

# Actividad de la enzima antioxidante

## superóxido dismutasa y niveles de cobre y zinc en pacientes con diabetes mellitus tipo 2

Alfonso Bravo<sup>1a</sup>, Sylvia Araujo<sup>1a</sup>, María Eugenia Vargas<sup>2b</sup>, Johan Mesa<sup>1c</sup>, Aida Souki<sup>2a</sup>, Valmore Bermúdez<sup>2</sup>, Clímaco Cano<sup>2d</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Investigación y Desarrollo en Nutrición.

<sup>2</sup>Centro de Investigaciones Endocrino-Metabólicas "Dr. Félix Gómez".

Facultad de Medicina. Universidad del Zulia. Maracaibo. Venezuela.

Trabajo financiado por proyecto CONDES #355-2000.

Correspondencia a: Alfonso Bravo. Dirección: Calle 92 No 9-36, Veritas. Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela. Teléfono: 0058-261-7353239, 0058-4146372001. Fax: 0058-261-7597279. E-mail: arbravo@gmail.com.

<sup>a</sup> Biólogo

<sup>b</sup> Bioanalista

<sup>c</sup> Técnico en Química

<sup>d</sup> Farmacólogo

Recibido: 10/02/2007

Aceptado: 02/04/2007

### Resumen

Los seres vivos han desarrollado diversos mecanismos moleculares, donde participan antioxidantes enzimáticos y cofactores minerales, los cuales permiten la estabilización de estas especies reactivas y ofrecen protección contra sus efectos dañinos. Se ha determinado que en la diabetes existe una mayor producción de radicales libres, razón por la cual el objetivo del presente estudio fue determinar la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) y su relación con los niveles de cobre (Cu) y zinc (Zn) en pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Fueron tomadas muestras sanguíneas en ayuno de 34 pacientes diabéticos y 30 sujetos no diabéticos (controles), para medir la actividad de la Cu/Zn-SOD eritrocitaria y cuantificar Cu y Zn en suero y eritrocitos, mediante métodos espectrofotométricos. Los pacientes con DM2 presentaron una actividad de la Cu/Zn-SOD significativamente inferior ( $1839 \pm 101$  U/g Hb) a los controles ( $2573 \pm 161$  U/g Hb) ( $p < 0,05$ ). En diabéticos, los niveles de cobre sérico ( $59,50 \pm 6,02$   $\mu\text{g/dL}$ ) y eritrocitario ( $1,76 \pm 0,14$   $\mu\text{g/g Hb}$ ) fueron significativamente mayores que en los controles ( $55,45 \pm 5,80$   $\mu\text{g/dl}$  y  $1,27 \pm 0,13$   $\mu\text{g/g Hb}$ ) ( $p < 0,05$ ). El Zn sérico en diabéticos ( $119,59 \pm 6,73$   $\mu\text{g/dl}$ ) fue significativamente bajo en comparación con los controles ( $134,74 \pm 9,43$   $\mu\text{g/dl}$ ), pero los diabéticos tenían más Zn en eritrocitos ( $39,13 \pm 1,05$   $\mu\text{g/g Hb}$ ) que los controles ( $31,62 \pm 1,75$   $\mu\text{g/g Hb}$ ) ( $p < 0,05$ ). La actividad de la Cu/Zn-SOD sólo se correlacionó positivamente con el Zn sérico en controles ( $r = 0,712$ ;  $p < 0,05$ ). Los resultados sugieren que los pacientes con DM2 presentan una alteración en el sistema de defensa antioxidante endógeno mediado por la SOD y sus cofactores.

**Palabras claves:** Diabetes mellitus tipo 2, superóxido dismutasa, cobre, zinc.

### Abstract

Living beings have developed diverse molecular mechanisms, including enzymatic antioxidants and their mineral cofactors, which allow for the stabilization of these reactive species in order to offer protection against their damaging effects. An elevated production of free radicals has been associated with diabetes. The objective of this study was to determine the activity of the enzyme superoxide dismutase (SOD) and its relations with the levels of copper (Cu) and zinc (Zn) in patients with type 2 diabetes mellitus (DM2). Fasting blood samples were taken in 34 diabetics and 30 non diabetic subjects (controls), with the purpose of measuring the erythrocyte activity of Cu/Zn-SOD, as well as to quantify serum and erythrocyte Cu and Zn with spectrophotometric methods. The SOD activity in patients with DM2 was significantly lower ( $1839 \pm 101$  U/g Hb) than in controls ( $2573 \pm 161$  U/g Hb) ( $p < 0.05$ ). Copper levels in diabetic serum ( $59.50 \pm 6.02$  mg/dL) and erythrocyte ( $1.76 \pm 0.14$   $\mu\text{g/g Hb}$ ) were significantly higher than in controls ( $55.45 \pm 5.80$  mg/dL and  $1.27 \pm 0.13$   $\mu\text{g/g Hb}$ ) ( $p < 0.05$ ). Serum Zn in diabetics ( $119.59 \pm 6.73$  mg/dL) was significantly lower than in controls ( $134.74 \pm 9.43$  mg/dL), but the diabetics had higher Zn in erythrocyte ( $39.13 \pm 1.05$   $\mu\text{g/g Hb}$ ) than the controls ( $31.62 \pm 1.75$   $\mu\text{g/g Hb}$ ) ( $p < 0.05$ ). A significant positive correlation between Cu/Zn-SOD activity and serum Zn ( $r = 0.712$ ,  $p < 0.05$ ) was only found in controls. These results suggest that the patients with DM2 present an alteration in the endogenous system of antioxidant defences mediated by the SOD and its cofactors.

**Key words:** Type 2 diabetes mellitus, superoxide dismutase, copper, zinc.

La diabetes mellitus es un estado crónico de hiperglicemia que afecta alrededor de 124 millones de personas en el mundo<sup>1</sup>. Aún cuando existen varios tipos de diabetes, cerca del 90% de las personas afectadas presentan la tipo 2 (DM2), conocida comúnmente como diabetes mellitus no dependiente de insulina. Estos pacientes por lo general son obesos, cursan con elevados niveles de insulina plasmática, resistencia a la insulina y usualmente deficiencia relativa de esta hormona<sup>2</sup>.

En la diabetes, se producen una serie de cambios metabólicos que ponen de manifiesto una mayor producción de especies reactivas del oxígeno (ERO), también llamadas radicales libres<sup>3</sup>. Las mismas, son átomos o moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera una alta inestabilidad, reaccionando y alterando a la vez las funciones de diferentes biomoléculas incluyendo carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos<sup>4</sup>. El desbalance en la producción de ERO y las defensas antioxidantes, provoca un daño conocido como estrés oxidativo, que lleva a una variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos, tales como glicosilación de proteínas, peroxidación lipídica y autoxidación de la glucosa, los cuales provocan el deterioro y muerte celular<sup>5,6</sup>.

Dada la alta reactividad de las ERO, los seres vivos han desarrollado diversos mecanismos eficientes que permiten la estabilización, eliminación y protección contra sus efectos dañinos<sup>7</sup>. Entre estos mecanismos se destacan enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPX), las cuales requieren para su actividad biocatalítica de ciertos elementos minerales que actúan como cofactores<sup>8,9</sup>. Resultados experimentales sustentan la hipótesis de una relación directa entre los niveles de minerales y la actividad de las enzimas antioxidantes<sup>10</sup>. Particularmente la SOD requiere de cobre (Cu) y Zinc (Zn) como cofactores, los cuales, además de su capacidad antioxidante, desempeñan otras importantes funciones a nivel celular, relacionados con la inmunidad, maduración sexual, expresión de información genética, producción de energía, entre otras<sup>11</sup>.

En los pacientes diabéticos se han encontrado deficiencias dietéticas de minerales y vitaminas, por lo que actualmente existe un mayor interés en el control metabólico desde el punto de vista nutricional<sup>12,13</sup>. Además, existen estudios recientes que han demostrado que esta patología conlleva a alteraciones del metabolismo de ciertos minerales encontrados en cantidades trazas en la sangre<sup>14,15</sup>. Sin embargo, debido a los resultados contradictorios sigue en discusión el papel de la diabetes en el estado mineral del Cu y Zn<sup>16,17</sup> y su efecto en la actividad de enzimas antioxidantes.

Por todo lo antes expuesto, se consideró importante determinar la actividad de la enzima antioxidante SOD y su relación con los niveles séricos y eritrocitarios de sus cofactores Cu y Zn en pacientes diabéticos tipo 2, a fin de contribuir con la búsqueda de nuevos sensores metabólicos, que permitan pronosticar y diagnosticar la diabetes. Así como también, junto a otros medios diagnósticos específicos, permita evaluar las consecuencias de la excesiva producción de radicales libres en la enfermedad.

Se estudió una muestra de 34 pacientes adultos con diabetes mellitus tipo 2, los cuales asistieron a la consulta del Centro de Investigaciones Endocrino-Metabólicas "Dr. Félix Gómez", ubicado en la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela, con un tiempo de evolución de la enfermedad de 5-10 años, sin patologías asociadas ni complicaciones de la diabetes. La selección de los mismos fue realizada en forma aleatoria, incluyendo pacientes de ambos sexos con edades comprendidas entre 34 y 59 años que cumplieran con los criterios anteriores. Con propósitos comparativos, fueron evaluados 30 individuos sin historia de diabetes mellitus (grupo control). Se excluyeron todos los sujetos que estuvieran consumiendo suplementos antioxidantes al menos un mes previo a la toma de las muestras sanguíneas. Para realizar una valoración antropométrica de los voluntarios, se registró el peso, la talla y se calculó el índice de masa corporal (IMC). En todos los procedimientos efectuados se siguieron las normas de la Segunda Declaración de Helsinki para la investigación con seres humanos.

Fueron colectadas muestras de sangre de los pacientes diabéticos y controles por venopunción en el área antecubital, realizada en horario matutino y previo ayuno de 12 horas. Se dispensó un volumen adecuado de sangre en tubos químicamente limpios sin anticoagulante para la separación del suero y en tubos con heparina o EDTA, para obtener sangre completa.

*Determinaciones bioquímicas.* Se determinó la glicemia basal (mg/dl), colesterol total (mg/dl), triacilglicéridos (mg/dl) y colesterol asociado a las HDL (mg/dl), según métodos enzimáticos normalizados (Human, Gesselschalt, Alemania). Adicionalmente, se midió la fracción de hemoglobina glicosilada (HbA1c) en los pacientes diabéticos, empleando un sistema basado en la separación de esta molécula por cromatografía de afinidad con derivados del ácido borónico (Nycocard™ HbA1c, Primus Corp, USA). La concentración total de hemoglobina se cuantificó mediante el método de la cianometahemoglobina (Wiener Lab., Argentina).

*Ensayos de actividad enzimática.* La actividad de la enzima Cu/Zn-SOD fue medida en los lisados de eritrocitos, preparados dentro de las 4 h siguientes a la venopunción. Se centrifugó un volumen de 500 µl de sangre heparinizada a 1000 g por 10 minutos para separar el plasma. La capa sobrenadante fue retirada y los eritrocitos se lavaron tres veces con solución salina fría (9,0 g/l de NaCl). Se produjo hemólisis agregando 4 volúmenes de agua desionizada fría. Los hemolisados fueron ultracongelados a -80°C en alícuotas de 500 µl, para su posterior análisis. Se utilizó un kit comercial basado en un método espectrofotométrico (Bioxytech® SOD-525™, Oxis Research, USA). La actividad específica fue medida a una longitud de onda de 525 nm, previa extracción de la enzima con una mezcla de etanol/cloroformo 62,5/37,5 (v/v). Los resultados fueron expresados en U/g de hemoglobina.

*Cuantificación de minerales.* Se realizaron determinaciones de cobre y zinc tanto en suero como en lisado de eritrocitos, los cuales fueron sometidos a digestión en bombas tipo Parr<sup>(18)</sup>, con ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) concentrado. Las muestras digeridas se analizaron por espectrofotometría de absorción atómica, en un equipo Perkin Elmer 3100 calibrado a 324,8 nm (Cu) y 213,9 nm (Zn). Las concentraciones de los minerales

fueron expresadas en  $\mu\text{g}/\text{dl}$  en suero ó  $\mu\text{g}/\text{g}$  de hemoglobina. Se valoró la exactitud y precisión de la técnica empleando muestras de materiales de referencia (tejido de hoja de melocotón NIST 1547, tejido de ostra NIST 1566a, USA).

**Análisis Estadístico.** Se comprobó la distribución normal de los datos obtenidos mediante el test "W" de Shapiro-Wilks. Los resultados fueron expresados como el promedio  $\pm$  el error estándar. Se aplicó el test "t" de Student, con la finalidad de estudiar diferencias entre el grupo de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 y controles. El coeficiente de correlación de Pearson fue usado para investigar asociaciones entre la actividad enzimática de la Cu/Zn-SOD y los niveles de minerales. Se consideró estadísticamente significativo un valor de  $p < 0,05$ . Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa SPSS 10.0.

## Resultados

La Tabla 1 muestra las características clínicas-bioquímicas de los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 y los controles evaluados en el presente estudio. No hubo diferencias significativas entre ambos grupos en cuanto a la edad, IMC, colesterol total y HDL-colesterol. La glicemia basal y los triacilglicéridos fueron significativamente mayores en los diabéticos en comparación con los controles ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 1. Características clínicas - bioquímicas de los pacientes diabéticos y controles**

	Diabéticos	No diabéticos
Edad (años)	56 $\pm$ 1	52 $\pm$ 3
Sexo (M/H)	18/16	20/10
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	28 $\pm$ 2	29 $\pm$ 1
Glicemia basal (mg/dl)	174 $\pm$ 12 *	85 $\pm$ 3 *
Colesterol total (mg/dl)	230 $\pm$ 20	226 $\pm$ 11
Triacilglicéridos (mg/dl)	352 $\pm$ 94 *	225 $\pm$ 35 *
HDL-colesterol (mg/dl)	38 $\pm$ 5	39 $\pm$ 4
Hemoglobina glicosilada (%)	12 $\pm$ 1	-

\*  $p < 0,05$  "t" de Student. Sexo: M: Mujeres/H: Hombres.

En la Tabla 2 se presentan los resultados sobre la actividad de la enzima superóxido dismutasa, los niveles de cobre y zinc para los grupos en estudio. Los pacientes diabéticos presentaron una actividad de Cu/Zn-SOD significativamente inferior a los controles ( $p < 0,05$ ). En los diabéticos, los niveles de cobre en suero y eritrocitos fueron significativamente mayores que en los controles ( $p < 0,05$ ). La concentración sérica de Zn y la relación Cu/Zn en los diabéticos fueron significativamente bajas en comparación con los controles, pero los eritrocitos de los diabéticos contenían más Zn que los controles ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 2. Actividad de la enzima superóxido dismutasa y niveles de cobre y zinc en pacientes diabéticos y controles**

	Diabéticos	No diabéticos
SOD (U/g Hb)	1839 $\pm$ 101 *	2573 $\pm$ 161 *
Cu sérico ( $\mu\text{g}/\text{dl}$ )	59,50 $\pm$ 6,02 *	55,45 $\pm$ 5,80 *
Zn sérico ( $\mu\text{g}/\text{dl}$ )	119,59 $\pm$ 6,73 *	134,74 $\pm$ 9,43 *
Cu/Zn sérico	0,62 $\pm$ 0,08 *	0,74 $\pm$ 0,19 *
Cu eritrocitario ( $\mu\text{g}/\text{g}$ Hb)	1,76 $\pm$ 0,14 *	1,27 $\pm$ 0,13 *
Zn eritrocitario ( $\mu\text{g}/\text{g}$ Hb)	39,13 $\pm$ 1,05 *	31,62 $\pm$ 1,75 *

\*  $p < 0,05$  "t" de Student.

La Tabla 3 muestra el análisis de correlaciones entre la actividad de la superóxido dismutasa y los niveles de minerales en los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 y controles. Sólo se encontró una significativa correlación positiva entre la actividad de la SOD y Zn sérico en los controles ( $r = 0,712$ ;  $p < 0,05$ ).

**Tabla 3. Correlaciones entre la actividad de la enzima superóxido dismutasa y los niveles de cobre y zinc en pacientes diabéticos y controles.**

	Diabéticos		No diabéticos	
	r *	p **	r *	p **
SOD-Zn sérico	-0,271	NS	0,712	<0,05
SOD-Cu sérico	-0,210	NS	0,334	NS
SOD-Zn eritrocitario	-0,243	NS	0,270	NS
SOD-Cu eritrocitario	0,209	NS	-0,249	NS

\* Coeficiente de correlación de Pearson. \*\* Significancia. NS: No significativo.

## Discusión

En la diabetes se producen una serie de cambios que de forma indirecta indican la existencia de un marcado estrés oxidativo, debido al incremento en la formación de radicales libres del oxígeno y la disminución de los niveles plasmáticos e intracelulares de los antioxidantes<sup>19,21</sup>. El propósito de este estudio fue determinar la actividad de la enzima antioxidante SOD y su relación con los niveles de sus cofactores cobre y zinc en pacientes con diabetes mellitus tipo 2.

Los resultados permitieron evidenciar en el grupo de pacientes diabéticos una actividad significativamente disminuida de la enzima SOD, en comparación a los controles, lo que concuerda con los trabajos de Vergaray<sup>22</sup>, Gugliucci<sup>23</sup> y Bhatia<sup>24</sup>, realizados en diabéticos crónicos. Se ha demostrado que la actividad baja de esta enzima es consecuencia de los elevados niveles de peróxido de hidrógeno producido durante la reacción, que inhiben a la enzima por retroalimentación negativa<sup>25,27</sup>. En efecto, se ha observado que inicialmente se produce un incremento de la SOD, como respuesta a la elevada generación del anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) en la célula y su eliminación por la enzima; sin embargo, la intensa producción de este radical por un tiempo prolongado, agota la estimulación de la actividad enzimática, ya que el producto de la reacción puede inhibirla.

Algunos estudios han fallado en demostrar diferencias en la actividad de la SOD entre diabéticos y no diabéticos<sup>28</sup>. Otros por el contrario, han encontrado en estos pacientes, una actividad elevada de la enzima SOD; pudiendo dicho incremento estar asociado con el desarrollo de complicaciones de la diabetes como las retinopatías<sup>29</sup> y enfermedades cardiovasculares<sup>30</sup>. La razón de la inconsistencia en los resultados, puede deberse a la heterogeneidad de los pacientes diabéticos, relacionado con la edad, diferencias raciales y a procesos inflamatorios que no se tomaron en consideración en el momento de la toma de muestras, además de la diversidad de protocolos de investigación y al uso de diferentes métodos para la determinación de la actividad enzimática.

Por otro lado, los diabéticos evaluados presentaron valores elevados de hemoglobina glicosilada ( $\text{HbA}_{1c}$ ), lo cual evidencia en estos pacientes un pobre control metabólico de la en-

fermedad, que podría a su vez contribuir en la disminución de la actividad de la SOD por glicosilación de la enzima<sup>22,31</sup>. El descontrol de la glicemia conduce al incremento de la velocidad de los procesos de glicosilación y oxidación de lípidos y proteínas, lo que provoca cambios conformacionales de estas macromoléculas y por lo tanto el deterioro de sus funciones<sup>19</sup>.

Con respecto a la concentración de minerales (Cu y Zn), a diferencia de lo reportado por Chen y col.<sup>32</sup>, se encontró que los pacientes diabéticos presentaron niveles de cobre séricos y eritrocitarios significativamente más elevados que los controles, lo que concuerda con estudios previos<sup>33</sup>. Además, se ha reportado que los niveles de cobre plasmático están más elevados en aquellos pacientes diabéticos que presentan complicaciones<sup>34</sup>. En este sentido, se ha establecido la hipótesis de que las alteraciones en el metabolismo del cobre contribuyen a la progresión de las patologías relacionadas con la diabetes, debido a que las proteínas glicosiladas presentan una mayor afinidad por los metales de transición como el cobre<sup>35</sup>.

Cuando se evaluaron los niveles séricos de zinc, estos resultaron significativamente bajos en los diabéticos, lo cual se corresponde con la mayoría de las investigaciones realizadas con diabéticos tipo 1<sup>36</sup> y tipo 2<sup>12,37</sup>, aunque difieren de otros estudios<sup>16,17</sup>. Esta aparente hipozincemia puede ser el resultado de pérdida urinaria, de disminución en la absorción intestinal de este mineral, o de ambas condiciones<sup>38,39</sup>. La disminución en los depósitos tisulares de Zn es otro hallazgo concurrente en los pacientes diabéticos, pero no está claro aún si es debido a la hiperzincuria, a un evento independiente relacionado al efecto de la insulina o a la hiperglicemia, con la resultante disminución del Zn corporal total y la eventual disminución sérica de zinc<sup>40</sup>.

Esta menor concentración de Zn en los diabéticos, podría también reflejar un incremento en la entrada de este mineral al eritrocito, como un mecanismo compensatorio debido a la mayor utilización del mismo en los sistemas antioxidantes de estas células, lo que se sustenta con nuestros resultados, donde se evidenciaron niveles de zinc eritrocitario significativamente elevado en los pacientes diabéticos. Por otro lado, el análisis de la relación Cu/Zn en suero, permitió evidenciar en los pacientes diabéticos un valor significativamente menor en comparación con los controles, contrario a los reportado por otros autores que han señalado un aumento de esta relación en diabetes mellitus tipo 2<sup>41</sup>.

Varios estudios comprueban la hipótesis de una relación directa entre los niveles de cobre, zinc y la actividad de la SOD en individuos sanos y con diferentes patologías<sup>42,44</sup>, pero los reportes en diabéticos son escasos. A pesar de que ésta es una enzima antioxidante de primer orden que requiere de Cu y Zn para su actividad, los niveles bajos de la misma detectados en los diabéticos del estudio no están directamente relacionados con las variaciones encontradas en los niveles séricos y eritrocitarios de estos elementos traza, sino que pueden corresponder principalmente al efecto de la glicosilación sobre la actividad enzimática.

Generalmente, se asocia la depleción en la SOD con una inadecuada disponibilidad de Zn y Cu en los eritrocitos para la

función de esta enzima, pero sorprendentemente el contenido de ambos minerales fue más elevado en los eritrocitos de los diabéticos, lo que a su vez permite explicar la tendencia observada en este grupo hacia correlaciones negativas entre la actividad de SOD y los niveles de estos minerales. Por otro lado, en los sujetos no diabéticos el Zn sérico se correlacionó positivamente con la actividad de SOD; sin embargo, Agte y col.<sup>45</sup> reportaron en sujetos sanos una correlación inversa entre la actividad de la SOD y la captación de Zn por los eritrocitos.

La investigación realizada sugiere que los pacientes con diabetes mellitus tipo 2 presentan una alteración en el sistema de defensa antioxidante endógeno mediado por la SOD y sus cofactores. Los resultados de este estudio aportan información de referencia a nivel local, además la posibilidad de aplicar los conocimientos generados, a fin de evitar o retardar la aparición de las complicaciones crónicas de la diabetes en terapias específicas con la enzima y/o la suplementación de minerales.

## Referencias

- King H, Aubert R, Herman W. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 1998; 21: 1414-1431.
- Bonow R, Eckel R. Diet, obesity and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2003; 348: 2057-2058.
- Villa-Caballero L, Nava-Ocampo A, Frati-Munari A, Ponce-Monter H. Oxidative stress. Should it be measured in the diabetic patient? *Gac Med Mex* 2000; 136: 249-256.
- Rodríguez JM, Menéndez JR, Trujillo Y. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Rev Cubana Med Milit* 2001; 30: 36-44.
- Seghrouchni I, Draï J, Bannier E, Riviere J, Calmard P, Garcia I, et al. Oxidative stress parameters in type I, type II and insulin-treated type 2 diabetes mellitus; insulin treatment efficiency. *Clin Chim Acta* 2002; 321: 89-96.
- Opara EC. Role of oxidative stress in the etiology of type 2 diabetes and the effect of antioxidant supplementation on glycemic control. *J Investig Med* 2004; 52: 19-23.
- Betteridge D. What is oxidative stress? *Metabolism* 2000; 49: 3-8.
- Omar B, Flores S, Mcco'rd, J. Superoxide dismutase: pharmacological developments and applications. *Adv. Pharmacol* 1992; 23: 109-161.
- Romero E, Bosch M, Romero M, Jareño E, Romero B, Marín N, et al. Lipid peroxidation and antioxidants in human disease. *Environmental Health Perspectives* 1998; 106: 1229-1233.
- Podracka L, SAsinka M, Racz O, Sipulova A, Cayova E, Horska M, et al. Relation between metabolism of trace elements and the antioxidant defense system in chronic nephropathies. *Cas Lek Cesk* 1999; 138: 337-339.
- Czajka-Narins D. Minerales. En: Mahan K, Escott S, Stump MR, ed. *Nutrición y Dietoterapia de Krause*. Ciudad de México: Editorial Mc Graw Hill, 1998; 109-128.
- Faure P. Protective effects of antioxidant micronutrients (vitamin E, Zinc and selenium) in type 2 diabetes mellitus. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41: 995-998.
- Parmet S, Lynn C, Glass RM. JAMA patient page. Weight gain and diabetes. *JAMA* 2004; 292: 998.
- Disilvestro RA. Zinc in relation to diabetes and oxidative disease. *J Nutr* 2000; 130:1509-1511.

- Ekmekcioglu C, Prohaska C, Pomazal K, Steffan I, Scherthner G, Marktl W. Concentrations of seven trace elements in different hematological matrices in patients with type 2 diabetes as compared to healthy controls. *Biol Trace Elem Res* 2001; 79: 205-219.
- Ruiz C, Alegria A, Barbera R, Farre R, Lagarda J. Selenium, zinc and copper in plasma of patients with type 1 diabetes mellitus in different metabolic control states. *J Trace Elem Med Biol* 1998; 12: 91-95.
- Zargar AH, Shah NA, Masoodi SR, Laway BA, Dar FA, Khan AR, et al. Copper, zinc, and magnesium levels in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Postgrad Med J* 1998; 74: 665-668.
- Okamoto K, Fuwa K. Low contamination digestion bomb method using teflon double vessel for biological materials. *Anal Chem* 1984; 56: 1750-1760.
- Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 1991; 40: 405-412.
- Majchrzak A, Zozulinska D, Wierusz-Wysocka B. Evaluation of selected components in antioxidant systems of blood in patients with diabetes. *Pol Merkuriusz Lek* 2001; 10: 150-152.
- Penckofer S, Schwertz D, Florczak K. Oxidative stress and cardiovascular disease in type 2 diabetes: the role of antioxidants and prooxidants. *J Cardiovascular Nurs* 2002; 16: 68-85.
- Vergaray L, Robles Y, Flores E, Suárez S. Correlación entre los niveles de hemoglobina glicada y las enzimas antioxidantes, en pacientes con diabetes mellitus tipo 2. *Rev Perú Ciencias de Inv* 2000; 3: 49-56.
- Gugliucci A. Glycation as the glucose link to diabetic complications. *J Am Osteopath Assoc* 2000; 100: 621-634.
- Bhatia S, Shukla R, Venkata S, Kaur J, Madhava K. Antioxidant status, lipid peroxidation and nitric oxide end products in patients of type 2 diabetes mellitus with nephropathy. *Clin Biochem* 2003; 36: 557-562.
- Mamposo M, Licea M, León O, Escobar M, Contreras E, Bustillo M. Especies reactivas de oxígeno en el paciente diabético no insulino-dependiente con retinopatía diabética. *Rev Cubana Endocrinol* 1999; 10: 182-190.
- Sindhu R, Koo J, Roberts C, Vaziri N. Dysregulation of hepatic superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in diabetes: response to insulin and antioxidant therapies. *Clin Exp Hypertens* 2004; 26: 43-53.
- Carmeli E, Coleman R, Berner Y. Activities of antioxidant scavenger enzymes (superoxide dismutase and glutathione peroxidase) in erythrocytes in adult women with and without type II diabetes. *Exp Diabetes Res* 2004; 5: 171-175.
- Ceriello A, Morocutti A, Mercuri F, Quagliari L, Moro M, Damante G, et al. Defective intracellular antioxidant enzyme production in type diabetic patients with nephropathy. *Diabetes* 2000; 49: 2170-2177.
- Kimura F, Hasegawa G, Obayashi H, Adachi T, Hara H, Otha M, et al. Serum extracellular superoxide dismutase in patients with type 2 diabetes: relationship to the development of micro and macrovascular complications. *Diabetes care* 2003; 26: 1246-1250.
- Fukai T, Folz R, Landmesser U, Harrison D. Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease. *Cardiovasc Rev* 2002; 55: 239-249.
- Ciechanowski K, Kedzierska K, Golembiewska E, Safranow K, Bober J, Domanski L, et al. Impaired synthesis is not the reason for decreased activity of extracellular superoxide dismutase in patients with diabetes. *Arch Med Res* 2005; 36: 148-153.
- Chen MD, Lin WH, Lin PY, Wang JJ, Tsou CT. Investigation on the relationships among blood zinc, copper, insulin and thyroid hormones in non-insulin dependent diabetes mellitus and obesity. *Chung Hua I Hsueh Tsa Chih ( Taipei )* 1991; 48: 431-438.
- Favier A, Ruffieux D. Physiological variations of serum levels of copper, zinc, iron and manganese. *Biomed Pharmacother* 1983; 37: 462-466.
- Walter JR RM, Uriu-hare JY, Olin KL, Oster MH, Anawalt BD, Critchfield JW, et al. Copper, zinc, manganese, and magnesium status and complications of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1991; 14: 1050-1056.
- Eaton JW, Qian M. Interactions of copper with glycated proteins: possible involvement in the etiology of diabetic neuropathy. *Mol Cell Biochem* 2002; 234-235:135-142.
- Isbir T, Tamer A, Taylor A, Isbir M. Zinc, copper and magnesium status in insulin dependent diabetes. *Diabetes Res* 1994; 26: 41-45.
- Nsonwu A, Usoro C, Etuko M, Usoro N. Glycemic control and serum and urine levels of zinc and magnesium in diabetics in Calar Nigeria. *Pak J Nut* 2006; 5: 75-78.
- Honnorat J, Accominotti M, Broussolle C, Fleuret A, Vallon J, Orgiazzi J. Effects of diabetes type and treatment on zinc status in diabetes mellitus. *Biol Trace Elem Res* 1992; 32: 311-316.
- El-Yazigi A, Hannan N, Raines D. Effect of diabetic state and related disorders on the urinary excretion of magnesium and zinc in patients. *Diabetes Res* 1993; 22: 67-75.
- Chausmer AB. Zinc, Insulin and Diabetes. *Journal of the American College of Nutrition* 1998; 17: 109-115.
- Ekin S, Mert N, Gunduz H, Meral I. Serum sialic acid levels and selected mineral status in patients with type 2 diabetes mellitus. *Biol Trace Elem Res* 2003; 94: 193-201.
- Rukgauer M, Neugebauer RJ, Plecko T. The relation between selenium, zinc and copper concentration and the trace element dependent antioxidative status. *J Trace Elem Med Biol* 2001; 15: 73-78.
- Vinceti M, Bergomi M, Nacci G, Pietrini V, Ferrari A, Fortini K, et al. Erythrocyte zinc, copper, and copper/zinc superoxide dismutase and risk of sporadic amyotrophic lateral sclerosis: a population-based case-control study. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 2002; 3: 208-214.
- Tungtrongchitr R, Pongpaew P, Phonrat B, Tungtrongchitr A, Viroonudomphol D, Vudhivai N, et al. Serum copper, zinc, ceruloplasmin and superoxide dismutase in Thai overweight and obese. *J Med Assoc Thai* 2003; 86: 543-551.
- Agte VV, Nagmote RV, Tarwadi KV. Comparative in vitro uptake of zinc by erythrocytes of normal vs Type 2 diabetic individuals and the associated factors. *Diabetes Nutr Metab* 2004; 17: 343-349.