamura S, Hayashino Y, Tsujii S, Ishii H, Diabetes Distress and Care Registry at Tenri Study Group. Serum uric acid levels are associated with increased risk of newly developed diabetic retinopathy among Japanese male patients with type 2 diabetes: a prospective cohort study (diabetes distress and care registry at Tenri [DDCRT 13]). *Diabetes Metab Res Rev.* 2017;33:e2905.