

AGRADECIMIENTOS

Al Profesor José Luis Paternain Suberviola, por haber aceptado la dirección de esta tesis doctoral y haber ofrecido los recursos técnicos del laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Medicina de Reus para que se pudiese llevar a cabo.

A la Dra Cristina Gutiérrez Fornés, de la Unitat de Recerca del Hospital Joan XXIII, por el asesoramiento estadístico, su valiosísima colaboración científica, y muy especialmente, por su constante ánimo e inagotable paciencia.

A la Dra. Olga Navarro Roldán y al Dr. Francesc Pujol Inglés, del servicio de Medicina Interna del Hospital de Sant Pau i Santa Tecla de Tarragona, y al Dr. Joan Vendrell Ortega, de la sección de Endocrinología del Hospital de Tarragona Joan XXIII, por su interés y amabilidad en la recogida de las muestras y los datos clínicos de los pacientes.

A las Dras. Núria Serrat Orús y _ngels Vilanova Navarro, por su colaboración y asesoramiento en el desarrollo de técnicas analíticas.

A todo el personal del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de Reus, integrantes del grupo IMET, y en especial a la Dra. Neus García y al Dr. Jaume Folch, por su colaboración y ayuda en la puesta a punto y realización del RIA.

Al personal del Banco de Sangre del Hospital de Tarragona Joan XXIII, por las facilidades prestadas en la obtención de muestras.

Al Servicio de Espectroscopia de la Universidad de Barcelona, por las facilidades prestadas para la determinación de zinc y cobre.

A mis compa_eros del Servicio de Análisis Clínicos del Hospital de Sant Pau i Santa Tecla de

Tarragona, Dres. Modest Sabaté Pi_ol, Joan Batista Castellví y Xavier Clivillé Guasch, por su ánimo y comprensión durante el desarrollo de este estudio.

Ibergekumene tsores iz gut tsu dertseylin
(Es un placer relatar las dificultades pasadas)
Proverbio yiddish

A mi hija Marta

BIBLIOGRAFÍA

Abdel-Mageed AB, Oehme FW (1990). A review of the biochemical roles, toxicity and interactions of zinc, copper and iron: I. Zinc. *Vet Hum Tox*; 32:34-39.

Abdel-Mageed AB, Oehme FW (1990). A Review of the Biochemical Roles, Toxicity and Interactions of Zinc, Copper and Iron: II. Copper. *Vet Hum Tox*; 32:230-34.

Aguilar MV, Laborda JM, Martínez-Para MC, González MJ, Meseguer I, Bernao A, Mateos CJ (1998). Effect of diabetes on the tissular Zn/Cu ratio. *J Trace Elem Med Biol*; 12:155-158.

Ahmad Wahid M, Abdul Hamid Fathi S, Aboul-Khair MR (1988). Zinc in human health and disease. *Ric Clin Lab*; 18:9-16.

American Diabetes Association (ADA). Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus (1997). *Diabetes Care*; 20:1183-1197.

Armstrong AM, Chesnutt JE, Gormley MJ, Young IS (1996). The effect of dietary treatment on lipid peroxidation and antioxidant status in newly diagnosed noninsulin dependent diabetes.

Free Radic Biol Med; 21:719-726.

BIBLIOGRAFÍA

Baer M, King J (1984). Tissue zinc levels and zinc excretion during experimental zinc depletion in young men. *Am J Clin Nutr*; 39:556-570.

Bales CW, Freeland-Graves JH, Askey S, Behmardi F, Pobocik RS, Fickel JJ, Greenle P (1990). Zinc, magnesium, copper, and protein concentrations in human saliva: age- and sex-related differences. *Am J Clin Nutr*; 51:462-469.

Baynes JW, Thorpe SR (1999). Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes*; 48:1-9.

Beaudeau JL, Guillausseau PJ, Peynet J, Flourie F, Assayag M, Tielmans D, Warnet A, Rousselet F (1995). Enhanced susceptibility of low-density lipoprotein to in vitro oxidation in type 1 and type 2 diabetic patients. *Clin Chim Acta*; 239:131-141.

Béguin Y, Brasseur F, Weber G, Bury J, Delbrouck JM, Roelandts I, Robaye G, Fillet G (1987). Observations of serum trace elements in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*; 60:1842-1846.

Belch JJ, Chopra M, Hutchison S, Lorimer R, Sturrock RD, Forbes CD, Smith WE (1989). Free radical pathology in chronic arterial disease. *Free Radic Biol Med*; 6:375-378.

BIBLIOGRAFÍA

Bell GI (1991). Molecular defects in Diabetes Mellitus. *Diabetes*; 40:413-422.

Beltramini M, Lerch K (1983). Spectroscopic studies on neurospora copper metallothionein. *Biochemistry*; 22:2043-2048.

Binz PA, Kägi JHR (1999). Metallothionein: Molecular evolution and classification. En: *Metallothionein IV*, C.Klaassen (ed.), Birkhäuser Verlag, Basilea, Suiza, pp. 7-13.

Bleiler RA, Schedle HP (1962). Creatinine excretion: variability and relationships to diet and body size. *J Lab Clin Med*; 59:945-955.

Blostein-Fujii A, DiSilvestro RA, Frid D, Katz C, Malarkey W (1997). Short-term zinc supplementation in women with non-insulin-dependent diabetes mellitus: effects on plasma 5'-nucleotidase activities, insulin-like growth factor I concentrations, and lipoprotein oxidation rates in vitro. *Am J Clin Nutr*; 66:639-642.

Bremner I, Hoekstra WG, Davies NT, Young BW (1978). Effect of zinc status of rats on the synthesis and degradation of copper induced metallothionein. *Biochem J*; 174:883-892.

BIBLIOGRAFÍA

Bremner I, Morrison JN (1986). Assessment of zinc, copper and cadmium in animals by assay of extracellular metallothionein. *Acta Pharmacol Toxicol*; 59:502-509.

Bremner I (1987). Interactions between metallothionein and trace elements. *Prog Food Nutr Sci*; 11:1-37.

Bremner I, Beattie JH (1990). Metallothionein and the trace minerals. *Ann Rev Nutr*; 10:63-83.

Bronner F, Yost J (1985). Saturable and nonsaturable copper and calcium transport in mouse duodenum. *Am J Physiol*; 249:G108-G117.

Buhler RHO, Kägi HR (1974). Human hepatic metallothioneins. *FEBS Lett*; 39:229-234.

Bunker V, Hinks L, Lawson M, Clayton B (1984). Assessment of zinc and copper status of healthy people using metabolic balance studies and measurements of leukocytes concentrations. *Am J Clin Nutr*; 40:1096-1102.

Caballero AJ (1992). Zinc: *Quim Clin*; 71:15-21.

BIBLIOGRAFÍA

Car N, Car A, Granic M, Skrabalo Z, Momcilovic B (1992). Zinc and Copper in the Serum of Diabetic Patients. *Biol Trace Elem Res*; 32:325-329.

Ceriello A, Bortolotti N, Motz E, Crescentini A, Lizzio S, Russo A, Tonutti L, Taboga C (1998). Meal-generated oxidative stress in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*; 21:1529-1533.

Chausmer AB (1998). Zinc, Insulin and Diabetes. *J Am Coll Nutr*; 2:109-115.

Chen MD, Lin PY, Tsou CT, Wang JJ, Lin WH (1995). Selected Metals Status in Patients with Noninsulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Biol Trace Elem Res*; 50:119-124.

Chen H, Carlson EC, Pellet L, Moritz JT, Epstein PN (2001). Overexpression of metallothionein in pancreatic beta-cells reduces streptozotocin-induced DNA damage and diabetes. *Diabetes*; 50:2040-2046.

Cherian MG, Chan HM. Biological functions of Metallothionein - a review. En: *Metallothionein III*. Ed: Suzuki KT, Imura N, Kimura M. Birkhäuser Verlag, Basilea, Suiza, 1993.

Clegg MS, Ferrell F, Keen CL (1987). Hypertension-induced alterations in copper and zinc

BIBLIOGRAFÍA

metabolism in Dahl rats. *Hypertension*; 9:624-628.

Cohen D, Illowsky B, Linder M (1975). Altered copper absorption in humour-bearing and estrogen-treated rats. *Am J Physiol*; 236:E309-315.

Collier A, Wilson R, Bradley H, Thomson JA, Small M (1990). Free radical activity in type 2 diabetes. *Diabet Med*; 7:27-30.

Cousins RJ (1985). Absorption, Transport, and Hepatic Metabolism of Copper and Zinc: Special Reference to Metallothionein and Ceruloplasmin. *Phys Rev*; 2:238-309.

Craft NE, Failla ML (1983). Zinc, iron, and copper absorption in the streptozotocin-diabetic rat. *Am J Physiol*; 244 (Endocrinol. Metab. 7): E122-E128.

Cunnane S, Horrobin D (1985). Contrasting effects of low or high copper intake on rat tissue lipid essential fatty acid composition. *Ann Nutr Metab*; 29:103-110.

Cunningham J, Leffell M, Mearkle P, Harmatz P (1995). Elevated plasma ceruloplasmin in insulin-dependent diabetes mellitus: evidence for increased oxidative stress as a variable complication. *Metabolism*; 44:996-999.

BIBLIOGRAFÍA

Daimon M, Susa S, Yamatani K, Manaka H, Hama K, Kimura M, Ohnuma H, Kato T (1998). Hyperglycemia is a factor for an increase in serum ceruloplasmin in type 2 diabetes. *Diabetes Care*; 21:1525-1528.

Dimitriadis E, Griffin M, Owens D, Johnson A, Collins P, Tomkin GH (1995). Oxidation of low-density lipoprotein in NIDDM: its relationship to fatty acid composition. *Diabetologia*; 38:1300-1306.

DiSilvestro RA, Cousins RJ (1984). Translational regulation of rat liver metallothionein levels by glucagon (abstr.). *Federation Proc*; 43:3310.

DiSilvestro RA, Cousins RJ (1984). Mediation of endotoxin-induced changes in zinc metabolism in rats. *Am J Physiol* 247 (Endocrinol. Metab. 10): E436-E441.

D'Ocon C, Alonso de Armiño, V, Frasquet I (1987). Niveles séricos de Zn y Cu en una población diabética. *Rev Esp Fisiol*; 43:335-338.

Domínguez C, Ruiz E, Gussinye M, Carrascosa A (1999). Oxidative stress at onset and in early stages of type 1 diabetes in children and adolescents. *Diabetes Care*; 21:1736-1742.

BIBLIOGRAFÍA

Dunn MA, Blalock TL, Cousins RJ (1987). Metallothionein. *Proc Soc Exp Biol Med*; 185:107-119.

Durnam DM, Palmiter R (1981). Transcriptional regulation of the mouse metallothionein-I gene by heavy metals. *J Biol Chem*; 256:6712-6716.

El-Yazigi A, Hannan N, Raines DA (1991). Urinary excretion of chromium, copper, and manganese in Diabetes Mellitus and associated disorders. *Diabetes Res*; 18:129-134.

El-Yazigi A, Hannan N, Raines DA (1993). Effect of diabetic state and related disorders on the urinary excretion of magnesium and zinc in patients. *Diabetes Res*; 22:67-75.

Escobar O, Sandoval M, Vargas A, Hempe JM (1995). Role of metallothionein and cysteine-rich intestinal protein in the regulation of zinc absorption by diabetic rats. *Pediatr Res*; 37:321-327.

Evering WE, Haywood S, Bremner I, Wood AM, Trafford J (1991). The protective role of metallothionein in copper-overload: II. Transport and excretion of immunoreactive MT-1 in blood, bile and urine of copper-loaded rats. *Chem Biol Interact*; 78:297-305.

BIBLIOGRAFÍA

Failla ML, Cousins RJ (1978). Zinc accumulation and metabolism in primary cultures of rat liver cells: regulation by glucocorticoids. *Biochim Biophys Acta*; 543:293-304.

Failla ML, Kiser RA (1981). Altered tissue content and cytosol distribution of trace metals in experimental diabetes. *J Nutr*; 111:1900-1909.

Failla ML, Kiser RA (1983). Hepatic and renal metabolism of copper and zinc in the diabetic rat. *Am J Physiol*; 244(Endocrinol. Metab. 7):E115-E121.

Failla ML, Gardell C (1985). Influence of Spontaneous Diabetes on Tissue Status of Zinc, Copper, and Manganese in the BB Wistar Rat. *Proc Soc Exp Biol Med*; 180:317-322.

Fajans SS (1990). Scope and heterogeneous nature of maturity-onset diabetes of the young (MODY). *Diabetes Care*; 13:49-64.

Fajans SS. Diabetes Mellitus: Definition, Classification, Tests. pp.1411-1422. En: *Endocrinology*, Ed: DeGroot LJ. W.B. Saunders Company, Filadelfia, 1995.

Feldman SL, Cousins RJ (1976). Degradation of hepatic zinc-thionein following parenteral zinc administration. *Biochem J*; 160:583-588.

BIBLIOGRAFÍA

Fernández-Real JM, Gutiérrez C, Ricart W, Casamitjana R, Fernández-Castañer M, Vendrell J, Richart C, Soler J (1997). The TNF- α gene *Nco* I polymorphism influences the relationship among insulin resistance, percent body fat, and increased serum leptin levels. *Diabetes*; 46:1468-1472.

Fischer PWF, Collins MW (1981). Relationship between serum zinc and copper and risk factors associated with cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr*; 34:595-597.

Folch J, Colomina MT, Sánchez D, Paternain JL. Development and optimization of a radioimmunoassay for metallothionein. En: Anastassopoulou J, Collery P, Etienne JC, Theophanides T (eds) *Metal Ions in Biology and Medicine*. John Libbey Eurotext, París, 1992, Vol.2, pp 139-140.

Folch J, Ortega A, Cabré M, Paternain JL (1998). Urinary levels of Metallothioneins and metals in subjects from a semiindustrialized area in Tarragona province of Spain. *Biol Trace Elem Res*; 63:113-121.

Fonseca VA, Stone A, Munshi M, Baliga BS, Aljada A, Thusu K, Fink L, Dandona P (1997). Oxidative stress in diabetic macrovascular disease: does homocysteine play a role?

BIBLIOGRAFÍA

Southern Med J; 90:903-906.

Giroux EL (1975). Determination of zinc distribution between albumin and α_2 -macroglobulin in human serum. *Biochem Med*; 12:258-266.

Goberna R, Mateo J. Diagnóstico y seguimiento en el laboratorio de la Diabetes Mellitus, pp.257-275. En: *Bioquímica Clínica*. Ed.: F.González Sastre. Editorial Barcanova. Barcelona, 1994.

Goldstein IM, Kaplan HB, Edelson HS, Weissman G (1979). Ceruloplasmin: a scavenger of superoxide anion radicals. *J Biol Chem*; 254:4040-4045.

Gollan JL, Deller DJ (1973). Studies on the nature and excretion of biliary copper in man. *Clin Sci*; 44:9-15.

Greger JL, Snedeker SM (1980). Effect of dietary protein and phosphorus levels on the utilization of zinc, copper and manganese by adult males. *J Nutr*; 110:2243-2253.

Grider A, Bailey LB, Cousins RJ (1990). Erythrocyte metallothionein as an index of zinc status in humans. *Proc Natl Acad Sci USA*; 87:1259-1262.

BIBLIOGRAFÍA

Griffin ME, McInerney D, Fraser A, Johnson AH, Collins PB, Owens D, Tomkin GH (1997). Autoantibodies to oxidized low density lipoprotein: the relationship to low density lipoprotein fatty acid composition in diabetes. *Diabet Med*; 14:741-747.

Hambidge K, Krebs N, Jacobs M, Favier A, Guyette L, Ikle D (1983). Zinc nutritional status during pregnancy: a longitudinal study. *Am J Clin Nutr*; 37:429-442.

Heise CC, King JC, Costa FM, Kitzmiller JL (1988). Hyperzincuria in IDDM women. Relationship to measures of glycemic control, renal function, and tissue catabolism. *Diabetes Care*; 11:780-786.

Hidalgo J, Campmany L, Borrás M, Garvey JS, Armario A (1988). Metallothionein response to stress in rats: role in free radical scavenging. *Am J Physiol*; 255 (*Endocrinol. Metab. 18*):E518-E524.

Hidalgo J, Borrás M, Garvey JS, Armario A (1990). Liver, brain, and heart metallothionein induction by stress. *J Neurochem*; 55:651-654.

Honnorat J, Accominotti M, Broussolle C, Fleuret AC, Vallon JJ, Orgiazzi J (1992). Effects

BIBLIOGRAFÍA

of Diabetes Type and Treatment on Zinc Status in Diabetes Mellitus. *Biol Trace Elem Res*; 32:311-316.

Hotamisligil GS, Spiegelman BM (1994). Tumor necrosis factor α : a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes*; 43:1271-1278.

Huang YL, Sheu JY, Lin TH (1999). Association between oxidative stress and changes of trace elements in patients with breast cancer. *Clin Biochem*; 32:131-136.

Hur T, Squibb K, Cosma G, Horowitz S, Piedboeuf B, Bowser D, Gordon T (1999). Induction of metallothionein and heme oxygenase in rats after inhalation of endotoxin. *J Toxicol Environ Health*; 56:183-203.

Ihara Y, Toyokuni S, Uchida K, Odaka H, Tanaka T, Ikeda H, Hiai H, Seino Y, Yamada Y (1999). Hyperglycemia causes oxidative stress in pancreatic beta-cells of GK rats, a model of type 2 diabetes. *Diabetes*; 48:927-932.

Iskra M, Majewski W (1999). Oxidase activity of ceruloplasmin and concentrations of copper and zinc in serum in chronic arterial occlusion of the lower limbs. *J Trace Elem Med Biol*; 13:76-81.

BIBLIOGRAFÍA

Iyengar V, Woittiez J (1988). Trace elements in human clinical specimens: evaluation of literature data to identify reference values. *Clin Chem*; 34:474-481.

Jamison MH, Sharma H, Case RM, Braganza JM (1981). Pancreatic secretions assist bile in limiting copper absorption in the rat. *Gut*; A866-A867.

Jayadeep A, Raveendran Pillai K, Kannan S, Nalinakumari KR, Mathew B, Krishnan Nair M, Menon VP (1997). Serum levels of copper, zinc, iron and ceruloplasmin in oral leukoplakia and squamous cell carcinoma. *J Exp Clin Canc Res*; 16:295-300.

Jones AF, Winkles JW, Jennings PE, Florkowski CM, Lunec J, Barnett AH (1988). Serum antioxidant activity in diabetes mellitus. *Diabetes Res*; 7:89-92.

Kägi JH, Vallee BL (1960). Metallothionein: a cadmium- and zinc-containing protein from equine renal cortex. *J Biol Chem*; 235:3460-3465.

Kägi JHR, Schäffer A (1988). Biochemistry of Metallothionein. *Biochemistry*; 27:8509-8515.

BIBLIOGRAFÍA

Kakkar R, Mantha SV, Radhi J, Prasad K, Kalra J (1998). Increased oxidative stress in rat liver and pancreas during progression of streptozotocin-induced diabetes. *Clin Sci*; 94:623-632.

King JC (1990). Assessment of zinc status. *J Nutr*; 120:1474-1479.

Kinlaw WB, Levine AS, Morley JE, Silvis SE, McClain CJ (1983). Abnormal zinc metabolism in type II diabetes mellitus. *Am J Med*; 75:273-277.

Kobbah AM, Hellsing K, Tuvemo T (1988). Early changes of some serum proteins and metals in diabetic children. *Acta Paediatr Scand*; 77:734-740.

Lau A, Failla M (1984). Urinary excretion of zinc, copper and iron in the streptozotocin-diabetic rat. *J Nutr*; 114:1224-1233.

Lazo JS, Kuo SM, Woo ES, Pitt BR (1998). The protein thiol metallothionein as an antioxidant and protectant against antineoplastic drugs. *Chem-Biol Interact*; 111-112:255-262.

Leake DS (1997). Does an acidic pH explain why low density lipoprotein is oxidised in

BIBLIOGRAFÍA

atherosclerotic lesions? *Atherosclerosis*; 129:149-157.

Lebovitz HE (1999). Type 2 Diabetes: An Overview. *Clin Chem*; 45:1339-1345.

Lee HH, Prasad AS, Brewer GJ, Owyang C (1989). Zinc absorption in human small intestine. *Am J Physiol*; 19:G87-G91.

Leibrandt ME, Koropatnick J, Harris JF, Cherian MG (1991). Radioimmunoassay of metallothionein in rabbit, rat, mouse, chinese hamster and human cells. *Biol Trace Elem Res*; 30:245-255.

Leinonen J, Rantalaiho V, Lehtimaki T, Koivula T, Wirta O, Pasternack A, Alho H (1998). The association between the total antioxidant potential of plasma and the presence of coronary heart disease and renal dysfunction in patients with NIDDM. *Free Radical Res*; 29:273-281.

Leonhardt W, Hanefeld M, Muller G, Hora C, Meissner D, Lattke P, Paetzold A, Jaross W, Schroeder HE (1996). Impact of concentrations of glycated hemoglobin, alpha-tocopherol, copper, and manganese on oxidation of low-density lipoproteins in patients with type I diabetes, type II diabetes and control subjects. *Clin Chim Acta*; 254(2):173-186.

Levine AS, McClain CJ, Handwerger BS, Brown DM, Morley JE (1983). Tissue zinc status

BIBLIOGRAFÍA

of genetically diabetic and streptozotocin-induced diabetic mice. *Am J Clin Nutr*; 37:382-386.

Li TY, Kramer AJ, Shaw III CF, Petering DH (1980). Ligand substitution reactions of metallothionein with EDTA and apo-carbonic anhydrase. *Proc Natl Acad Sci USA*; 77:6334-6338.

Liu J, Liu Y, Hartley D, Klaassen CD, Shelin-Johnson SE, Lucas A, Cohen SD (1999). Metallothionein-I/II knockout mice are sensitive to acetaminophen-induced hepatotoxicity. *J Pharmacol Exp Ther*; 289:580-586.

McMillan DE (1989). Increased levels of acute-phase serum proteins in diabetes. *Metabolism*; 38:1042-1046.

Mac Rury SM, Gordon D, Wilson R, Bradley H, Gemmell CG, Paterson JR, Rumley AG, Mac Cuish AC (1993). A comparison of different methods of assessing free radical activity in type 2 diabetes and peripheral vascular disease. *Diabet Med*; 10:331-335.

Martín Mateo MC, Bustamante J, Fernández B. de Quiros J, Ortiz Manchado O (1975). A study of zinc: its metalloenzymes in diabetes mellitus. *Biomedicine*; 23:134-136.

BIBLIOGRAFÍA

Martín Mateo MC, Bustamante J, González MA (1978). Serum zinc, copper and insulin in diabetes mellitus. *Biomedicine*; 29:56-58.

Martínez-Vea A, Serrat N, Paternain JL, García C, García N, Oliver JA (1996). Zinc and metallothionein metabolism in nephrotic syndrome. *Trace Elem Electroly*; 13:14-17.

Mehra RK, Bremner I (1984). Metallothionein as an indicator of zinc and copper status in man. *Essential and Toxic Trace Elements*; 56:145-152.

Melinkeri RR, Sontakke AN, Kulkarni AM (1990). Serum zinc and zinc containing enzymes in diabetes mellitus. *Indian J Med Sci*; 44(7):173-177.

Menard P, McCormick CC, Cousins RJ (1981). Regulation of intestinal metallothionein biosynthesis in rats by dietary zinc. *J Nutr*; 111:1353-1361.

Mezzetti A, Pierdomenico SD, Costantini F, Romano F, De Cesare D, Cuccurullo F, Imbastaro T, Riario-Sforza G, Di Giacomo F, Zuliani G, Fellin R (1998). Copper/zinc ratio and systemic oxidant load: effect of aging and aging-related degenerative diseases. *Free Radic Biol Med*; 25:676-681.

BIBLIOGRAFÍA

Milne DB (1994). Trace Elements, pp.1317-1339. En: *Tietz textbook of Clinical Chemistry*. Ed.: Carl A. Burtis y Edward R. Ashwood. W.B. Saunders Company. Filadelfia, 1994.

Minami T, Tohno S, Tohno Y, Otaki N, Kimura M, Cherian MG (1999). Plasma MT levels in diabetic and renal failure patients. En: *Metallothionein IV*, C.Klaassen (ed.), Birkhäuser Verlag, Basilea, Suiza.

Mooradian AD, Morley JE (1987). Micronutrient status in diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr*; 45:877-895.

Mooradian AD, Failla M, Hoogwerf B, Maryniuk M, Wylie-Rosett J (1994). Selected Vitamins and Minerals in Diabetes. *Diabetes Care*; 5:464-479.

Mullins JE, Fuentealba IC (1998). Immunohistochemical detection of metallothionein in liver, duodenum and kidney after dietary copper-overload in rats. *Histol Histopathol*; 13:627-633.

Murphy P, Wadiwala I, Sharland DE, Rai GS (1985). Copper and zinc levels in "healthy" and "sick" elderly. *J Am Geriatr Soc*; 33:847-849.

BIBLIOGRAFÍA

National Diabetes Data Group (1979). Classification diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes*; 28:1039-57.

Nielson KB, Winge DR (1983). Order of metal binding in metallothionein. *J Biol Chem*; 258:13063-13069.

Niewoehner CB, Allen JI, Boosalis M, Levine AS, Morley JE (1986). Role of zinc supplementation in type II diabetes mellitus. *Am J Med*; 81:63-68.

Nobels F, Rillaerts E, D'Hollander M, Van Gaal L, De Leeuw I (1986). Plasma zinc levels in Diabetes Mellitus: relation to plasma albumin and amino acids. *Biomed Pharmacother*; 40:57-60.

Noto R, Alicata R, Sfogliano L, Neri S, Bifarella M (1983). A study of cupremia in a group of elderly diabetics. *Acta Diabetol Lat*; 20:81-85.

Oestreicher P, Cousins RJ (1985). Copper and zinc absorption in the rat: mechanism of mutual antagonism. *J Nutr*; 115:159-166.

Olivares M, Uauy R. Copper as an essential nutrient (1996). *Am J Clin Nutr*; 63:791S-

BIBLIOGRAFÍA

796S.

Otvos JD, Armitage IM (1980). Structure of the metal clusters in rabbit liver metallothionein. *Proc Natl Acad Sci USA*; 77:7094-7098.

Parisi AF, Vallee BL (1970). Isolation of a zinc α_2 -macroglobulin from human serum. *Biochemistry*; 9:2421-2426.

Patel S, Lott JA. Electroforesis de proteínas séricas, p.1547-54. En: *Clinical Chemistry, Theory, Analysis and Correlation*. Kaplan LA, Pesce AJ, Ed. Mosby Company. St Louis, 1984.

Piscator M (1964). On cadmium in normal human kidneys together with a report on the isolation of metallothionein from livers of cadmium-exposed rabbits. *Nord Hyg Tidskr*; 45:76-82.

Prasad A, Oberleas D (1970). Binding of zinc to amino acids and serum proteins in vitro. *J Lab Clin Med*; 76:416-425.

Prasad A, Oberleas D (1974). Thymidine kinase activity and incorporation of thymidine into

BIBLIOGRAFÍA

DNA in the zinc-deficient tissue. *J Lab Clin Med*; 83:634-639.

Prasad A (1979). Clinical, biochemical and pharmacological role of zinc. *Ann Rev Pharm Tox*; 20:393-426.

Quarterman J, Morrison E (1981). The effects of short periods of fasting on the absorption of heavy metals. *Br J Nutr*; 46:277-287.

Quételet L.A.J. *Physique Sociale*, vol 2, Bruselas, C.Muquardt, 92. 1869.

Rauscher AM, Fairweather-Tait SJ, Wilson PD, Gorrick S, Greenwood R (1997). Zinc metabolism in non-insulin dependent diabetes mellitus. *J Trace Elem Med Biol*; 11:65-70.

Raz I, Adler JH, Havivi E (1988). Altered tissue content of trace metals in diabetic hyperinsulinaemic sand rats (*Psammomys Obesus*). *Diabetologia*; 31:329-333.

Raz I, Havivi E (1989). Trace elements in blood cells of diabetic subjects. *Diabetes Res*; 10:21-24.

Raz I, Karsai D, Katz M (1989). The influence of zinc supplementation on glucose homeostasis in NIDDM. *Diabetes Res*; 11:73-79.

BIBLIOGRAFÍA

Richards MP, Cousins RJ (1976^a). Metallothionein and its relationship to the metabolism of dietary zinc in rats. *J Nutr*; 106:1591-1599.

Richards MP, Cousins RJ (1976^b). Zinc-binding protein: relationship to short term changes in zinc metabolism. *Proc Soc Exp Biol Med*; 153:52-56.

Ripa S, Ripa R (1995). Zinc and diabetes mellitus. *Minerva Med*; 86(10):415-421.

Ruiz C, Alegría A, Barberá R, Farré R, Lagarda MJ (1999). Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in patients with type 1 diabetes mellitus. *Scand J Clin Lab Inv*; 59:99-105.

Saito S, Okabe M, Yoshida K, Kurasaki M (1999). The effect of heavy metal-induced metallothionein on Zn, Cu and Cd accumulation in rat kidney. *Pharmacol Toxicol*; 84:255-260.

Santini SA, Marra G, Giardina B, Cotroneo P, Mordente A, Martorana GE, Manto A, Ghirlanda G (1997). Defective plasma antioxidant defenses and enhanced susceptibility to lipid peroxidation in uncomplicated IDDM. *Diabetes*; 46:1853-1858.

BIBLIOGRAFÍA

Sato M, Nagai Y, Bremner I (1989). Urinary excretion of metallothionein-I and its degradation product in rats treated with cadmium, copper, zinc or mercury. *Toxicology*; 56:23-33.

Sato M, Bremner I (1993). Oxygen free radicals and Metallothionein. *Free Radic Biol Med*; 14:325-337.

Sattar N, Scott HR, McMillan DC, Talwar D, O'Reilly DS, Fell GS (1997). Acute-phase reactants and plasma trace element concentrations in non-small cell lung cancer patients and controls. *Nutr Cancer*; 28: 308-312.

Schlienger JL, Grunenberger F, Maier EA, Simon C, Chabrier G, Leroy MJF (1988). Perturbation des oligoéléments plasmatiques dans le diabète. Relation avec l'équilibre glycémique. *Presse Méd*; 17:1076-1079.

Schosinsky KH, Lehmann HP, Beeler MF (1974). Measurement of Ceruloplasmin from its oxidase activity in serum by use of o-dianisine dihydrochloride. *Clin Chem*; 20:2.

Scott BJ, Bradwell AR (1983). Identification of the serum binding for proteins for iron, zinc,

BIBLIOGRAFÍA

cadmium, nickel, and calcium. *Clin Chem*; 29:629-633.

Shern-Brewer R, Santanam N, Wetzstein C, White-Welkley J, Parthasarathy S (1998). Exercise and cardiovascular disease: a new perspective. *Arterioscl Throm Vas*; 18:1181-1187.

Shvets NV, Kramarenko LD, Vydyborets SV, Gaidukova SN (1994). Disordered trace element content of the erythrocytes in diabetes mellitus. *Lik Sprava*;52-5.

Silverman ML, Christenson RH. Amino Acids and Proteins, p.709-713. En: *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. Ed: Burtis CA, Ashwood ER. WB Saunders Company, Filadelfia, PA 19105. 1994.

Simpkins CO (2000). Metallothionein in human disease. *Cell mol Biol*; 46:465-488.

Sjögren A, Floren CH, Nilsson A (1988). Magnesium, potassium and zinc deficiency in subjects with type II diabetes mellitus. *Acta Med Scand*; 224:461-466.

Sobocinski PZ, Canterbury Jr WJ (1982). Hepatic metallothionein induction in inflammation. *Ann NY Acad Sci*; 210:354-367.

BIBLIOGRAFÍA

Solomons NW, Janghorbani M, Ting B, Steinke F, Christensen M, Bijlani R, Istfan N, Young V (1982). Bioavailability of zinc from a diet based on isolated soy protein: Application in young men of the stable isotope tracer ^{70}Zn . *J Nutr*; 112:1809-1821.

Solomons NW, Cousins RJ. Zinc. En: *Absorption and Malabsorption of Mineral Nutrients*. Ed: Solomons NW, Rosenberg IH. Nueva York: Liss, 1984; 125-197.

Speich M (1990). Le cuivre dans la grossesse normale, diabétique et en périnatalogie. *Rev Fr Gynecol Obstet*; 85:34-9.

Sprietsma JE, Schuitemaker GE (1994). Diabetes can be prevented by reducing insulin production. *Med Hypotheses*; 42:15-23.

Sullivan VK, Burnett FR, Cousins RJ (1998). Metallothionein expression is increased in monocytes and erythrocytes of young men during zinc supplementation. *J Nutr*; 128:707-713.

Suzuki KT, Maitani T (1981). Metal-dependent properties of metallothionein. *Biochem J*; 199:289-295.

BIBLIOGRAFÍA

Taneja SK, Mahajan M, Gupta S, Singh KP (1998). Assessment of copper and zinc status in hair and urine of young women descendants of NIDDM parents. *Biol Trace Elem Res*; 62:255-264.

Terres-Martos C, Navarro-Alarcón M, Martín-Lagos F, López-G de la Serrana H, Pérez-Valero V, López-Martínez MC (1998). Serum zinc and copper concentrations and Cu/Zn ratios in patients with hepatopathies or diabetes. *J Trace Elem Med Biol*; 12:44-49.

Trinder P (1969). Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann Clin Biochem*; 6:24.

Udom AO, Brady FO (1980). Reactivation in vitro of zinc-requiring apo-enzymes by rat liver zinc-thionein. *Biochem J*; 187:329-335.

Underwood EJ. 3.Copper. En: *Trace Elements in Human and Animal Nutrition*. Academic Press, Nueva York, 1977, p.56-108.

Underwood EJ. Zinc. En: *Trace Elements in Human and Animal Nutrition*. Academic Press, Nueva York, 1977, p.196-242.

Vallee BL, Maret W. The functional potential and potential functions of metallothioneins: a

BIBLIOGRAFÍA

personal perspective. En: *Metallothionein III*. Ed: Suzuki KT, Imura N, Kimura M. Birkhäuser Verlag, Basilea, Suiza, 1993.

Van Campen DR, Mitchell EA (1965). Absorption of Cu^{64} , Zn^{65} , Mo^{99} , and Fe^{59} from ligated segments of the rat gastrointestinal tract. *J Nutr*; 86:120-124.

Van Campen D (1966). Effects of zinc, cadmium, silver and mercury on absorption and distribution of copper-64 in rats. *J Nutr*; 88:125.

Van Campen D, Scaife P (1967). Zinc interference with copper absorption in the rat. *J Nutr*; 91:473.

Van Campen D, Gross E (1968). Influence of ascorbic acid on the absorption of copper by rats. *J Nutr*; 95:617-622.

Van Campen DR, House WA (1974). Effect of a low protein diet on retention of an oral dose of ^{65}Zn and on tissue concentrations of zinc, iron, and copper in rats. *J Nutr*; 104:84-90.

Vander Mallie RJ, Garvey JS (1979). Radioimmunoassay of metallothioneins. *J Biol Chem*; 254:8416-8421.

BIBLIOGRAFÍA

Victory W, Smith JM, Vander AJ (1981). Renal tubular handling of zinc in the dog. *Am J Physiol*; 241(5):F532-F539.

Vilanova A, Gutiérrez C, Serrat N, Raga X, Paternain JL (1997). Metallothionein, Zinc and Copper levels: Relationship with acute myocardial infarction. *Clin Biochem*; 30:235-238.

Vucic M, Gavella M, Bozиков V, Ashcroft SJ, Rocic B (1997). Superoxide dismutase activity in lymphocytes and polymorphonuclear cells of diabetic patients. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*; 35:517-521.

Walter RM, Uriu-Hare JY, Olin KL, Oster MH, Anawalt BD, Critchfield JW, Keen CL (1991). Copper, zinc, manganese, and magnesium status and complications of diabetes mellitus. *Diabetes Care*; 14:1050-1056.

Watanabe T, Iwami O, Nakatsuka H, Iguchi H, Ikeda M (1991). Correlation of cadmium, copper, manganese, and zinc levels in the urine of people in nonpolluted areas. *J Toxicol Environ Health*; 33:263-272.

Williams RJP. Zinc: what is its role in biology? *Endeavour, New Series, Volume 8, No.2*,

BIBLIOGRAFÍA

1984.

Williams NR, Rajput-Williams J, West JA, Nigdikar SV, Foote JW, Howard AN (1995). Plasma, Granulocyte and Mononuclear Cell Copper and Zinc in Patients with Diabetes Mellitus. *Analyst*; 120:887-890.

Yamazaki M, Ito S, Usami A, Tani N, Hanyu O, Nakagawa O, Nakamura H, Shibata A (1995). Urinary excretion rate of ceruloplasmin in non-insulin-dependent diabetic patients with different stages of nephropathy. *Eur J Endocrinol*; 132:681-687.

Yang J, Cherian MG (1994). Protective effects of metallothionein on streptozotocin-induced diabetes rats. *Life-Sci*; 55:43-51.

Zargar AH, Shah NA, Massodi SR, Laway BA, Dar FA, Khan AR, Sofi FA, Wani AI (1998). Copper, zinc, and magnesium levels in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Postgrad Med J*; 74:665-668.

Zbronska H, Grzeszczak W, Jendryczko A, Zbronski R, Kuzniewicz R (1995). Activity of superoxide dismutase in erythrocytes and leukocytes and levels of zinc and copper in blood of patients with diabetes. Effect of diabetic treatment on examined parameters. *Pol Arch Med*

BIBLIOGRAFÍA

Wewn; 94:228-234.

Zoli A, Altomonte L, Caricchio R, Galossi A, Mirone L, Ruffini MP, Magaro M (1998).

Serum zinc and copper in active rheumatoid arthritis: correlation with interleukin 1 beta and tumour necrosis factor alpha. *Clin Rheumatol*; 17:378-382.

CONCLUSIONES

1. LA POBLACIÓN AFECTA DE DIABETES MELLITUS TIPO 2 PRESENTA UNOS NIVELES MÁS ELEVADOS DE ZINC, COBRE Y CERULOPLASMINA QUE LA POBLACIÓN SANA.
2. EL CONTROL METABÓLICO DE LOS PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2 PUEDE PARTICIPAR EN LA PATOGÉNESIS DE LOS ELEVADOS NIVELES DE COBRE OBSERVADOS.
3. LOS NIVELES DE METALOTIONEÍNA SON MÁS ELEVADOS EN LOS PACIENTES CON DIABETES MELLITUS TIPO 2.
4. LA METALOTIONEÍNA ERITROCITARIA SE MOSTRÓ ÚTIL COMO MARCADOR DEL STATUS ORGÁNICO DEL COBRE EN LA POBLACIÓN CONTROL.
5. EL ANÁLISIS DE LA METALOTIONEÍNA EN LA DIABETES MELLITUS TIPO 2 NO PARECE SER SUPERIOR, EN EL ESTUDIO DEL STATUS ORGÁNICO DE ZINC Y COBRE, A LA DETERMINACIÓN DIRECTA DE DICHOS ELEMENTOS TRAZA.

DISCUSIÓN

5.1. ZINC

5.1.1. SUERO

Tanto en el grupo Control como en el grupo DM 2 no se observaron diferencias significativas en los valores de la zinquemia entre hombres y mujeres [984,16 ± 168,97 vs 982,24 ± 179,17 ng/mL para el grupo Control y 940,00 (125,00) vs 935,00 (122,50) ng/mL para el grupo DM 2](Tablas X y XII). Sin embargo, algunos autores han observado en hombres con DM 2 valores de zinquemia superiores a los de las mujeres con DM 2 posiblemente debido a la mayor concentración de albúmina que habitualmente presentan los primeros (*Nobels et al., 1986*).

Cuando se compararon los valores de las concentraciones de Zn en suero del grupo Control con los del grupo DM 2 no se halló diferencia significativa entre los dos grupos. Además, puede observarse que aunque los valores de la concentración de Zn en suero del grupo DM 2 presentaron cierta tendencia a ser inferiores a los del grupo Control [937,50 (125,00) vs 980,00 (111,87) ng/mL], esta diferencia no llegó a alcanzar significancia estadística (Tablas XIII, XIV y XV).

Cuando se estudió la influencia del tiempo de evolución de la enfermedad sobre los niveles en suero de Zn en los pacientes con DM 2 no se obtuvo correlación significativa entre ambos parámetros (Tabla XXV). En este sentido, otros autores coinciden en esta ausencia de correlación (*Zargar et al., 1998*).

DISCUSIÓN

Aunque la mayoría de los estudios referentes al status del Zn sérico en la DM 2 hacen referencia a hipozinquemia asociada a hiperzincuria, existe cierta controversia al respecto, habiéndose descrito normozinquemia (*Honnorat et al., 1992; Zargar et al., 1998*), hipozinquemia (*Schlienger et al., 1988; Raz et al., 1989; Melinkeri et al., 1990; Walter et al., 1991; Car et al., 1992; Williams et al., 1995; Rauscher et al., 1997; Chausmer, 1998; Terres et al., 1998*) e hiperzinquemia (*Martín et al., 1975; D'Ocon et al., 1987*). Las diferencias halladas en estos estudios podrían ser causadas parcialmente por los métodos de toma de muestras, predisposición étnica, hábitos dietéticos, control de la glucemia o existencia de complicaciones clínicas.

La presencia de valores normales de Zn en suero junto con un aumento de la excreción urinaria de Zn puede ser debida a un aumento de la absorción intestinal de Zn en los individuos diabéticos (*Schlienger et al., 1988*) y a una disminución de la excreción intestinal de Zn junto con un aumento del catabolismo tisular (*Heise et al., 1988*). En este sentido, se ha descrito en ratas con DM inducida químicamente con estreptozotocina un incremento de la absorción intestinal de Zn y Cu (*Failla y Kiser, 1983*). En otros experimentos similares realizados con ratas espontáneamente hiperglucémicas e hiperinsulinémicas el aumento de la absorción intestinal de Zn y Cu se correlacionó con la polifagia que presentan estos animales y además se observó en éstos un aumento de la masa de la mucosa intestinal, sugiriendo los autores que el aumento de la absorción intestinal de Zn y Cu sería debido a una alteración del transporte de metales a nivel de la SBC (*Craft y Failla, 1983*). Experimentos realizados

DISCUSIÓN

posteriormente por otros autores muestran un aumento de la absorción intestinal de Zn y Cu debido a un incremento en la concentración de MT en las células intestinales (*Escobar et al., 1995*).

Además, otros autores, a raíz de estudios realizados en ratas diabéticas, sugieren que la hiperglucemia *per se* es probablemente el principal factor determinante en el incremento de la absorción de metales traza y su almacenamiento tisular en el transcurso de esta enfermedad (*Raz et al., 1988*).

La hipozinquemia observada por algunos autores en la DM 2 es atribuida por éstos directamente al aumento de las pérdidas urinarias de Zn (*Sjögren et al., 1988; Walter et al., 1991; El-Yazigi et al., 1993; Williams et al., 1995*), o a una disminución de la absorción intestinal (*Kinlaw et al., 1983; Mooradian et al., 1994*). Sin embargo, otros autores que también describen hipozinquemia en la DM 2 atribuyen ésta a una disminución de los niveles de albúmina y aminoácidos en suero (*Nobels et al., 1986; Kobbah et al., 1988*). Otros autores describen valores de Zn en suero disminuidos únicamente en la DM 2 acompañada de complicaciones como nefropatía, neuropatía y macroangiopatía, atribuyendo esta disminución de la zinquemia a la pérdida de proteínas por la orina debido a la nefropatía y la consiguiente disminución de albúmina sérica (*Nobels et al., 1986*). Sin embargo, la falta de correlación observada por algunos autores entre el Zn sérico y la albúmina sugiere que la proteinuria no es la única explicación y que podría existir otro mecanismo adicional que favorecería las pérdidas urinarias de Zn (*Kinlaw et al., 1983*).

DISCUSIÓN

Otra explicación al descenso de los niveles de Zn en la DM 2 observado por algunos autores, radica en la existencia en esta enfermedad, al menos en su fase inicial, de un incremento de la secreción de insulina. Así, la secreción aumentada de insulina causaría depleción celular de Zn. Es decir, la célula podría producir más insulina pero no más Zn y, junto con la hiperzincuria, disminuiría la disponibilidad de Zn en el pool celular. Con la paulatina pérdida de Zn intracelular disminuiría la insulina secretada necesaria para un nivel dado de glucosa y, de esta manera, el islote deviene más vulnerable a cualquier tipo de daño. Esto se asociaría al cuadro clínico en el cual, después de una hiperglucemia prolongada y la incapacidad de las células del islote de producir suficiente insulina para controlar la glucosa, ocurre la pérdida del islote en su conjunto. Estos acontecimientos proporcionarían un mecanismo mediante el cual el déficit de Zn puede afectar el progreso de la DM 2 (*Sprietsma y Schuitemaker, 1994*). En este sentido, se ha observado que el uso terapéutico de insulina en la DM 2 incrementa la zinquemia sin que el Zn contenido en las preparaciones de insulina pueda ser responsable de ello, dado que éste es cuantitativamente irrelevante (20 µg/día) en relación al aporte alimentario (2 mg/día) (*Schlienger et al., 1988*).

Por otro lado, otros autores muestran, en estudios del metabolismo del Zn en individuos con DM 2 usando isótopos de Zn, una disminución de la concentración de Zn sérico y un incremento de la excreción urinaria de Zn. Sin embargo, estos mismos autores sugieren que, dado que no se observaron diferencias en el pool de Zn intercambiable, el metabolismo del Zn no está alterado en la DM 2 (*Rauscher et al., 1997*).

DISCUSIÓN

El Zn sérico no es el único pool de Zn que puede verse afectado en la DM 2. Se han descrito niveles disminuidos de Zn en músculo esquelético (*Sjögren et al., 1988*) y depleción celular ubicua de Zn (*Ripa y Ripa, 1995*). En este sentido, en diversos experimentos realizados en ratas genéticamente diabéticas y obesas se ha observado una disminución de la concentración de Zn en tejido óseo y plasma junto con hiperzincuria (*Levine et al., 1983*); valores normales de Zn en plasma, disminuidos en hígado, riñón y músculo, y ligeramente aumentados en tejido óseo (*Raz et al., 1988*), todo lo cual sugiere, según estos autores, que el déficit de Zn podría jugar un papel en la patogénesis de la resistencia a la insulina y también por otro lado pone en duda la idoneidad del plasma para el estudio del status de Zn (*Raz et al., 1988*).

Sin embargo, para otros autores, la disminución de los niveles de Zn en plasma ocurre sólo en una parte de los pacientes DM 2 y no está relacionada con el control de la enfermedad (*Niewoehner et al., 1986*). De todas formas, los menores niveles de zincemia observados en diversos estudios sobre pacientes DM 2 cabría definirlos a lo sumo, según algunos autores, como un déficit moderado de Zn (*Blostein-Fujii et al., 1997*).

Así pues, el verdadero status del Zn en la DM 2 quedaría por definir dado que la concentración sérica sólo constituye un reflejo imperfecto del contenido tisular que se interrelaciona en los sistemas enzimáticos. Es deseable un estudio del contenido total aproximado por su determinación en biopsias musculares o cabellos antes de considerar un eventual efecto beneficioso de suplementos de este elemento traza en la mejora de la

DISCUSIÓN

sensibilidad a la insulina en la DM 2 o sobre la asimilación periférica de glucosa (*Schlienger et al., 1988*).

En este sentido, hay autores que propugnan la poca idoneidad del suero o del plasma en la valoración del status de Zn en el organismo debido a que las concentraciones de Zn en el músculo esquelético y células sanguíneas no se correlacionan con la zinquemia, tanto en pacientes DM 2 como en controles sanos (*Raz et al., 1988; Sjögren et al., 1988*). De igual modo, las alteraciones experimentadas en el contenido de Zn del organismo no se reflejan en los niveles de Zn en suero y tampoco refleja las reducciones del contenido de Zn en la dieta, optando así algunos autores por la determinación de la MT eritrocitaria en lugar de la determinación de los valores de Zn en suero en la valoración del status de Zn del organismo (*Grider et al., 1990; King, 1990*). Otro de los motivos por los cuales algunos autores creen poco idóneo el suero para la valoración del status de Zn en el organismo son las variaciones diarias observadas en la concentración de Zn sérico y, con ello, la necesidad de estandarización del espacio de tiempo comprendido entre la última ingesta y la toma de muestra, puesto que la concentración de Zn en suero puede disminuir entre un 15% y un 20% después de las comidas. Además, la concentración de Zn en suero es también sensible a otros cambios metabólicos, por ejemplo, estrés, infección, alimentación, ayuno y status hormonal (*King, 1990*).

En otro orden de cosas, y por lo que respecta a la administración de suplementos de Zn a estos pacientes, algunos autores han apuntado la posibilidad de tratar con dichos

DISCUSIÓN

suplementos a los que presenten hipozinquemia. Sin embargo, este tipo de tratamiento no ha mostrado ningún efecto sobre los valores de HbA_{1c} (Niewoehner *et al.*, 1986), puede incluso ser contraproducente y agravar la intolerancia a la glucosa (Raz *et al.*, 1989) y, en definitiva, no ha demostrado tener una eficacia clínica real (Chausmer, 1998). Otros autores, sin embargo, han observado una elevación de los niveles de Zn sérico y de actividad de la 5'-nucleotidasa, una enzima zinc-dependiente, tras la administración de suplementos de Zn en mujeres con DM 2 postmenopáusicas (Blostein-Fujii *et al.*, 1997).

En el presente trabajo, la ausencia de diferencia significativa en los valores de la concentración de Zn en suero entre el grupo Control y el grupo DM 2, cuando la mayoría de la literatura existente hace referencia a una hipozinquemia en la DM 2, podría ser debida a las características propias del grupo de individuos con DM 2 seleccionado. Los pacientes seleccionados para este estudio, tal como se indica en el capítulo de Material y Métodos, presentaban un tiempo de evolución de su enfermedad inferior a 10 años, la edad estaba comprendida entre 35 y 65 años, estaban en tratamiento exclusivo con dieta, sin aceptarse los pacientes en tratamiento con insulina o hipoglucemiantes orales y no presentaban las complicaciones típicas de la enfermedad. En este sentido, los resultados de los valores de Zn en suero en los pacientes DM 2 del presente estudio se corresponden con los resultados de los autores que describen valores normales de Zn en suero en este tipo de población (Honnorat, 1992; Zargar *et al.*, 1998) o únicamente valores por debajo de lo normal en aquellos pacientes DM 2 con complicaciones tales como nefropatía, neuropatía y

DISCUSIÓN

macroangiopatía (*Nobels et al., 1986*).

Por último, hay que subrayar que, según algunos autores, una moderada reducción de Zn en plasma y suero no es necesariamente indicativa de una disminución del status de Zn. Las diferencias halladas entre diversos estudios en la valoración de parámetros similares pueden parecer contradictorias probablemente debido a que no se tomaron en cuenta todas las posibles influencias fisiológicas. Además, es importante tener en cuenta que un cambio en el nivel de Zn (o cualquier otro metal traza) necesita ser correlacionado con una alteración bioquímica y, más importante aún, con funciones fisiológicas para demostrar que el status del metal alterado refleja déficit o exceso (*Walter et al., 1991; Mooradian et al., 1994*).

5.1.2. HEMATÍES

En el grupo de individuos Control los hombres presentaron una concentración significativamente más alta de Zn eritrocitario que las mujeres [12,52 (1,24) vs 11,81 (0,85) $\mu\text{g/g Hb}$, $p < 0,05$] (Tabla X). Esta diferencia intersexo no fue observada entre hombres y mujeres pertenecientes al grupo DM 2 (13,25 \pm 1,97 vs 13,22 \pm 1,51 $\mu\text{g/g Hb}$, $p = \text{NS}$) (Tabla XII).

Cuando se compararon los valores de la concentración eritrocitaria de Zn entre el grupo Control y el grupo DM 2 se observó que los sujetos pertenecientes a este último grupo presentaban unos valores significativamente más altos que los sujetos pertenecientes al grupo

DISCUSIÓN

Control [12,00 (1,28) vs 13,23 ± 1,70 µg/g Hb, p<0,001] (Tabla XIII).

En el organismo, la mayor parte del Zn y Cu se encuentran tanto en el compartimiento intracelular como asociado al tejido óseo. Una pequeña parte se halla en el plasma unido a proteínas. Es, por lo tanto, y según algunos autores, improbable que la concentración sérica de estos elementos traza refleje con exactitud el contenido total corporal. El músculo esquelético es probablemente el tejido más apropiado para el estudio de los elementos traza. Obviamente, este tejido no es fácilmente accesible y, por lo tanto, debería usarse otro. Sin embargo, las células sanguíneas (leucocitos o hematíes) son una buena alternativa (*Raz y Havivi, 1989*) debido a su fácil obtención. A la hora de optar por hematíes o leucocitos, se podría pensar que los leucocitos presentan alguna ventaja sobre los hematíes porque quizá son más representativos del resto de los tejidos dado que poseen núcleo y mitocondrias. Sin embargo, el contenido de elementos traza en los leucocitos mononucleares es diferente del de los leucocitos polimorfonucleares y, en consecuencia, la valoración del contenido de elementos traza debería hacerse separadamente en cada grupo de células (*Raz y Havivi, 1989*). Debido a esto último, en el presente trabajo se optó finalmente por estudiar el contenido de metales traza de los hematíes.

Existen pocos datos en relación a los valores de la concentración de Zn en hematíes de pacientes con DM 2, habiéndose descrito una disminución de éstos respecto a la población general (*Raz y Havivi, 1989; Shvets et al., 1994*). Según estos últimos autores, los valores disminuidos de Zn eritrocitario observados en pacientes con DM 2 tendieron a aumentar al

DISCUSIÓN

instaurarse el tratamiento convencional (*Shvets et al., 1994*). Asimismo, también se han descrito valores disminuidos de Zn en linfocitos, granulocitos y plaquetas (*Walter et al., 1991*). Sin embargo, existen otros estudios donde no se observa diferencia significativa entre los valores de Zn en hematíes de pacientes DM 2 y controles (*Raz et al., 1988*).

En el presente trabajo, la existencia en el grupo Control de valores más altos de Zn eritrocitario en hombres podría interpretarse como el reflejo de la tendencia de estos últimos a presentar concentraciones ligeramente más altas de Zn en suero aunque, y tal como se menciona más arriba, dicha tendencia no alcanzó significación estadística. En este sentido, y tal como se ha mencionado anteriormente, algunos autores sugieren que los hombres podrían presentar valores séricos más altos de Zn que las mujeres debido a la mayor concentración de albúmina que presentan éstos (*Nobels et al., 1986*).

Asimismo, la presencia en el presente trabajo de concentraciones eritrocitarias de Zn más altas en los sujetos del grupo DM 2 podría interpretarse como una adaptación compensatoria del organismo frente a situaciones que pueden ocurrir en la DM 2 y que aumentan la oferta de Zn como son el aumento de la absorción intestinal de Zn (*Schlienger et al., 1988*), la disminución de la excreción intestinal de Zn y el aumento del catabolismo tisular (*Heise et al., 1988*).

A estos últimos factores, y tal como también podrá verse más adelante, podría añadirse el papel de la MT. En el presente trabajo se observaron unos valores aumentados de MT en suero, orina y hematíes en los pacientes DM 2. La presencia en los sujetos DM 2 de

DISCUSIÓN

valores más altos de MT eritrocitaria podría contribuir, a su vez, a la presencia de valores más altos de Zn eritrocitario en los individuos del mencionado grupo DM 2. Este aumento de la concentración de Zn eritrocitario permitiría al organismo afrontar el incremento de la actividad de varias enzimas que requieren Zn (Tabla II) dentro de la lucha contra la disminución del status antioxidante observado en estos pacientes.

Apoyando la teoría de la disminución del status antioxidante observado en la DM 2, algunos autores describen que la disminución de la actividad de la SOD eritrocitaria se correlaciona estrechamente con los niveles de Zn y Cu en hematíes (*Zbronska et al., 1995*).

De todas formas, y tal como figura más adelante, algunos autores sugieren que la concentración de MT en hematíes podría ser uno de los índices más sensibles y específicos en la valoración del status de Zn del organismo (*Bremner y Morrison, 1986; Grider et al., 1990; Martínez-Vea et al., 1996; Sullivan et al., 1998*).

5.1.3. ORINA

Tanto en el grupo Control como en el grupo DM 2 no se observaron diferencias significativas entre hombres y mujeres en los valores de la excreción urinaria de Zn [450,00 (480,00) vs 380,00 (160,00) $\mu\text{g/g}$ creatinina para el grupo Control y 2280,00 \pm 1440,00 vs 2333,00 (900,00) $\mu\text{g/g}$ creatinina para el grupo DM 2] (Tablas X y XII).

En el grupo Control se observó una correlación positiva entre las excreciones urinarias

DISCUSIÓN

de Zn y de MT ($r=0,66$; $p<0,001$) (Tabla XVI y Fig.5). Una correlación positiva entre las excreciones urinarias de Zn y MT también ha sido descrita por otros autores en un estudio efectuado con voluntarios sanos (*Folch et al., 1998*). Sin embargo, en el grupo de pacientes con DM 2 del presente estudio aunque también se observó un incremento de la excreción urinaria de MT y de Zn, no se halló correlación positiva entre la excreción urinaria de estos dos parámetros. En este sentido, en un estudio realizado con pacientes con síndrome nefrótico, una excreción urinaria incrementada de MT favorecería una excreción urinaria alta de Zn en estos individuos (*Martínez-Vea et al., 1996*).

En el grupo de pacientes con DM 2 se observó una correlación positiva, tanto en hombres como en mujeres, entre la excreción urinaria de Zn y la cupremia ($r=0,67$; $p<0,001$; Tabla XIX). En el mismo grupo se observó también una correlación positiva ($r=0,25$; $p<0,05$; Tabla XIX) entre las excreciones urinarias de Zn y Cu incluso ajustando por otras variables en el estudio de regresión múltiple ($r=0,66$; $p<0,05$; Tabla XXIV). En el presente trabajo, esta correlación entre el Zn y el Cu en orina únicamente se observó en aquellos pacientes con DM 2 y no en el grupo Control. Sin embargo, algunos autores describen también una correlación positiva entre las excreciones urinarias de Zn y Cu en individuos sanos (*Watanabe et al., 1991*; *Folch et al., 1998*).

Cuando se compararon los valores de la excreción urinaria de Zn del grupo Control con los del grupo DM 2 se observó que los sujetos pertenecientes a este último presentaban unos niveles significativamente más altos de excreción de Zn en orina que los sujetos

DISCUSIÓN

pertenecientes al grupo Control [2310,00 (830,00) vs 430,00 (190,00) $\mu\text{g/g}$ creatinina, $p<0,001$] (Tabla XIII).

En este sentido, aunque se ha descrito tanto hiperzinquemia, normozinquemia e hipozinquemia en los pacientes diabéticos, todos los autores coinciden en presentar hiperzincuria (*Kinlaw et al., 1983; Heise et al., 1988; Raz et al., 1989; Walter et al., 1991; Honnorat et al., 1992; Chen et al., 1995; Rauscher et al., 1997; Chausmer, 1998*). Además, según otros autores, la hiperzincuria observada en pacientes diabéticos es especialmente pronunciada en mujeres (*Martín et al., 1975*). En el presente trabajo no se observó esta última característica, aunque sí una ligera tendencia de las mujeres a presentar valores más elevados, sin llegar a valores de significancia estadística (Tabla XII).

Se han descrito varias explicaciones posibles para la hiperzincuria con mantenimiento de la zinquemia normal en este tipo de pacientes. Además, y tal como se ha mencionado anteriormente, una eventual terapia con insulina sería insuficiente para explicar este fenómeno (*Schlienger et al., 1988*). Algunos experimentos en animales han mostrado un incremento de la absorción intestinal de Zn y Cu en ratas diabéticas, un aumento de la concentración de Zn y Cu en algunos tejidos y un incremento de la excreción urinaria de Zn y Cu (*Craft y Failla, 1983; Failla y Kiser, 1983; Failla y Gardell, 1985; Raz et al., 1988; Escobar et al., 1995*). Otros mecanismos, como la disminución de la excreción intestinal de Zn y el incremento del catabolismo tisular (*Heise et al., 1988*), pueden apoyar la ausencia de la depleción de Zn en la DM. Según algunos autores, la hiperglucemia *per se* podría producir

DISCUSIÓN

hiperzincuria (*Kinlaw et al., 1983; Mooradian y Morley, 1987*).

En experimentos con animales se ha observado que la hiperglucemia induce una disminución de la reabsorción tubular de Zn (*Victory et al., 1981*) y la hiperglucemia experimentalmente inducida provoca hiperzincuria (*Kinlaw et al., 1983*). Algunos autores apoyan la hipótesis que la hiperglucemia y la consiguiente carga de glucosa presentada al riñón es la responsable de la hiperzincuria observada en pacientes diabéticos (*El-Yazigi et al., 1993*).

Otros autores, sin embargo, sugieren que la hiperzincuria es un factor que contribuye a la hipozinquemia observada por algunos autores en pacientes diabéticos (*Walter et al., 1991*).

Según algunos autores, la hiperzincuria podría verse compensada con un incremento de la absorción gastrointestinal de Zn lo cual justificaría una zinquemia normal como la descrita en el presente trabajo (*Schlienger et al., 1988; Chen et al., 1995; Chausmer, 1998*).

Finalmente, y según algunos autores, la determinación del nivel de MT en orina puede representar un buen índice en la valoración del status de Zn del organismo dada su correlación, en experimentos realizados con ratas, con la administración de Zn (*Bremner y Morrison, 1986*).

En el presente trabajo, la presencia de una excreción urinaria de Zn aumentada no estuvo asociada con una disminución de la concentración de Zn en suero o con cualquier signo conocido de alteración del status de Zn, coincidiendo en este aspecto con los trabajos descritos por otros autores (*Honnorat et al., 1992*). También, y tal como acaba de

DISCUSIÓN

mencionarse anteriormente, factores como el aumento de la absorción intestinal de Zn (*Craft y Failla, 1983; Schlienger et al., 1988; Chen et al., 1995; Chausmer, 1998*), disminución de la excreción intestinal de Zn y aumento del catabolismo tisular (*Heise et al., 1988*) y la hiperglucemia *per se* (*Kinlaw et al., 1983; Mooradian y Morley, 1987*) explicarían, según algunos autores (*Honorat et al., 1992*) el aumento de la excreción urinaria de Zn con ausencia de depleción corporal de este metal.

5.2. COBRE

5.2.1. SUERO

En el grupo de individuos Control las mujeres presentaron unos valores de cupremia significativamente más elevados que los hombres [803,00 (147,50) vs 965,26 ± 268,67 ng/mL, $p < 0,001$] (Tabla X). La presencia de una cupremia más alta en mujeres ya ha sido previamente descrita por diversos autores en la literatura (*Underwood, 1977; Iyengar y Woittiez, 1988; Bales et al., 1990*) y, según éstos, probablemente esta diferencia obedezca a un efecto estrogénico.

En el grupo DM 2, al igual que en el grupo Control, las mujeres presentaron unos valores más altos de cupremia que los hombres [1055,00 (157,50) vs 1156,56 ± 215,81 ng/mL; $p < 0,05$; Tabla X] incluso ajustando por otras variables en el estudio de regresión múltiple ($r = 0,52$; $p < 0,05$; Tabla XXII). Esta concentración más alta de Cu en suero en

DISCUSIÓN

mujeres con DM 2 también ha sido previamente descrita en la literatura (*Walter et al., 1991*) y posiblemente obesidad también a las mismas causas apuntadas en el grupo Control.

Cuando se compararon los valores de las concentraciones de Cu en suero del grupo Control con los del grupo DM 2 se observó que los sujetos pertenecientes a este último presentaban unas concentraciones significativamente más altas que los sujetos pertenecientes al grupo Control [$1124,71 \pm 223,81$ vs $877,00 (173,00)$ ng/mL, $p < 0,001$] (Tabla XIII).

En el grupo Control la cupremia se correlacionó de forma positiva con la CP ($r=0,21$; $p < 0,01$; Tabla XVI). Asimismo, la cupremia se correlacionó de forma positiva con la concentración de Cu eritrocitario ($r=0,68$; $p < 0,001$; Tabla XVI) y con la concentración de MT eritrocitaria ($r=0,30$; $p < 0,01$; Tabla XVI) incluso después de ajustar por otras variables de confusión en el estudio de regresión múltiple ($r=0,63$; $p < 0,001$; Fig.4) y ($r=0,28$; $p < 0,05$; Fig.5) respectivamente.

En el grupo DM 2 la cupremia se correlacionó de forma positiva con la glucemia ($r=0,28$; $p < 0,001$; Tabla XVII), los valores de la HbA_{1c} ($r=0,27$; $p < 0,001$; Tabla XVII) y la CP en suero ($r=0,25$; $p < 0,001$, Tabla XVII) incluso ajustando por otras variables de confusión en el estudio de regresión múltiple (Tabla XXII). Asimismo, la cupremia se correlacionó con la cupruria ($r=0,20$; $p < 0,05$; Tabla XVII) incluso después de ajustar por otras variables en el estudio de regresión múltiple (Tabla XXIV).

Cuando se estudió la influencia del tiempo de evolución de la enfermedad sobre los niveles de cupremia en los pacientes con DM 2 no se obtuvo correlación significativa entre

DISCUSIÓN

ambos parámetros (Tabla XXV). En este sentido, otros autores coinciden en esta ausencia de correlación (*Noto et al., 1983; Zargar et al., 1998*).

En la DM 2 se ha descrito tanto hipercupremia (*Martín et al., 1978; Noto et al., 1983; D'Ocon et al., 1987; Raz et al., 1989; Walter et al., 1991; Mooradian et al., 1994; Zargar et al., 1998*), normocupremia (*Williams et al., 1995; Leonhardt et al., 1996; Terres et al., 1998*) como hipocupremia (*Car et al., 1992*). Con el fin de intentar explicar estas diferencias en los distintos trabajos publicados, tanto en lo referente a las concentraciones de Cu como a las de Zn, se han apuntado diversas causas como la variabilidad en la metodología de toma de muestras, predisposición étnica, hábitos dietéticos, control de la glucemia o existencia de complicaciones clínicas (*Chen et al., 1995*).

En el presente trabajo, se ha podido observar que las mujeres con DM 2 presentaron unos niveles de Cu sérico más elevados, coincidiendo con algunos trabajos previos (*Walter et al., 1991*). Sin embargo, no todos los autores observan esta diferencia (*Terres et al., 1998*).

Por otro lado, y tal como se comentó en el apartado referente al Zn, estudios realizados en ratas diabéticas sugieren que la hiperglucemia es probablemente *per se* el principal factor determinante en la absorción de metales traza y su almacenamiento tisular (*Raz et al., 1988*). En este sentido, experimentos realizados en animales describen un incremento de la absorción intestinal de Cu en ratas con DM inducida por estreptozotocina (*Craft y Failla, 1983; Escobar et al., 1995*). Asimismo, otros autores, en experimentos realizados en ratas con DM inducida químicamente con estreptozotocina, describen un incremento de la

DISCUSIÓN

concentración de Cu, expresada en forma de cociente Zn/Cu, en el hígado y en el tejido adiposo (Aguilar *et al.*, 1998). Sin embargo, el modelo animal estudiado probablemente puede ser determinante en los resultados observados; así, en experimentos realizados en ratas genéticamente diabéticas obesas (Psammomys Obesus) no se observó ninguna modificación de los niveles de Cu tanto en suero como en músculo, riñón, hígado y fémur (Raz *et al.*, 1988).

La presencia de concentraciones elevadas de Cu en suero puede observarse en diferentes estados patológicos, además de la DM 2, como infecciones crónicas y agudas, anemias, enfermedad de Hodgkin, enfermedades del colágeno y hemocromatosis (Underwood, 1977), inflamación (Murphy *et al.*, 1985), leucemia linfocítica (Béguin *et al.*, 1987), aterosclerosis (Noto *et al.*, 1983; Belch *et al.*, 1989), hipertensión arterial (Clegg *et al.*, 1987), leucoplaquia oral y carcinoma de células escamosas (Jayadeep *et al.*, 1997), cáncer de pulmón (Sattar *et al.*, 1997), infarto agudo de miocardio (Vilanova *et al.*, 1997), artritis reumatoidea (Zoli *et al.*, 1998), cáncer de mama (Huang *et al.*, 1999) y oclusión arterial crónica de las extremidades inferiores (Iskra y Majewski, 1999). Según algunos de estos autores, este incremento de los valores de la cupremia en las enfermedades mencionadas probablemente obedece a una respuesta de fase aguda (Zoli *et al.*, 1998; Iskra y Majewski, 1999) y a un incremento del estrés oxidativo (Huang *et al.*, 1999).

Una de las hipótesis más consistentes para explicar el incremento de los valores de cupremia observados en la población DM 2 obedece a una mayor absorción intestinal de Cu

DISCUSIÓN

(*Craft y Failla, 1983*), el cual, a nivel hepático estimula al promotor del gen de la MT y probablemente también al de la CP (Fig.3). Este incremento del Cu circulante aumentaría la síntesis de metaloenzimas en los pacientes DM 2 (*Cousins, 1985*).

Por otra parte, se han observado niveles elevados de Cu en suero en pacientes afectados de arteriosclerosis, tanto diabéticos como no diabéticos (*Noto et al., 1983; Mooradian y Morley, 1987*). Además, se ha observado también que entre los pacientes diabéticos, los que presentaban los niveles más altos de Cu sérico eran aquellos de más edad y los que presentaban macroangiopatía y microangiopatía, hipercolesterolemia o hipertensión (*Noto et al., 1983; Schlienger et al., 1988; Walter et al., 1991; Sjogren et al., 1988; Raz y Havivi, 1989; Mooradian et al., 1994; Chen et al., 1995*). En este sentido, el aumento del Cu sérico podría ser explicado en el contexto de la patogenia de la placa de ateroma, donde la hipercupremia estaría considerada como un factor de riesgo (*Fischer y Collins, 1981; Schlienger et al., 1988*). De manera inversa, los individuos diabéticos sin retinopatía, hipertensión o enfermedad macrovascular presentan concentraciones séricas de Cu intermedias entre los individuos sanos y los individuos diabéticos con presencia de estas complicaciones (*Walter et al., 1991*). En el presente trabajo no se pudo confirmar este aspecto dado que la muestra seleccionada no mostraba complicaciones crónicas micro o macroangiopáticas.

Por otro lado y tal como se ha descrito en la introducción del presente trabajo, el Cu

DISCUSIÓN

presenta propiedades pro-oxidantes y, en consecuencia, un desequilibrio en el metabolismo del Cu podría condicionar la aparición de un status de estrés oxidativo. En este sentido, se ha descrito que cuanto mayor es el cociente Cu/Zn en suero mayor es el contenido de peróxidos lipídicos, es decir, existe una relación entre el cociente Cu/Zn y la carga oxidante sistémica (*Mezzetti et al., 1998*). De este modo y según algunos autores, los individuos diabéticos presentan un riesgo incrementado de desarrollar enfermedad arterial coronaria en parte debido a que el Cu incrementa la oxidación, actuando como catalizador, de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) cuya resistencia contra la oxidación se halla disminuida debido al débil status antioxidante, contribuyendo así al desarrollo de aterogénesis y otras complicaciones de la DM 2 (*Armstrong et al., 1996; Leonhardt et al., 1996*). En pacientes con DM 2 (*Fonseca et al., 1997; Ceriello et al., 1998*) y DM 1 (*Santini et al., 1997; Ruiz et al., 1999*) así como en experimentos realizados en ratas con DM inducida mediante estreptozotocina (*Kakkar et al., 1998*), con el fin de evaluar el estrés oxidativo, se han descrito aumentos de los niveles de peróxidos lipídicos, evaluados mediante la medición de las TBARS. Además, según algunos autores, el pH ácido extracelular presente en la lesión aterosclerótica, y en especial entre el acúmulo de macrófagos de ésta, explicaría el motivo por el cual la lesión aterosclerótica es uno de los escasos lugares donde ocurre la oxidación de LDL (*Leake, 1997*). Este riesgo incrementado de aparición de complicaciones, en particular la enfermedad aterosclerótica que presentan los individuos diabéticos, podría ser debido al incremento de la formación de células espumosas como consecuencia del mencionado aumento de la susceptibilidad de las LDL a la

DISCUSIÓN

oxidación (*Beaudeau et al., 1995; Dimitriadis et al., 1995*). Además, en pacientes con DM 2 se han descrito niveles elevados de autoanticuerpos anti-LDL oxidada con la intervención del Cu, los cuales se hallan asociados a un mayor riesgo de enfermedad coronaria (*Griffin et al., 1997*). En este contexto, estudios realizados sobre la susceptibilidad a la oxidación de las LDL aisladas de plasma de individuos tanto DM 1 como DM 2 muestran aumentos de la susceptibilidad a la oxidación de las LDL de estos pacientes diabéticos con o sin complicaciones vasculares preexistentes (*Beaudeau et al., 1995*).

La presencia de un incremento en la peroxidación lipídica debido a un incremento del estrés oxidativo y a un aumento de la cupremia no es exclusiva de la DM 2. Este estado metabólico también se ha descrito en individuos afectados de otras enfermedades, como es en pacientes con neoplasia mamaria (*Huang et al., 1999*). Paradójicamente, el ejercicio, el cual impone un estrés oxidativo al organismo, es un importante protector de la enfermedad cardiovascular. En este sentido, algunos autores sugieren que las LDL de los individuos que realizan deporte de forma regular presentan una susceptibilidad reducida a la oxidación (*Shern-Brewer et al., 1998*).

Como ya se ha comentado anteriormente, en el presente estudio se observa un aumento de los niveles séricos de Cu en la población analizada con DM 2. A su vez, se constata un incremento de los niveles de MT y CP, lo cual permite especular sobre una posible activación a nivel hepático de la síntesis de MT y CP tal como han descrito algunos autores (*Cousins, 1985*). En el caso de la población con DM 2 parece ser que la capacidad

DISCUSIÓN

de absorción gastrointestinal de Cu se halla aumentada, lo cual induciría un aumento de la oferta de dicho metal para la síntesis de metaloenzimas (*Craft y Failla, 1983; Raz et al., 1988*). En este sentido, el aumento observado de la actividad de CP y la correlación positiva entre ésta y la concentración de Cu en suero en los individuos DM 2 jugaría un papel importante en la homeostasis del Cu en este tipo de pacientes, dado que una parte importante del pool de Cu circulante se halla unido a la CP.

Asimismo, en la población con DM 2 analizada, el aumento observado en la concentración de Cu en suero y su correlación positiva con la HbA_{1c} sugiere que la hiperglucemia podría jugar un papel en el metabolismo del Cu. Otros autores han descrito también un aumento de la concentración de Cu en suero junto con una correlación positiva entre la cupremia y la HbA_{1c} (*Schlienger et al., 1988*).

5.2.2. HEMATÍES

En el grupo Control se observó una concentración significativamente más alta de Cu eritrocitario en el subgrupo de mujeres con respecto al subgrupo de hombres [1,42 (0,57) vs 2,10 (0,60) µg/g Hb, p<0,001] (Tabla X). Esta diferencia intersexo no fue observada en los pacientes con DM 2 (3,56 ± 1,10 vs 3,62 ± 1,05 µg/g Hb, p=NS) (Tabla XII). Además, en el grupo Control se observó una correlación positiva entre el Cu eritrocitario y la cupremia (r=0,68; p<0,001; Tabla XVI) después de ajustar por otras variables en el estudio de

DISCUSIÓN

regresión múltiple ($r=0,63$; $p<0,001$; Fig.4).

En el grupo DM 2 el Cu eritrocitario se correlacionó de forma positiva con la glucemia ($r=0,63$; $p<0,001$; Tabla XIX) y la cupremia ($r=0,34$; $p<0,001$; Tabla XIX) incluso ajustando por otras variables en el estudio de regresión múltiple (Tabla XXIII), la HbA_{1c} ($r=0,39$; $p<0,001$; Tabla XIX), la excreción urinaria de Cu ($r=0,40$; $p<0,001$; Tabla XIX), y la MT eritrocitaria ($r=0,22$; $p<0,05$; Tabla XIX), y la CP ajustando por otras variables en el estudio de regresión múltiple ($r=0,66$; $p<0,05$; Tabla XXIII).

Cuando se comparon los valores de la concentración eritrocitaria de Cu entre el grupo Control y el grupo DM 2 se observó que los sujetos pertenecientes a este último grupo presentaban unos valores significativamente más altos que los individuos pertenecientes al grupo Control [$1,77$ ($0,62$) vs $3,59 \pm 1,06$ $\mu\text{g/g Hb}$, $p<0,001$] (Tabla XIII).

Existen pocos datos en la literatura en relación a los valores de la concentración de Cu en los hematíes de pacientes con DM 2. Además, estos resultados son algo contradictorios dado que algunos autores no han hallado diferencias significativas en los valores de Cu eritrocitario entre sujetos control y pacientes diabéticos (*Chen et al., 1995; Williams et al., 1995*) mientras que otros, sin embargo, han descrito valores más bajos de Cu eritrocitario en pacientes con DM 2 (*Shvets et al., 1994*).

Podría especularse que, en el presente trabajo, el hallazgo de unos valores más elevados de Cu eritrocitario en los individuos con DM 2 es un reflejo del probable acúmulo de Cu en diferentes órganos (hígado, riñón, músculo, hueso, etc.), tal como algunos autores han

DISCUSIÓN

observado en estudios realizados con ratas diabéticas (*Raz et al., 1988*). La presencia de Cu en el compartimiento eritrocitario parece estar regida por fenómenos fisiológicos, dado que, tanto en el grupo Control ($r=0,68$; $p<0,001$; Tabla XVI) como en el grupo DM 2 ($r=0,34$; $p<0,001$; Tabla XIX), existe una correlación significativa entre el Cu sérico y el Cu eritrocitario incluso ajustando por otras variables en el estudio de regresión múltiple (Fig.4 y Tabla XXIII).

Además, hay que añadir en la contribución al mayor contenido de Cu eritrocitario en estos pacientes el papel de la MT eritrocitaria. La presencia en los sujetos con DM 2 de valores más altos de MT eritrocitaria, además de correlacionarse positivamente con el Cu eritrocitario, podrían contribuir, a su vez, a la presencia de valores más altos de Cu eritrocitario en los individuos del mencionado grupo.

Por otro lado, dentro de la teoría de la disminución del status antioxidante observado en la DM 2, y tal como puede leerse anteriormente en el apartado referente al Zn eritrocitario, algunos autores han observado en este tipo de pacientes una disminución de la actividad de la SOD eritrocitaria correlacionada estrechamente con los niveles de Zn y Cu en hematíes (*Zbronska et al., 1995*).

5.2.3. ORINA

En el grupo Control se observó una cupruria significativamente más alta en el subgrupo

DISCUSIÓN

de mujeres [47,50 (13,12) vs 73,23 ± 31,27 µg/g creatinina, p<0,05] (Tabla X). Valores de excreción urinaria de Cu superiores en mujeres sanas han sido igualmente descritos por otros autores (*Folch et al., 1998*), los cuales atribuyen esta diferencia a la influencia de las hormonas esteroideas.

En el presente trabajo, estas diferencias observadas entre la población sana desaparecen al analizar los valores de Cu en orina en la población con DM 2. En el grupo DM 2, esta ausencia de diferencias entre hombres y mujeres se produce a expensas de un mayor incremento relativo de la excreción urinaria de Cu por parte de los hombres (81,35 ± 30,79 vs 80,19 ± 27,41 µg/g creatinina, p=NS; Tabla XIII).

En el grupo DM 2 se observó que la excreción urinaria de Cu se correlacionó de forma positiva con la glucemia (r=0,36, p<0,001; Tabla XIX), la HbA_{1c} (r=0,60, p<0,001; Tabla XIX), la cupremia (r=0,20, p<0,05; Tabla XIX), la excreción urinaria de Zn (r=0,25, p<0,05; Tabla XIX) y la concentración de Cu en hematíes (r=0,40, p<0,001; Tabla XIX) incluso ajustando por otras variables en el estudio de regresión múltiple (Tabla XXIV).

Cuando se compararon los valores de la excreción urinaria de Cu entre los individuos del grupo Control y los individuos del grupo DM 2 se observó que aquellos pertenecientes a este último grupo presentaban unos niveles significativamente más altos de excreción urinaria de Cu [58,50 (25,00) vs 80,65 ± 28,64 µg/g creatinina, p<0,001] (Tabla XIII). Cabe destacar, sin embargo, que en el presente trabajo el incremento de las pérdidas de Cu por la orina no se correspondió con un descenso de los valores de Cu ni en suero ni en hematíes. El

DISCUSIÓN

aumento de la excreción urinaria de Cu en pacientes con DM 2 también ha sido descrito en la literatura por otros autores (*Taneja et al., 1998*).

En este sentido, algunos autores han descrito también un aumento de la excreción urinaria de Cu en ratas con DM experimental inducida con estreptozotocina. En este modelo animal, la administración de tratamiento con insulina a estas ratas diabéticas redujo significativamente las cantidades de Cu y otros micronutrientes, sugiriendo que la alteración del status hormonal era la causa primaria del incremento de estas pérdidas urinarias. Además, el incremento del Cu urinario no se asociaba a un descenso en el plasma de este metal (*Lau y Failla, 1984*).

Por otro lado, se ha podido observar que aquellos pacientes con DM 2 afectos además de neuropatía o de alguna enfermedad infecciosa son los que presentan cifras más elevadas de Cu en orina. Esto último podría estar relacionado con una alteración del metabolismo de las células nerviosas y del tejido conectivo cercano, dado que el Cu es esencial para algunas actividades enzimáticas (*El-Yazigi et al., 1991*).

En el presente trabajo, la correlación positiva observada entre los niveles de Cu en orina con los de Cu en suero en la población DM 2, asociado a unos niveles claramente más elevados de este metal tanto a nivel sérico como eritrocitario (Tabla XX), induce a pensar que la cupruria no es más que un reflejo de un incremento de la oferta de Cu al filtrado renal. Dado que se trata de un estudio puramente observacional no se pueden inferir otros mecanismos fisiopatológicos de los datos obtenidos.

DISCUSIÓN

A pesar de no disponer, en el presente trabajo, de los valores de la excreción urinaria de CP, no se puede descartar por completo que una excreción urinaria aumentada de esta proteína contribuya a incrementar la cupruria en esta población, tal como han descrito algunos autores (*Yamazaki et al., 1995*), especialmente si se tiene en cuenta que los niveles séricos de CP eran significativamente más altos en los pacientes con DM 2.

Además, la MT, cuya excreción urinaria está claramente incrementada en los pacientes con DM 2, podría desempeñar a este nivel un papel similar al de la CP en lo referente al Cu. En este sentido, algunos autores han sugerido que la MT podría actuar en la orina ligando Zn y Cu (*Watanabe et al., 1991*) mientras que otros han descrito un incremento de la excreción urinaria de MT en pacientes con DM 2 y DM 1 (*Minami et al., 1999*).

5.3. METALOTIONEÍNA

5.3.1. SUERO

Tanto en el grupo Control como en el grupo DM 2 no se observaron diferencias significativas en los valores de la concentración de MT en suero entre hombres y mujeres [43,60 (15,80) vs 36,90 (19,85) ng/mL, $p=NS$, para el grupo Control y 112,10 (56,00) vs 95,55 (39,30) ng/mL, $p=NS$, para el grupo DM 2] (Tablas X y XII).

En el grupo DM 2 se observó una correlación negativa entre la concentración de MT en suero y la excreción urinaria de MT ($r=-0,41$; $p<0,001$) (Tabla XIX, Fig.23) posiblemente

DISCUSIÓN

debido al incremento de la excreción urinaria de MT en los pacientes con DM 2.

Cuando se compararon los valores de las concentraciones de MT en suero del grupo Control con los del grupo DM 2 se observó que los sujetos pertenecientes a este último grupo presentaban unos valores significativamente más altos [37,20 (17,82) vs 98,65 (45,70) ng/mL, $p < 0,001$] (Tabla XIII).

Así, una de las funciones del aumento de la concentración sérica de MT, reflejo del aumento de la síntesis hepática de MT, sería la regulación del metabolismo del Zn y del Cu en respuesta al incremento de sus niveles, contribuyendo de ese modo a la detoxificación y ejerciendo así un papel citoprotector frente a estos metales (*Dunn et al., 1987*). En opinión de algunos autores, la determinación de MT en suero se ha convertido en uno de los indicadores más sensibles del status orgánico de Zn. Además, según éstos, la concentración de MT en suero se correlaciona estrechamente con la concentración de MT hepática, lo cual puede ser una estimación indirecta del valor de la MT tisular y de las reservas de Zn (*Bremner y Morrison, 1986; King, 1990*).

Por otro lado, tal como se cita en la introducción de este trabajo, diversas citoquinas, como el TNF- α , la IL-6 y el interferón, han mostrado ser inductoras de la síntesis de MT (*Cherian y Chan, 1993*). En este sentido, actualmente se considera a la DM 2 como un estado de activación crónica de citoquinas proinflamatorias (*Hotamisligil y Spiegelman, 1994; Fernández-Real et al., 1997*), las cuales podrían contribuir a mantener niveles elevados de MT en estos pacientes. No obstante, esta hipótesis precisaría ser abordada

DISCUSIÓN

mediante estudios dise_ados a tal efecto.

Algunos autores han propuesto que los cambios en la distribución de Zn y Cu, con el consiguiente incremento de la síntesis de MT, podría representar una adaptación del organismo frente a diversas agresiones y situaciones de estrés (*Failla y Kiser, 1981; Cousins, 1985*). Otros autores, dado el papel antioxidante atribuido a la MT, describen un incremento de la síntesis de ésta ante diversas situaciones que incrementan el estrés oxidativo (*Hidalgo et al., 1988; Hidalgo et al., 1990*). El estrés oxidativo puede ser un factor patogénico importante en el desarrollo de las complicaciones vasculares en la DM 2 (*Leinonen et al., 1998*) y se ha sugerido el papel protector de la MT como un *scavenger* para los radicales libres de oxígeno (*Yang y Cherian, 1994*). Además, diversos autores han relacionado la persistencia de hiperglucemia tanto en la DM 2 como en la DM 1 con un incremento de la producción de radicales libres (*Domínguez et al., 1999; Ihara, 1999*). En este sentido, el aumento observado en el presente trabajo en los niveles de MT de los pacientes con DM 2 podría traducir la existencia de un da_o tisular en el contexto de la DM 2, posiblemente debido en parte a este incremento de radicales libres descrito en esta población.

5.3.2. HEMATÍES

Tanto en el grupo Control como en el grupo DM 2 no se observaron diferencias

DISCUSIÓN

significativas en los valores de la concentración de MT en hematíes entre hombres y mujeres [45,20 (30,05) vs 66,30 (55,42) $\mu\text{g/g Hb}$, $p=\text{NS}$, para el grupo Control y 912,90 (277,50) vs 970,55 (357,42) $\mu\text{g/g Hb}$, $p=\text{NS}$, para el grupo DM 2] (Tablas X y XII).

En el grupo Control destaca una correlación positiva entre los valores de MT eritrocitaria y la concentración sérica de Cu ($r=0,30$; $p<0,01$; Tabla XVI) incluso ajustando por otras variables en el estudio de regresión múltiple ($r=0,28$; $p<0,05$; Fig.5).

En el grupo DM 2, el factor más determinante en la presencia de un incremento de la concentración de MT en hematíes es la hiperglucemia que presentan estos pacientes dado que, en este grupo, la MT eritrocitaria se correlacionó de forma positiva con la glucemia ($r=0,47$; $p<0,001$; Tabla XIX) incluso ajustando por otras variables en el estudio de regresión múltiple. Además, en el grupo DM 2 la MT eritrocitaria también se correlacionó de forma positiva con la HbA_{1c} ($r=0,21$; $p<0,05$; Tabla XIX), la cupremia ($r=0,23$; $p<0,05$; Tabla XIX) y la concentración de Cu en hematíes ($r=0,22$; $p<0,05$; Tabla XIX).

Cuando se compararon los valores de las concentraciones de MT eritrocitaria del grupo Control con las del grupo DM 2 se observó que los sujetos pertenecientes a este último grupo presentaban unas concentraciones significativamente más altas que los sujetos pertenecientes al grupo Control [965,30 (300,60) vs 48,70 (45,32) $\mu\text{g/g Hb}$, $p<0,001$] (Tabla XIII).

En el presente trabajo, tanto en el grupo Control como en el grupo de pacientes DM 2 la existencia de correlaciones positivas entre la MT eritrocitaria y la cupremia y entre la MT

DISCUSIÓN

eritrocitaria y el Cu eritrocitario (únicamente en DM 2) sugiere la existencia de una estrecha relación de la MT con el metabolismo del Cu.

Dado que la concentración de MT en los tejidos depende del status de Zn y Cu y también del estado fisiopatológico del individuo (*Bremner, 1987*), podían ser previsibles, y de hecho, así fue en este trabajo, concentraciones aumentadas de MT eritrocitaria. En este sentido, experimentos realizados con voluntarios jóvenes y sanos a los que se les añadió un suplemento de 50 mg/d de Zn dieron como resultado un incremento significativo de la MT eritrocitaria así como un incremento del MT-mRNA en los monocitos (*Sullivan et al., 1998*).

Además, para algunos autores, la determinación de MT en hematíes es probablemente uno de los indicadores más estables, incluso más que la MT en suero debido a su menor respuesta a factores de estrés, para la valoración del status de Zn en el organismo. Esto es debido a que los niveles de Zn en suero reflejan pobremente el mencionado status orgánico de este metal, tal como se ha mencionado anteriormente (*Bremner y Morrison, 1986; Bremner y Beattie, 1990; Grider et al., 1990; Martínez-Vea et al., 1996; Sullivan et al., 1998*).

Como se ha visto anteriormente en el apartado referente al Zn en suero, existen dudas sobre la idoneidad de la determinación de Zn en suero o plasma para conocer el status orgánico de Zn. En este sentido, diversos autores han sugerido la realización de la determinación de la MT. En el presente trabajo, no se observaron diferencias significativas en la concentración de Zn en suero entre el grupo Control y el grupo de pacientes DM 2. De

DISCUSIÓN

hecho, existen en la literatura datos contradictorios en referencia a los valores de la concentración de Zn en suero en pacientes con DM 2, tal como se ha visto anteriormente en el apartado referente al Zn en suero. Sin embargo, en el presente trabajo, sí se observaron concentraciones de MT eritrocitaria significativamente más altas en los pacientes con DM 2, lo cual podría apuntar, de acuerdo con los autores antes citados, hacia un status de Zn orgánico incrementado en este tipo de pacientes.

5.3.3. ORINA

Tanto en el grupo Control como en el grupo DM 2 no se observaron diferencias significativas en los valores de la excreción urinaria de MT entre hombres y mujeres [57,20 (67,55) vs 79,20 (52,47) $\mu\text{g/g}$ creatinina, $p=\text{NS}$, para el grupo Control y 1130,64 \pm 351,31 vs 1261,00 (244,25) $\mu\text{g/g}$ creatinina, $p=\text{NS}$, para el grupo DM 2] (Tablas X y XII). Sin embargo, en un estudio realizado con voluntarios sanos, algunos autores describen valores más altos en mujeres (*Folch et al., 1998*). En el presente trabajo, aunque el subgrupo de mujeres del grupo Control presentó valores más elevados que el subgrupo de hombres, la mencionada diferencia no alcanzó significancia estadística.

En el grupo Control, tal como ya se ha mencionado en el apartado referente a la excreción urinaria de Zn, se observó en ambos sexos una correlación positiva entre las excreciones urinarias de MT y de Zn ($r=0,66$; $p<0,001$) (Tabla XVI). En un estudio

DISCUSIÓN

efectuado con voluntarios sanos se ha descrito, aunque únicamente en hombres, una correlación positiva entre las excreciones urinarias de Zn y MT ($r=0,50$; $p<0,001$) (Folch et al., 1998). Además, algunos autores han propuesto que la MT podría actuar en la orina como una proteína que liga tanto al Zn como al Cu (Watanabe et al., 1991). En este sentido, en un estudio realizado con pacientes con síndrome nefrótico, la excreción urinaria incrementada de MT favorecería una excreción urinaria alta de Zn en estos pacientes (Martínez-Vea et al., 1996). La correlación positiva observada en el presente trabajo entre las excreciones urinarias de MT y Zn del grupo Control apoyarían esta hipótesis. Sin embargo, en el grupo de pacientes DM 2 del presente estudio aunque se observó tanto un incremento de la excreción urinaria de MT como de Zn, no se halló correlación positiva entre las excreciones urinarias de ambos parámetros. Otros autores, sin embargo, han descrito una correlación positiva entre la excreción urinaria de MT y la de Zn en pacientes DM 2 (Minami et al., 1999).

En el grupo DM 2, y tal como se menciona en el apartado referente a la concentración de la MT en suero, se observó una correlación negativa entre los valores de la excreción urinaria de MT y los valores de la concentración sérica de MT ($r=-0,41$; $p<0,001$; Tabla XIX) posiblemente, tal como también se menciona más arriba, debido al incremento de la excreción urinaria de MT en los pacientes con DM 2.

Cuando se compararon los valores de la excreción urinaria de MT de los individuos del grupo Control con los individuos del grupo DM 2 se observó que los sujetos pertenecientes a este último grupo presentaban unos niveles significativamente más altos de

DISCUSIÓN

excreción urinaria de MT que los sujetos pertenecientes al grupo Control [1222,00 (260,50) vs 61,25 (58,20) $\mu\text{g/g}$ creatinina, $p < 0,001$] (Tabla XIII). En este sentido, hay escasas referencias en la literatura con respecto a la excreción de MT en orina por parte de pacientes diabéticos. Se ha descrito, al igual que en el presente trabajo, un incremento en la excreción urinaria de MT en pacientes diabéticos, tanto DM 2 como DM 1 (*Minami et al., 1999*).

El aumento de la síntesis de MT que experimentan los pacientes con DM 2 se refleja, en primer lugar, en un aumento de la concentración de MT en suero, reflejo a su vez del aumento de la síntesis hepática de MT (*Bremner, 1987*). De este modo, la presencia en el organismo de altas concentraciones de MT hace previsible un aumento de su excreción urinaria en los pacientes con DM 2, tal como se describe en el presente trabajo. Además, algunos autores han descrito que la MT está presente principalmente en el túbulo proximal del riñón en los pacientes diabéticos. Así, la MT producida en el túbulo proximal del riñón podría ser excretada a la orina junto con el Zn (*Minami et al., 1999*).

En este sentido, a raíz de experimentos realizados en animales, algunos autores sugieren que la MT podría desempeñar un papel en la excreción urinaria de Cu, en especial en aquellos con exceso de este metal (*Evering et al., 1991*). Los resultados del presente estudio, aunque no se haya observado una correlación lineal significativa, podrían encajar con la mencionada hipótesis dado que todos los datos disponibles indican que el Cu del organismo en la DM 2 está aumentado. Además, en experimentos realizados en animales, y en relación a la excreción urinaria de MT, se ha observado también un incremento significativo de la

DISCUSIÓN

excreción urinaria de MT en aquellos individuos a los cuales se les administró diferentes metales, entre ellos Zn y Cu (*Sato et al., 1989*).

Por último, según algunos autores, la determinación de la excreción urinaria de MT, al igual que la determinación de la MT en plasma o la MT eritrocitaria, puede proporcionar información sobre el status orgánico de Zn (*Bremner y Morrison, 1986*).

5.4. CERULOPLASMINA

Las mujeres pertenecientes al grupo Control presentaron unos valores de CP en suero significativamente más elevados que los hombres [$97,45 \pm 19,77$ vs $105,13 \pm 17,58$ U/L, $p < 0,01$) (Tabla X). Los mayores niveles de actividad de CP en suero observados en las mujeres pertenecientes al grupo Control probablemente obedezcan a la presencia en éstas de una cupremia más elevada. En el presente trabajo, y por lo que respecta al grupo DM 2, a pesar de que las mujeres presentaron unos valores más elevados de CP en suero que los hombres, la mencionada diferencia no alcanzó significancia estadística ($108,69 \pm 24,34$ vs $115,28 \pm 25,65$ U/L, $p = \text{NS}$) (Tabla XII).

En el grupo Control se observó una correlación positiva entre la actividad de CP en suero y la concentración de Cu en suero, probablemente debido a que la CP es la principal proteína transportadora de Cu en el organismo ($r = 0,21$; $p < 0,01$) (Tabla XVI).

En el grupo DM 2 la actividad de la CP en suero se correlacionó de manera positiva,

DISCUSIÓN

al igual que en el grupo Control, con la concentración de Cu en suero ($r=0,29$; $p<0,001$; Tabla XIX) incluso ajustando por otras variables en el estudio de regresión múltiple ($r=0,52$; $p<0,05$; Tabla XXII), la concentración de Cu en hematíes ajustando por otras variables en el estudio de regresión múltiple ($r=0,66$; $p<0,05$; Tabla XXIII) y débilmente con la HbA_{1c} ($r=0,17$; $p<0,05$; Tabla XIX).

Cuando se compararon los valores de las actividades de CP en suero del grupo Control con los del grupo DM 2 se observó que los sujetos pertenecientes a este último grupo presentaban unos valores significativamente más altos [103,00 (12,00) vs 110,00 (19,00) U/L, $p<0,001$] (Tabla XIII).

En este sentido, algunos autores también han descrito niveles significativamente más elevados de CP en suero en la DM 2 (*Martín et al., 1978; Jones et al., 1988*). Otros autores, además de describir dichos valores más altos de CP en la DM 2, destacan una correlación positiva, al igual que la observada en el presente trabajo, entre la HbA_{1c} y la CP (*Daimon et al., 1998*).

En el presente trabajo, la hiperglucemia persistente que presentan los pacientes con DM 2, o lo que es lo mismo, unos valores persistentemente altos de HbA_{1c}, están asociados con un incremento de la CP en suero. Otros autores, sin embargo, no hallan diferencias significativas entre individuos DM 2 y sujetos control (*Collier et al., 1990; Mc Rury et al., 1993*) aunque algunos describen valores de CP con tendencia a ser más altos en pacientes diabéticos aunque sin alcanzar significancia estadística (*Walter et al., 1991*). Algunos autores,

DISCUSIÓN

sin embargo, sí describen niveles aumentados de CP entre aquellos pacientes con DM 2 y enfermedad vascular, mientras que el resto de pacientes presentan unos niveles normales (*Mc Rury et al., 1993*).

En el presente trabajo, el incremento observado en la actividad en suero de la CP en los pacientes con DM 2, y dado que la CP es una proteína de fase aguda, podría ir en la dirección apuntada por algunos autores (*Collier et al., 1990; Mac Rury et al., 1993; Cunningham et al., 1995*) referente al aumento de la actividad de los radicales libres y del estrés oxidativo en la DM. Este estrés oxidativo sería en parte responsable, según algunos autores, de las complicaciones crónicas observadas en esta enfermedad, en particular las complicaciones vasculares y, en consecuencia, el aumento de la actividad antioxidante del suero sería la respuesta al mencionado estrés oxidativo (*Jones et al., 1988*). En este sentido, se ha descrito también la presencia de valores incrementados de CP y de Cu en suero en otros estados patológicos, como carcinoma de células escamosas y leucoplaquia oral (*Jayadeep et al., 1997*), cáncer de pulmón (*Sattar et al., 1997*), artritis reumatoidea (*Zoli et al., 1998*) y oclusión arterial crónica de las extremidades inferiores (*Iskra y Majewski, 1999*).

Por otro lado, y según otros autores, el desarrollo de las complicaciones vasculares de la DM estaría relacionado, además, con el incremento de la viscosidad del suero. Este incremento es debido a que la hiperglucemia crónica favorece la disminución de los niveles de albúmina y el incremento de la CP junto con otras proteínas de fase aguda, entre ellas la haptoglobina, α -1-glicoproteína ácida, proteína C reactiva y α -1-antitripsina (*McMillan,*

DISCUSIÓN

1989).

En la DM 2 el status antioxidante se halla reducido, lo cual, según algunos autores, podría contribuir al desarrollo de las complicaciones observadas en el curso de esta enfermedad. En este contexto, se ha descrito una disminución de la actividad de la SOD en hematíes (*Zbronska et al., 1995*) y leucocitos (*Zbronska et al., 1995; Vucic et al., 1997*) de pacientes diabéticos. Además, estos autores describen que el tratamiento correcto de la enfermedad incrementa la actividad de la SOD y retrasa las complicaciones (*Zbronska et al., 1995*).

1.1. PRÓLOGO

Los elementos traza son aquellos cuya presencia en los tejidos humanos y animales es mínima, habitualmente en cantidades del orden de miligramos por kilo o incluso menores. En consecuencia, los requerimientos nutricionales de estos elementos se expresan en miligramos por día. Los elementos traza, sin embargo, son imprescindibles para la realización de gran número de funciones bioquímicas. De entre los elementos traza, el zinc (Zn) y el cobre (Cu) destacan por su importancia e implicaciones biológicas (*Milne, 1994*). Así, el Zn y el Cu forman parte fundamental de algunas enzimas, llamadas metaloenzimas, presentes en diversas funciones biológicas y, debido a su constitución, actúan transfiriendo electrones y uniendo átomos y moléculas (*Abdel-Mageed y Oehme, 1990*).

Las metalotioneínas (MT) son unas proteínas estrechamente relacionadas con el Zn, Cu y metales traza en general. Entre las funciones de las MT cabe destacar su íntima relación con el metabolismo de los elementos traza, participando tanto en la absorción como en el almacenamiento y eliminación de los mencionados elementos. Asimismo, regulan los niveles celulares de Zn y Cu, participan en los procesos de detoxificación de metales pesados, intervienen en el proceso de inflamación y están implicadas en diversas situaciones como infecciones y neoplasias (*Sobocinski y Canterbury, 1982; Sato y Bremner, 1993*). Por último, otra importante función de la MT es su participación en la defensa del organismo contra el estrés oxidativo como *scavenger* de los radicales libres (*Dunn et al., 1987; Hidalgo et al., 1988*).

INTRODUCCIÓN

La interrelación entre la Diabetes Mellitus (DM) y diferentes elementos traza, el Zn y el Cu entre ellos, y éstos con la MT, se caracteriza por un alto nivel de reciprocidad. La hiperglucemia crónica no controlada puede causar alteraciones significativas en el status de estos elementos y, en consecuencia, en el de la MT (*Mooradian et al., 1994*).

1.2. DIABETES MELLITUS

La DM es un desorden del metabolismo de los carbohidratos, proteínas y lípidos asociado a una insuficiencia relativa o absoluta de la secreción de insulina y con varios grados de resistencia a ésta. Su forma clínica típica se caracteriza por la presencia de hiperglucemia en ayunas y, en la mayoría de pacientes con una larga evolución de la enfermedad, aterosclerosis, enfermedad vascular microangiopática y neuropatía (*Fajans, 1995*).

1.2.1. CRITERIOS DIAGNÓSTICOS

El diagnóstico de DM puede ser efectuado si se cumplen alguno de los siguientes criterios (*American Diabetes Association, 1997*):

- 1.- Glucemia (determinada en cualquier momento del día) ≥ 200 mg/dL (11,1 mmol/L).
- 2.- Glucemia en ayunas ≥ 126 mg/dL (7,0 mmol/L).
- 3.- Test de sobrecarga oral de glucosa con un resultado a las dos horas ≥ 200 mg/dL (11,1 mmol/L).

1.2.2. CLASIFICACIÓN DE LA DM

La clasificación actual de la DM, según el Comité de Expertos en el Diagnóstico y Clasificación de la Diabetes Mellitus de la *American Diabetes Association* puede observarse en la Tabla I.

Tabla I. Clasificación de la DM (*American Diabetes Association, 1997*).

- I. Diabetes tipo 1 (destrucción de células β)
 - A. Causa inmune
 - B. Idiopática
- II. Diabetes tipo 2
- III. Otros tipos
 - A. Defectos genéticos de la función de las células β
 - 1. Cromosoma 12, HNF-1 α (anteriormente MODY3)
 - 2. Cromosoma 7, glucoquinasa (anteriormente MODY2)
 - 3. Cromosoma 20, HNF-4 α (anteriormente MODY1)
 - 4. DNA mitocondrial
 - 5. Otros
 - B. Defectos genéticos en la acción de la insulina
 - 1. Resistencia tipo A a la insulina
 - 2. Leprechaunismo
 - 3. Síndrome de Rabson-Mendenhall
 - 4. Diabetes lipoatrófica
 - 5. Otros
 - C. Enfermedades del páncreas exocrino
 - 1. Pancreatitis
 - 2. Trauma/pancreatectomía
 - 3. Neoplasia
 - 4. Fibrosis quística
 - 5. Hemocromatosis
 - 6. Pancreatopatía fibrocalculosa
 - 7. Otras
 - D. Endocrinopatías
 - 1. Acromegalia
 - 2. Síndrome de Cushing
 - 3. Glucagonoma
 - 4. Feocromocitoma
 - 5. Hipertiroidismo
 - 6. Somatostatina
 - 7. Aldosteronoma
 - 8. Otras
 - E. Inducida por fármacos o por sustancias químicas
 - 1. Pentamidina
 - 2. Ácido nicotínico
 - 3. Glucocorticoides
 - 4. Hormona tiroidea

- 5. Diazóxido
- 6. Agonistas β -adrenérgicos

Tabla I (continuación)

- 7. Tiazidas
- 8. Dilantina
- 9. α -interferon
- 10. Otros

F. Infecciones

- 1. Rubeola congénita
- 2. Citomegalovirus
- 3. Otras

G. Formas raras de diabetes de causa inmune

- 1. Síndrome “stiff-man”
- 2. Anticuerpos anti-receptor de la insulina
- 3. Otras

H. Otros síndromes genéticos ocasionalmente asociados con diabetes

- 1. Síndrome de Down
- 2. Síndrome de Klinefelter
- 3. Síndrome de Turner
- 4. Síndrome de Wolfram
- 5. Ataxia de Friedreich
- 6. Corea de Huntington
- 7. Síndrome de Lawrence Moon Beidel
- 8. Distrofia miotónica
- 9. Porfiria
- 10. Síndrome de Prader Willi
- 11. Otros

IV. Diabetes mellitus gestacional (DMG)

1.2.3. DIABETES MELLITUS TIPO 2

La Diabetes Mellitus tipo 2 (DM 2) es la forma más frecuente de DM (cerca del 90% de los individuos diagnosticados de DM). La etiopatogenia de la DM 2 implica alteraciones en la insulino-secreción con aparición de insulino-resistencia e hiperglucemia (*Bell, 1991*). La insulino-resistencia puede ser causada por diferentes factores genéticos o metabólicos. Una de

INTRODUCCIÓN

las causas más frecuentes de insulino-resistencia es la obesidad. La insulino-resistencia puede asociarse a un conjunto de alteraciones metabólicas que incluyen intolerancia a la glucosa, hipertensión arterial, dislipemia e incremento de enfermedad macrovascular (*Lebovitz, 1999*).

La hiperglucemia observada en el curso de la DM 2 es una de las causas principales del desarrollo de complicaciones entre las cuales destacan las lesiones microvasculares (retinopatía, nefropatía y neuropatía) y la afectación macrovascular con aterosclerosis acelerada (*Chausmer, 1998*).

La DM 2 es un trastorno heterogéneo; la expresión clínica de ésta es una superposición de factores genéticos y ambientales (*Lebovitz, 1999*). Un factor importante en la patogénesis de la DM 2 es la presencia de obesidad, lo cual contribuye a la aparición de resistencia a la acción de la insulina (*Fajans, 1995*). La frecuencia del diagnóstico de DM 2 se incrementa con la edad y generalmente al inicio de la enfermedad no requiere tratamiento con insulina (*Lebovitz, 1999*). Los pacientes con DM 2 son no-insulino dependientes para la prevención de la cetosis, pero pueden requerir insulina para la corrección de la hiperglucemia en ayuno si ésta no ha podido ser corregida con la dieta o fármacos hipoglucemiantes orales (*Fajans, 1995*).

Durante los últimos años ha aumentado el interés en el estudio por analizar el efecto de la DM 2 sobre los elementos traza. Existen varios trabajos, con resultados diversos, que han evaluado los niveles de metales en los pacientes diabéticos (*Nobels et al., 1986; D'Ocon et al., 1987; Raz et al., 1988; Schlienger et al., 1988; Raz et al., 1989; El-Yazigi et al.,*

INTRODUCCIÓN

1991; Walter *et al.*, 1991; Car *et al.*, 1992; Honnorat *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 1995; Mooradian *et al.*, 1994; Williams *et al.*, 1995; Rauscher *et al.*, 1997; Chausmer, 1998; Terres *et al.*, 1998; Zargar *et al.*, 1998). Por otro lado, a pesar de que la persistencia de hiperglucemia en la DM se ha relacionado con un incremento en la producción de radicales libres (Ceriello *et al.*, 1998; Baynes y Thorpe, 1999; Domínguez *et al.*, 1999; Ruiz *et al.*, 1999; Ihara *et al.*, 1999) y teniendo en cuenta la importancia de la MT como *scavenger* de éstos, poco hay descrito en la literatura en relación al efecto de la DM 2 sobre los niveles de MT (Minami *et al.*, 1999; Simpkins, 2000).

En este sentido, algunos autores han descrito la presencia de MT en los túbulos renales proximales de pacientes con DM 2. Estos mismos autores describen un incremento de la excreción urinaria de MT en estos pacientes. La MT producida en los túbulos renales proximales podría ser excretada a la orina unida al Zn (Minami *et al.*, 1999).

1.3. ZINC

1.3.1. FUNCIONES BIOLÓGICAS

El Zn es un elemento traza esencial para los seres vivos, presente en todos los órganos, tejidos y secreciones del cuerpo humano. La cantidad corporal total de Zn en un adulto de 70 kg oscila entre 1,4 y 2,3 g. Los tejidos y secreciones especialmente ricos en Zn son próstata, semen, hígado, riñón, retina, hueso y músculo. El músculo esquelético y el tejido óseo contienen el 80% del Zn corporal total, el 95% del cual se localiza en el citoplasma celular. Menos de un 0,5% del Zn corporal se halla en la sangre de humanos adultos, el 75-80% del cual se encuentra en los hematíes, principalmente en la anhidrasa carbónica eritrocitaria y el 12-22% restante en el plasma. Los requerimientos nutricionales diarios aconsejados de Zn para un adulto oscilan entre 12 y 15 mg/d (*Milne, 1994*).

El Zn se halla involucrado en multitud de procesos metabólicos como son la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, el metabolismo de los hidratos de carbono, la espermatogénesis, la ovulación y, debido a sus propiedades antioxidantes, en la reducción de actividad de los radicales libres (*Cousins, 1985*) (Tabla II).

Tabla II. Vías metabólicas y sistemas enzimáticos en los cuales está implicado el Zn.

<ul style="list-style-type: none">· Glucólisis· Síntesis de ácidos nucleicos· Metabolismo del etanol· Formación del hemo· Hidrólisis de proteínas y grupos fosfato· Reducción de actividad de radicales libres· Crecimiento y funcionalismo celular· Metabolismo de la insulina<ul style="list-style-type: none">•Prolongación del efecto insulínico•Unión de la insulina a proteínas de membrana•Síntesis y almacenamiento en páncreas· Producción de colágeno· Integridad y motilidad espermática· Contracción muscular· Calcificación ósea· Esteroidogénesis y lipogénesis· Estabilizador de membranas. Activador de sistemas de transporte transcelular· Receptores sensoriales<ul style="list-style-type: none">•Vista<ul style="list-style-type: none">‡Metabolismo hepático de la vitamina A<ul style="list-style-type: none">‡Conversión de retinol a retinal en la retina‡El déficit de Zn ocasiona pérdida de visión nocturna•Gusto<ul style="list-style-type: none">‡El déficit de Zn ocasiona disgeusia y disosmia· Sistema inmune<ul style="list-style-type: none">•Producción de hormonas tiroideas•Transformación linfocitaria ante mitógenos•Función células Natural Killer (NK) y neutrófilos•Citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos•Producción de linfoquinas

Una de sus funciones más importantes es el de actuar como cofactor en gran número de enzimas. Se han descrito más de 100 metaloenzimas que contienen Zn en su centro catalítico, la mayoría localizadas en el hígado (*Caballero, 1992*) (Tabla III).

Tabla III. Metaloenzimas que requieren Zn.

ENZIMAS
Carboxipeptidasa A
Carboxipeptidasa B
Termolisina
Leucin-amino-peptidasa
Anhidrasa carbónica
Fosfatasa alcalina
Aldolasa
Alcohol deshidrogenasa
Superóxido dismutasa
Aspartatotranscarbamilasa
RNA-polimerasa
DNA-polimerasa
5'Nucleotidasa
Colagenasa
α -Amilasa
Lactato deshidrogenasa
Glutamato deshidrogenasa
Porfobilinógeno sintetasa

El Zn proporciona a las enzimas, además de su actuación directa en la catálisis, una estabilidad estructural a la molécula que lo contiene. En algunas enzimas, como en la alcohol deshidrogenasa, el Zn actúa como puente de unión entre grupos reactivos. En otros casos, como el de la molécula de la insulina, el Zn se une de forma débil a la α -hélice, proporcionando a ésta diferentes propiedades según el tipo de unión. En la MT, el Zn se encuentra formando parte de racimos tetraédricos unidos a grupos tiol (*Williams, 1984*).

También el Zn es esencial para la síntesis de DNA y desempeña un importante papel

INTRODUCCIÓN

en el crecimiento celular, al ser necesario para la actuación de las DNA y RNA polimerasas (*Prasad y Oberleas, 1974*).

En el proceso de almacenamiento y regulación de la acción de la insulina in vivo el Zn tiene un papel fundamental. Los cristales de Zn-insulina están presentes en las células β del páncreas, siendo utilizado por éstas en el almacenamiento y regulación de la secreción de insulina (*Ahmad Wahid et al., 1988*).

El Zn puede influenciar las propiedades antigénicas de la insulina e incrementar la unión de la insulina a las células hepáticas. Así, según algunos autores, el metabolismo anormal del Zn podría tener un papel patogenético en la DM 2 (*Chausmer, 1998*).

El Zn es necesario para una adecuada función del sistema inmune del organismo, en especial de los linfocitos T. Además, y dado que el Zn tiene un papel en la cicatrización de heridas, algunos autores han sugerido su uso en el tratamiento del pie diabético (*Mooradian y Morley, 1987*).

Así pues, tal como figura en la Tabla III, al formar parte de tal cantidad de sistemas enzimáticos el Zn resulta implicado en un gran número de vías metabólicas y funciones biológicas.

1.4. COBRE

1.4.1. FUNCIONES BIOLÓGICAS

El Cu, al igual que el Zn, es un elemento esencial para los sistemas biológicos. Su proximidad con el Zn en la tabla periódica hace que posea unas características químicas muy parecidas y que participe con éste en procesos comunes (*Abdel-Mageed y Oehme, 1990*).

Se considera que los requerimientos diarios de Cu para un adulto son de 1,5-3 mg/día (*Milne, 1994*). En condiciones normales, el 56% del Cu ingerido en la dieta es absorbido y secretado por la bilis en su mayor parte, aunque una pequeña fracción es eliminada por la orina (*Cousins, 1985*).

Un tercio del Cu del organismo humano se halla en el músculo y el resto, en tejidos y líquidos orgánicos (*Underwood, 1977*). Aproximadamente el 90% del Cu plasmático se encuentra unido a la Ceruloplasmina (CP) y el 10% restante a la albúmina, aunque este último de forma mucho más débil (*Cousins, 1985*).

El Cu es necesario para gran variedad de funciones que incluyen, entre otras, el crecimiento, el sistema de defensa del huésped, la formación y fortaleza ósea, la maduración de hematíes y leucocitos, el transporte de hierro, el metabolismo de glucosa y colesterol, la función cardíaca, el desarrollo del tejido conectivo, la mielinización de la médula espinal, la queratinización y el desarrollo del cerebro (*Olivares y Uauy, 1996*). Como otros elementos

traza, el Cu presenta gran número de funciones biológicas en proteínas y enzimas, estas últimas denominadas cuproenzimas (Tabla IV).

Tabla IV. Cuproproteínas en las que participa el Cu

PROTEÍNA	LOCALIZACIÓN
Albocupreína I	Cerebro
Albocupreína II	Plasma
Albúmina	Plasma
Azurina	Hígado
Ceruloplasmina	Plasma
Hemocianina	Hígado
Lisil-oxidasa	Tejido conectivo, hígado
Metalotioneína I y II	Generalizada
Neurocupreína	Cerebro, médula adrenal
Superóxido-dismutasa	Membrana eritrocitaria, citosol, hígado
Transcupreína	Plasma

A diferencia de otras enzimas, las cuproenzimas poseen alta afinidad para el oxígeno, en función del número de átomos de Cu incorporados. Todas las cuproenzimas que contienen 4 átomos de Cu, excepto la citocromo oxidasa, son capaces de reducir el oxígeno a agua, mientras que aquellas que contienen de 1 a 2 átomos de Cu reducen el oxígeno a peróxido de hidrógeno. En organismos aerobios, la citocromo oxidasa proporciona oxígeno para la contracción muscular, las mitocondrias hepáticas y la materia gris del cerebro (*Abdel-Mageed y Oehme, 1990*).

Una Cu-metaloenzima de gran importancia biológica es la superóxido dismutasa (SOD). La SOD es abundante en el hígado así como en otros tejidos. Cataliza la dismutación

del anión superóxido:



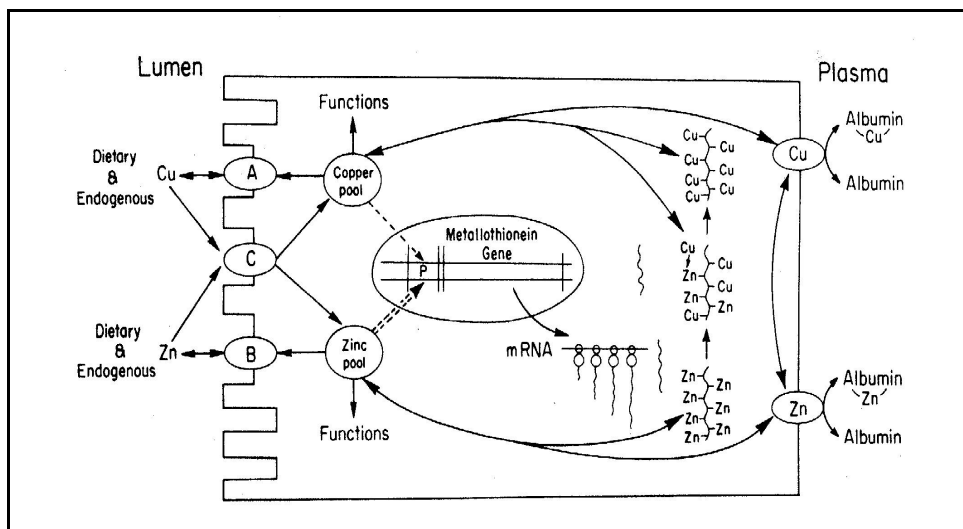
Otra importante Cu-metaloenzima es la lisil oxidasa, esencial en la biosíntesis del tejido conectivo. Su déficit probablemente explica las lesiones que afectan al hueso y tejido conectivo que se observan en la deficiencia de Cu. Su actividad en el hígado se ha relacionado a la síntesis de colágeno durante la fibrosis hepática (*Cousins, 1985*).

Por otro lado, existe la evidencia que el Cu, contrariamente a lo que sucede con el Zn, presenta propiedades pro-oxidantes y, en consecuencia, un desequilibrio en el metabolismo del Cu podría condicionar la aparición de un status de estrés oxidativo. En este sentido, se ha descrito que cuanto mayor es el cociente Cu/Zn en suero mayor es el contenido de peróxidos lipídicos, es decir, existe una relación entre el cociente Cu/Zn y la carga oxidante sistémica (*Mezzetti et al., 1998*).

1.5. METABOLISMO DEL ZINC Y COBRE

1.5.1. ABSORCIÓN INTESTINAL

Existen 4 fases en el proceso de absorción intestinal del Zn y Cu (Fig.1): captación y transporte a través de la superficie en borde de cepillo (SBC) de las células intestinales, ingreso en la circulación portal mediante la albúmina como transportador y, por último, resecreción por las células intestinales. Dentro de la célula intestinal (Fig.1) el Zn y el Cu interactúan con los pools intracelulares y si existen concentraciones intracelulares elevadas de alguno de éstos se activa el promotor del gen de la MT, incrementándose así su



transcripción (Cousins, 1985).

Fig.1. Representación esquemática de la célula de la mucosa intestinal y sitios probables de interacción del Zn y Cu de la dieta. El Cu y el Zn de la dieta y/o endógenos son transportados a través de la SBC intestinal (A) y (B). Existe una interacción entre altas concentraciones en el lumen de Zn y Cu para un sistema de transporte común (C). El Zn y el Cu son transferidos desde el enterocito al plasma unidos a la albúmina (tomado de Cousins RJ. Absorption, Transport, and Hepatic Metabolism of Copper and Zinc: Special Reference to Metallothionein and Ceruloplasmin. *Physiological Reviews* 1985; 2:238-309)

El mecanismo y el control de la absorción de Zn son complejos. La absorción de Zn es dependiente de la concentración y tiene lugar a lo largo de todo el intestino delgado, siendo en el yeyuno donde ésta es mayor. Se ha sugerido que el transporte del Zn a través de la SBC de las células del intestino delgado podría realizarse, en parte, mediante un mecanismo de difusión regulado por un transportador (*Lee et al., 1989*). Existen diversos factores que tienen influencia sobre la absorción de Zn y Cu. En la Tabla V se muestran los más importantes.

Tabla V. Factores que influyen en la absorción de Zn y Cu.

Absorción de Zn		Absorción de Cu	
EDTA	↑↑	L-aminoácidos	↑↑
Dieta rica en proteínas	↑	Nítrilotriacetato	↑↑
Lisina, cisteína, glicina	↑	D-aminoácidos	↑
Dieta pobre en hierro	↑	Citrato, fosfato, gluconato	↑
Lactosa	↑	Oxalato, EDTA	↑

INTRODUCCIÓN

Histidina	↑	Dieta rica en proteínas	↑
Secreciones pancreáticas	↑	Fitatos	↓
Prostaglandina E ₂	↑	Ácido ascórbico	↓
Ácido ascórbico	↑	Tiomolibdato	↓
Dieta rica en calcio	↓	Fibra	↓
Fibra	↓	Bilis	↓
Dieta pobre en proteínas	↓	Zinc	↓
Fitatos	↓		
Cobre	↓		
Dieta rica en hierro	↓		

↑: incremento; ↓: disminución

La absorción de Zn disminuye con la presencia en la dieta de fitatos, alto contenido de fosfatos o una excesiva cantidad de calcio, y se incrementa con la presencia de ciertos aminoácidos, péptidos o ácido etilendiaminotetracético (EDTA) (*Abdel-Mageed y Oehme, 1990*). La absorción de numerosos metales pesados está aumentada durante períodos de restricción alimentaria (*Quarterman y Morrison, 1981*). La presencia de altos niveles de proteínas en la dieta estimula la absorción de Zn (*Solomons y Cousins, 1984*) y, a la inversa, la restricción de proteínas en la dieta limita su absorción (*Van Campen y House, 1974*).

La secreción del Zn en el intestino tiene lugar tanto por vía pancreática como biliar y también a través del flujo en dirección serosa a mucosa intestinal. La secreción de Zn endógeno juega un importante papel en la homeostasis de la captación de Zn. El Zn circulante que no es captado por el organismo vuelve al tracto gastrointestinal como un componente de la MT secretada por las glándulas salivares, páncreas, hígado y riñón (*Cousins, 1985*).

Existe un antagonismo mutuo entre la absorción de Zn y la de Cu. Niveles altos de Zn

INTRODUCCIÓN

en la dieta disminuyen la absorción de Cu. Del mismo modo, niveles altos de Cu en la dieta disminuyen moderadamente la absorción de Zn (*Oestreicher y Cousins, 1985*).

La absorción de Zn y Cu también está influenciada por la hiperglucemia. Se ha observado que la absorción de Zn y Cu está incrementada en ratas diabéticas. La polifagia y el incremento de la captación de Zn y Cu a nivel de la SBC intestinal debido a un incremento de la masa de la mucosa podrían ser la causa de este efecto (*Craft y Failla, 1983*).

La absorción de Cu tiene lugar en la totalidad del tracto gastrointestinal, preferentemente en el estómago, existiendo multitud de factores dietéticos que influyen en ella (*Van Campen y Mitchell, 1965*) (Tabla V). Además, recientemente se ha sugerido que las células de Paneth de la mucosa intestinal, cuya función exacta está sin aclarar, podrían estar implicadas también en el metabolismo del Cu mediante la captación y almacenamiento en su interior en forma de complejos Cu-MT (*Mullins y Fuentealba, 1998*).

La absorción de Cu puede ser saturable o no saturable, sugiriendo un mecanismo de difusión activa o simple respectivamente (*Bronner y Yost, 1985*). La absorción de Cu se incrementa en individuos con déficit de Cu (*Van Campen y Gross, 1968*), en neoplasias y en la DM (*Cohen et al., 1975*). Las proteínas de la dieta incrementan la biodisponibilidad del Cu (*Greger y Snedeker, 1980*). La absorción de Cu disminuye en individuos con un status corporal de Cu adecuado (*Cunnane y Horrobin, 1985*). Los sulfatos y sulfitos también reducen la absorción de Cu formando complejos insolubles a lo largo del tracto gastrointestinal (*Abdel-Mageed y Oehme, 1990*). Los fitatos, ácido ascórbico, fosfomolibdato

INTRODUCCIÓN

y fructosa disminuyen la absorción de Cu debido a la formación de complejos poco absorbibles (*Van Campen y Gross, 1968*). El Zn, cadmio (Cd), plata (Ag) y mercurio (Hg) reducen la absorción de Cu al competir por el lugar de absorción (*Van Campen, 1966; Van Campen y Scaife, 1967*).

Las secreciones endógenas también tienen influencia en la absorción de Cu. La bilis presenta una influencia negativa en la reabsorción del Cu secretado (*Gollan y Deller, 1973*). Las secreciones pancreáticas tienen un efecto similar (*Jamison et al., 1981*). Los glucocorticoides promueven la secreción biliar de Cu, lo cual indica que el estado hormonal puede alterar la absorción de Cu al influenciar sobre este mecanismo excretorio (*Cousins, 1985*).

1.5.2. TRANSPORTE PLASMÁTICO

La mayor parte del Zn circulante plasmático está asociado a proteínas, siendo la albúmina la principal de ellas dado que transporta aproximadamente dos tercios del Zn plasmático (*Prasad y Oberleas, 1970; Scott y Bradwell, 1983*). La capacidad de la albúmina de donar Zn es una característica esencial de la transferencia de Zn entre el plasma y los tejidos (*Cousins, 1985*).

La α_2 -macroglobulina, transferrina, CP y gammaglobulina también ligan cantidades significantes de Zn (*Parisi y Vallee, 1970; Giroux, 1975*). Existe una pequeña cantidad de Zn (2-3%) unida a histidina, glutamina, treonina, cistina y lisina (*Prasad, 1979*). Por último,

una pequeña fracción circula en forma iónica (*Prasad y Oberleas, 1970*).

El Cu se distribuye en el plasma unido principalmente a la CP, la cual transporta el 90% del Cu plasmático. El Cu unido a la albúmina y aminoácidos constituye el pool menos fuertemente unido. La albúmina y los aminoácidos parecen ser los ligandos que transportan el Cu en la circulación portal, lo cual sugiere que el Cu unido débilmente es la forma donada a los hepatocitos. El Zn y el Cu no parecen compartir lugares comunes en la molécula de albúmina, por lo cual, es poco probable una competición entre el Zn y el Cu a ese nivel (*Cousins, 1985*).

El Cu es secretado de los hepatocitos en forma de CP-Cu y es transportado así hasta los tejidos. Sus niveles plasmáticos se ven alterados en ciertas patologías, así como en dietas deficientes en Cu. La CP está considerada como una proteína de fase aguda y sometida a las alteraciones propias de este grupo de metabolitos (*Cousins, 1985*).

1.5.3. METABOLISMO HEPÁTICO

El Zn es transportado hacia el hígado unido a la albúmina (*Underwood, 1977*). Tal como se muestra en la Fig.2, el aporte constante y suficiente de Zn intracelular se mantiene gracias a la acción concertada de diversos factores hormonales (*Cousins, 1985*).

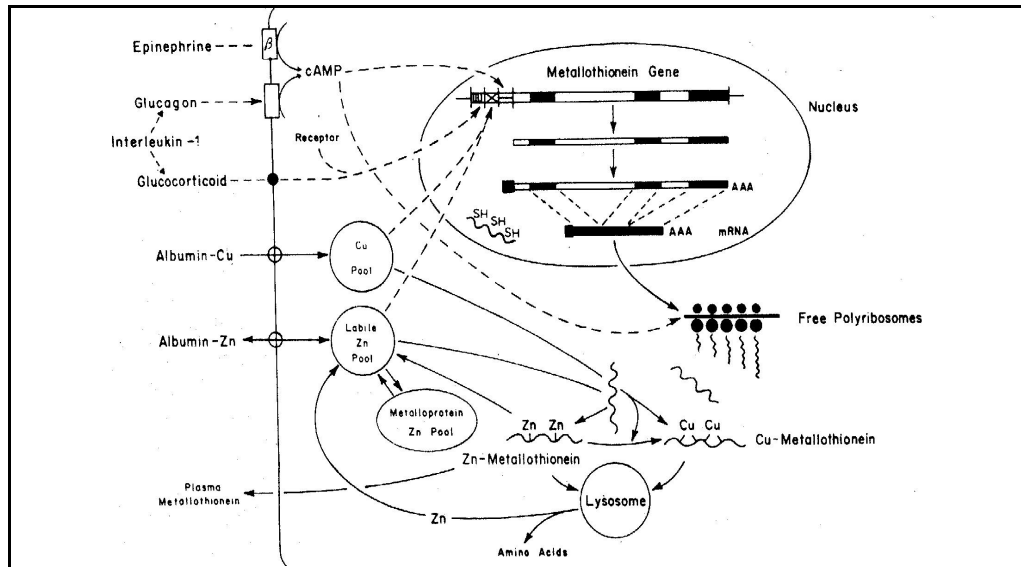


Fig.2. Célula hepática. Regulación del metabolismo del Zn y de la síntesis de MT.

El Zn circula en el plasma unido a la albúmina. El Zn celular se distribuye entre metaloproteínas, organelas, macromoléculas y membranas, representadas aquí como pool lábil de Zn (acúmulo de Zn) y pool de Zn-metaloproteína (intercambio de Zn). Niveles intracelulares altos de Zn, consecuencia de un incremento en la concentración plasmática de Zn, activan el promotor del gen de la MT (tomado de Cousins RJ. *Physiological Reviews* 1985; 2:238-309).

En este sentido, estudios realizados con cultivos de células hepáticas y células HeLa demuestran que el acúmulo de Zn es estimulado en respuesta a glucocorticoides (Failla y Cousins, 1978). El glucagón estimula la captación de Zn por parte de las células del parénquima hepático, acentuándose este efecto cuando se combina con dexametasona

INTRODUCCIÓN

(*Cousins, 1985*). Los cambios en el metabolismo del Zn hepático están colectivamente mediados, al menos en parte, por el glucagón, la insulina y los glucocorticoides. La disminución en la acumulación del Zn sérico y hepático son efectos agudos de estrés, infección y trauma, y podrían estar mediados por estas hormonas (*Cousins, 1985*).

Niveles intracelulares altos de Zn, consecuencia de un incremento en la concentración plasmática de Zn, activan el promotor del gen de la MT y el mRNA es traducido en polirribosomas libres. La expresión de dicho gen parece ser más sensible a los cambios de Zn en la dieta que a los cambios de Cu en ésta. Por otra parte, los glucocorticoides también activan la transcripción de este gen. El glucagón y la epinefrina también pueden actuar en el proceso intracelular de síntesis de la MT, probablemente activando la transcripción via cAMP. Los nuevos polipéptidos de MT unen al Zn y al Cu intracelulares después de su transporte al interior de la célula. El Cu intracelular también es unido a la MT. Estas proteínas difieren en su susceptibilidad a la degradación en el orden tioneína > Zn-MT > Cu-MT. Las proteasas lisosomales parecen estar implicadas en la degradación de la MT. La resistencia de Cu-MT a la degradación podría explicar en parte su acúmulo en algunas enfermedades genéticas, p.e., la enfermedad de Wilson. Finalmente, el Zn endógeno es devuelto al intestino a través de la bilis. Probablemente, la albúmina y aminoácidos sean los ligandos a los cuales es transferido el Zn durante el eflujo desde los hepatocitos (*Cousins, 1985*).

El hígado es el órgano principal en el metabolismo del Cu. Generalmente, cuando el Cu de la dieta es bajo, la concentración de Cu hepático está disminuida y viceversa

(Underwood, 1977).

La concentración de Cu en el hígado está influenciada tanto por el aporte dietético de Cu como por factores patológicos específicos (Fig.3).

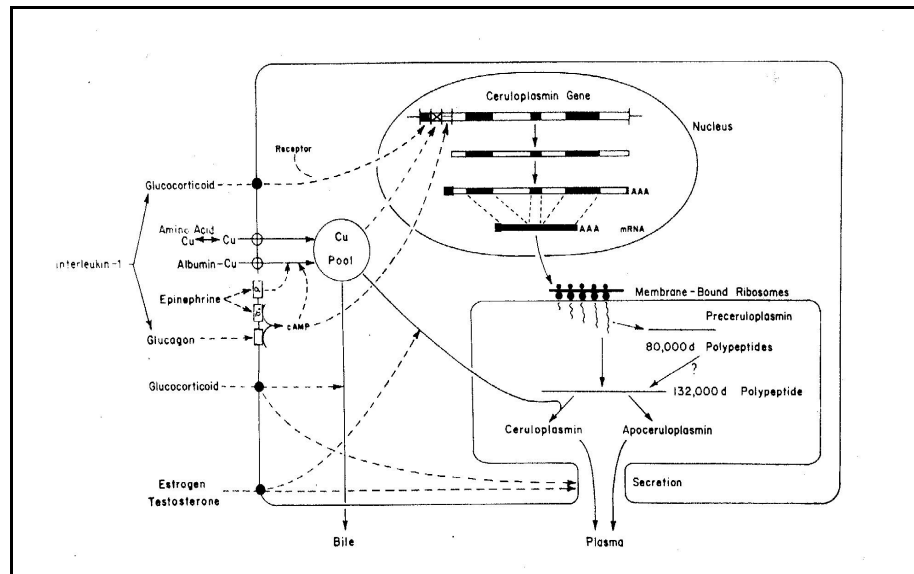


Fig.3. Célula hepática. Regulación del metabolismo del Cu y de la síntesis y secreción de CP.

INTRODUCCIÓN

Esquema de una célula parenquimatosa hepática donde se muestran los componentes clave de la regulación hormonal del metabolismo del Cu y de la síntesis y secreción de CP. La captación de Cu desde la circulación portal implica tanto al Cu unido a aminoácidos y/o albúmina como al Cu libre. El Cu celular se halla distribuido entre varios compartimientos, representados aquí como pool de Cu (tomado de Cousins RJ. *Physiological Reviews* 1985; 2:238-309).

Así, la acción de la epinefrina incrementa la acumulación celular de Cu más que otras hormonas. Por otra parte, la transcripción del gen de la CP podría estar regulado por glucocorticoides, cAMP y/o Cu. Además, la epinefrina y el glucagón incrementan los niveles celulares de cAMP. Los glucocorticoides parecen incrementar también la excreción biliar de Cu hepático (Cousins, 1985).

1.5.4. EXCRECIÓN

Las heces constituyen la ruta principal de la excreción de Zn, aunque entre un 2 y un 10% puede eliminarse por la orina (Bunker *et al.*, 1984). Se considera que 2 g de Zn son filtrados diariamente por los glomérulos renales. La excreción urinaria de Zn se ha estimado entre 300 y 500 µg/día en adultos (Hambidge *et al.*, 1983). La excreción fecal incluye tanto el Zn no absorbido de la dieta como la excreción de Zn endógeno (Solomons *et al.*, 1982). Las principales rutas en la excreción fecal del Zn endógeno son la bilis, la secreción pancreática y las células de la mucosa intestinal (Menard *et al.*, 1981). Las pérdidas por descamación de la piel y sudor son rutas excretorias menores del Zn (Baer y King, 1984).

Al igual que el Zn, las heces constituyen la ruta principal de la excreción de Cu. La excreción fecal incluye tanto el Cu no absorbido de la dieta como la excreción de Cu

INTRODUCCIÓN

endógeno. La ruta principal en la excreción fecal del Cu endógeno es la bilis. Existe controversia en la literatura en relación a las concentraciones de Cu en la orina, sin embargo, se consideran normales concentraciones entre 3,8 y 6,6 $\mu\text{g/L}$ o una excreción diaria entre 5 y 50 μg en el adulto (*Abdel-Mageed y Oehme, 1990*).

1.6. METALOTIONEÍNA

1.6.1. PROPIEDADES

La Metalotioneína (MT) fue descubierta en 1957 cuando Margoshes y Vallee identificaron en el córtex renal del caballo una proteína que unía el Cd responsable de la acumulación natural de Cd en dicho tejido. Posteriormente, fue aislada y caracterizada por Kägi y Vallee. La MT ha sido una de las metaloproteínas más estudiadas a causa de su inducción por metales pesados y hormonas. Dependiendo de la especie animal y del tejido del cual es aislada, esta proteína se halla unida a varios metales, especialmente Cd, Cu, Hg y Zn (*Kägi y Vallee, 1960*). La MT es el único compuesto biológico que puede contener Cd de forma natural. Sin embargo, el Cd sólo es una de las varias opciones de componentes metálicos en la molécula de MT. Los componentes más comunes son Zn y Cu (*Kägi y Schäffer, 1988*).

La MT está presente en todo el reino animal, plantas superiores, microorganismos eucariotas y algunos procariotas. En los animales, la MT es más abundante en tejidos parenquimatosos, por ejemplo hígado, riñón, páncreas e intestino (*Kägi y Schäffer, 1988*).

La MT se caracteriza por un alto contenido en tiol y ausencia de aminoácidos aromáticos, incluyendo tirosina, triptófano y fenilalanina. Veinte de los 61 residuos de aminoácidos son cisteína, todos ellos involucrados en la unión a metales (*Sato y Bremner, 1993*). Las características principales de esta proteína pueden observarse en la Tabla VI y su estructura se muestra esquemáticamente en la Fig.4.

Tabla VI. Características de la molécula de MT

1. Alto contenido de metales pesados (7 átomos de Zn o Cd/molécula o 12 átomos de Cu/molécula de proteína)
2. Peso molecular bajo (aproximadamente 6800 Da en la MT-I)
3. Composición en aminoácidos característica
 - Alto contenido de cisteína (20 cisteínas sobre un total de 61 aminoácidos)
 - Inexistencia de aminoácidos aromáticos, enlaces disulfuro, e histidina
4. Presencia de isoformas
5. Cluster metalo-tiolatos (cluster A y cluster B)
6. Afinidad por los metales
7. Termoestable

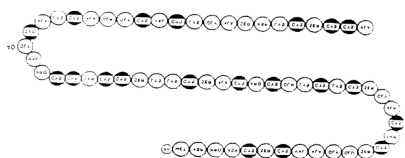


Fig.4. Esquema de la estructura de la MT-II humana

Las MT se han dividido clásicamente en tres clases. La clase I comprende las MT de los mamíferos. La clase II comprende MT con ninguna o muy distante correspondencia con las formas de los mamíferos, por ejemplo, MT de erizo de mar, trigo, levaduras y algunos organismos procariotas. La clase III comprende MT con polipéptidos atípicos, como γ -glutamilcisteína, en los sitios de unión a metales (*Kägi y Schäffer, 1988; Vallee y Maret, 1993*).

La MT de clase I presenta polimorfismos genéticos. En los tejidos de los mamíferos las dos isometalotioneínas principales son la MT-1 y la MT-2. Difieren ligeramente en la composición de aminoácidos y son separables mediante cromatografía de intercambio iónico con dietilaminoetil (DEAE) o HPLC (*Suzuki y Maitani, 1981*). Existen también subformas dentro de dichas isometalotioneínas, separables por HPLC y especificadas mediante letras minúsculas, por ejemplo, MT-1a, MT-1b, etc. (*Kägi y Schäffer, 1988*). De todas formas, dentro de la MT existe una amplia secuencia de la proteína que es homóloga entre varias especies, lo cual indica que presenta una estructura primaria altamente conservada (*Cousins, 1985*). Más tarde se aisló la MT-3, presente en las neuronas del hipocampo, cuya regulación está alterada en la enfermedad de Alzheimer (*Vallee y Maret, 1993*).

Recientemente se ha propuesto una nueva clasificación de la MT basada en las similitudes de su secuencia y su relación filogenética. Este sistema divide la superfamilia MT en familias las cuales a su vez se dividen en subfamilias, subgrupos e isoformas. De este modo,

INTRODUCCIÓN

una familia MT son aquellas MT que comparten un conjunto de caracteres específicos particulares. Cada familia se identifica mediante su número y su rango taxonómico. En esta clasificación se describen 15 familias: Familia 1, MT de vertebrados; Familia 2, MT de moluscos; Familia 3, MT de crustáceos; Familia 4, MT de equinodermos; Familia 5, MT de dípteros; Familia 6, MT de nematodos; Familia 7, MT de ciliados; Familias 8, 9, 10, 11, 12 y 13, MT de hongos; Familia 14, MT de procariotas y Familia 15, MT de plantas. Una subfamilia MT contiene las MT que comparten un conjunto más restringido de características filogenéticas. Una subfamilia se representa con una letra minúscula seguida, si es necesario, de un número. Así, por ejemplo, en la Familia 1 correspondiente a las MT de vertebrados se describen 11 subfamilias (m1, m2, m3, m4, m, a, a1, a2, b, ba y t): m1, MT-1 de mamíferos; m2, MT-2 de mamíferos; m3, MT-3 de mamíferos; m4, MT-4 de mamíferos, m: MT de mamíferos incompletamente asignable a m1 o m2; a, MT incompletamente asignable de aves; a1, MT-1 de aves; a2, MT-2 de aves; b, MT de batracios; ba, MT de anuros y t, MT de teleósteos. Un subgrupo MT representa una rama de secuencias de MT de una subfamilia. Por ejemplo, m2U2: MT-2 ungulados, subgrupo de la subfamilia m2 (*Binz y Kägi, 1999*).

La unión a los metales consiste en la formación de un complejo de estructura tetraédrica con cuatro grupos tiol. Los siete átomos metálicos unidos a la MT están ordenados en dos clusters, uno con cuatro átomos (cluster A) y otro con tres átomos (cluster B) (*Otvos y Armitage, 1980*). La unión de los metales ocurre en primer lugar en el cluster A y a continuación en el B. El orden de liberación de estos átomos es inversa a la unión (*Nielson y*

Winge, 1983).

Las MT se han aislado de gran cantidad de tejidos. Los más estudiados han sido a partir de hígado, riñón e intestino. Aunque gran parte del interés de la MT ha sido debido a su relación con la toxicidad por Cd, la MT se ha mostrado como una proteína con contenido predominante de Zn cuando se ha aislado del hígado del adulto (*Buhler y Kägi, 1974*). El hecho de que la MT una Zn y Cu bajo condiciones fisiológicas sugiere que se halla involucrada en el metabolismo de ambos metales (*Dunn et al., 1987*).

1.6.2. FUNCIONES BIOLÓGICAS

La MT actúa como donador de iones de Zn y Cu a las apometaloproteínas. La MT unida a Zn reactiva formas apo de anhidrasa carbónica (*Li et al., 1980*), fosfatasa alcalina y aldolasa (*Udom y Brady, 1980*), y la MT unida a Cu reactiva formas apo de tirosinasa y hemocianina (*Beltramini y Lerch, 1983*).

Las principales funciones de la MT están relacionadas con el metabolismo de los metales. Estas funciones comprenden la detoxificación y el almacenamiento de metales pesados y la regulación del metabolismo del Zn y Cu celulares en respuesta a cambios fisiológicos y de la dieta. Así pues, la MT podría tener un papel citoprotector frente a metales debido a su función relacionada con la unión a metales y detoxificación (*Dunn et al., 1987*).

Asimismo, la MT presenta funciones en el control del desarrollo fetal y la adaptación celular a varios tipos de estrés. Además, otra importante función de la MT es su participación en los mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo como *scavenger* de los radicales

INTRODUCCIÓN

libres (*Dunn et al., 1987; Hidalgo et al., 1988*). Durante un período de estrés se incrementan las necesidades de MT debido al aumento de la actividad de muchas metaloenzimas. La MT encajaría de este modo en el armazón del proceso de defensa del organismo. La donación de metales a membranas celulares es también una posible función dentro de este contexto (*Hidalgo et al., 1988*).

Es interesante resaltar el papel, antes mencionado, que presenta la MT al formar parte de los sistemas de defensa que previenen el daño tisular producido por los radicales libres de oxígeno. Estos sistemas incluyen antioxidantes específicos como la catalasa para el peróxido de hidrógeno, la SOD para el superóxido, glutathion peroxidases para el peróxido de hidrógeno y peróxido lipídico, y antioxidantes no específicos como el glutathion reducido, la CP y la transferrina. El interés de la MT como antioxidante radica en su posible papel de *scavenger* específico de los radicales superóxido (O_2^-) e hidroxilo (OH), una de las especies de oxígeno activo más potentes (*Hidalgo et al., 1988; Sato y Bremner, 1993*).

Es este sentido, en experimentos realizados con ratones MT-I/II knockout (MT-null) a los que se les administró paracetamol se observó que éstos eran más susceptibles a padecer lesión hepática que los ratones del grupo control. El pretratamiento con Zn, un método de inducción de MT, protegió contra la hepatotoxicidad del paracetamol a los ratones controles y no a los ratones MT-null. La administración de paracetamol produjo en los ratones MT-null más peroxidación lipídica que en los ratones control, evidenciada mediante el incremento de las sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS), es decir, los hepatocitos de los

INTRODUCCIÓN

ratones MT-null fueron más susceptibles al estrés oxidativo. Este estudio demostró que el déficit de MT hace a los animales más vulnerables a la hepatotoxicidad inducida por paracetamol y este incremento de la sensibilidad parece estar asociada con el papel antioxidante de la MT (*Liu et al., 1999*). Por el contrario, el fenómeno de *MT-overexpression* disminuye la citotoxicidad al reducir la oxidación intracelular. Este fenómeno puede tener importancia durante la quimioterapia anticancerosa ya que se ha observado *MT-overexpression* en células tumorales humanas con resistencia adquirida a los quimioterápicos (*Lazo et al., 1998*). Asimismo, experimentos realizados en ratones transgénicos con *MT-overexpression* a los cuales se les indujo un da_0 en las células β pancreáticas mediante la administración de estreptozotocina mostraron una reducción significativa de la hiperglucemia (*Chen et al., 2001*).

1.6.3. METABOLISMO Y REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE MT

La biosíntesis de MT está controlada por procesos más o menos complejos que implican a iones metálicos, hormonas y otros factores (*Dunn et al., 1987*).

1.6.3.1. METALES

La MT es una proteína inducible por metales. Metales pesados como Cd, Zn, Cu, y Hg inducen la síntesis de la apoproteína (tioneína) y se unen a ella. La MT-Cd o MT-Cu inducidas contienen frecuentemente no sólo Cd o Cu sino también Zn como metal secundario.

INTRODUCCIÓN

Otros metales traza como Co, Ni, Mn, Cr y Fe inducen la síntesis de MT pero no se unen a ella, siendo el Zn el metal más usualmente unido a la proteína (*Sato y Bremner, 1993*).

La inducción de la síntesis de MT por metales pesados se ha demostrado en varios tejidos. La administración parenteral o enteral de varios metales, incluyendo Cd, Zn, Cu, Hg, Au y Bi, induce la síntesis de MT en intestino, hígado, ri_ón y páncreas (*Cousins, 1985; Bremner y Beattie, 1990; Sato y Bremner, 1993; Saito et al., 1999*). Cuando el Zn o el Cu de la dieta es elevado, la inducción de MT aparece en primer lugar en el hígado e intestino, seguida por un incremento del acúmulo de estos metales en ambos tejidos (*Dunn et al., 1987*). Los incrementos en la concentración de Zn de la dieta pueden alterar la MT hepática unida a Zn. La MT es entonces sintetizada rápidamente para contrarrestar acciones potencialmente nocivas del Zn (*Richards y Cousins, 1976^a*).

El Cu u otros metales pueden reemplazar al Zn en la molécula de MT. De ese modo, el Zn liberado activa al promotor del gen de la MT para aumentar su transcripción (*Cousins, 1985*). La administración en animales de Zn, Cu o Cd incrementa la transcripción del gen e incrementa la producción de mRNA-MT y, por consiguiente, la síntesis de MT (*Durnam y Palmiter, 1981; Bremner y Morrison, 1986*). El Cd es el inductor más potente y, comparado con el Cd y el Zn, el Cu es relativamente un inductor más débil de la síntesis de MT hepática (*Brenner y Beattie, 1990*).

En este sentido, y dado que la síntesis de MT es inducible por metales, una de las funciones biológicas que se han propuesto para la MT es la protección del organismo contra el

daño celular resultante de la administración de estos metales (*Piscator, 1964*).

1.6.3.2. HORMONAS Y FACTORES DE ESTRÉS

La síntesis de MT también es inducida por hormonas, entre ellas glucocorticoides, glucagón y epinefrina y también por otros factores que incluyen cAMP, interferón e interleukina-1 (IL-1). Diversas situaciones de estrés como la restricción alimentaria, la limitación física y el daño tisular causado por agentes inflamatorios o endotoxinas bacterianas también inducen la síntesis de MT (*Dunn et al., 1987*). Se ha sugerido que la IL-1, la cual es producida y liberada por los monocitos y macrófagos en respuesta a la infección, estimula la síntesis de MT y la incorporación de Zn al hígado. Según algunos autores, los glucocorticoides pueden actuar como mediadores en la inducción, estimulada por citoquinas, de MT, dado que la IL-1 causa la liberación de estas hormonas mediante la estimulación de la liberación de ACTH (*Bremner y Beattie, 1990*). La infección bacteriana incrementa la síntesis de MT hepática y disminuye la concentración de Zn en suero, características ambas de una respuesta de fase aguda (*Bremner y Beattie, 1990*). En este sentido, en experimentos realizados en ratones los cuales inhalaban endotoxina se observó un incremento en la concentración de MT tanto en hígado como en pulmones y tejidos de las vías aéreas, lo cual sugiere, según algunos autores, que la inducción del gen de la MT y el incremento en la concentración de la misma podrían desempeñar un papel en la protección del organismo frente a la inhalación ocupacional de endotoxina (*Hur et al., 1999*). Además, otros

INTRODUCCIÓN

compuestos como el etanol, la indometacina y los agentes alquilantes también pueden inducir la síntesis de MT (*Sato y Bremner, 1993*).

Por lo que respecta a la inducción de la síntesis de MT mediante estrés físico, la exposición a un entorno frío, el ejercicio extenuante, el sometimiento a una laparotomía y la intoxicación por tetracloruro de carbono incrementan la síntesis de MT hepática y renal. La inducción de la síntesis de MT en estos casos probablemente sea mediada por hormonas, factores de crecimiento u otros agentes. Asimismo, la exposición a rayos X, radiación UV y tensiones de oxígeno elevadas también incrementa la concentración de MT en hígado, riñón y otros órganos (*Sato y Bremner, 1993*). Muchos de los inductores del estrés también incrementan a su vez los niveles circulantes de glucocorticoides, los cuales estimulan la síntesis de MT en el hígado y, en menor medida, en el corazón, riñón, músculo esquelético y bazo. Las catecolaminas también inducen la síntesis de MT (*Bremner y Beattie, 1990*). En la Tabla VII se describen una serie de factores y condiciones experimentales que inducen la síntesis de MT.

Tabla VII. Factores y condiciones que inducen la síntesis de MT.

• Factores físicos	• Fármacos	• Otros
Tensión elevada de oxígeno	Paracetamol	Ácido ascórbico
Rayos X	Adriamicina	Carragenina
Rayos UV	Bleomicina	Endotoxinas
Exposición al calor	Cefaloridina	Estreptozotocina
	Cisplatino	Ayuno
• Agentes alquilantes	Menadiona	Ejercicio

INTRODUCCIÓN

Bromobenceno	Metronidazol
Diamida	
Dietilmaleato	• Herbicidas
Iodoacetato	Paraquat
Iodometano	Diquat
• Citoquinas	• Solventes
Interleukina 1	Tetracloruro de carbono
Interferon	Cloroformo
Factor de necrosis tumoral	Etanol

Sin embargo, aunque la concentración de metales pesados es el determinante principal sobre los niveles tisulares de MT, la inducción de la síntesis de MT también ocurre en respuesta a diversos estímulos químicos. La administración de solventes orgánicos como el tetracloruro de carbono, cloroformo y etanol incrementan la síntesis hepática de MT así como la administración de fármacos como el paracetamol, menadiona y cefaloridina. También la administración de fármacos como la bleomicina, adriamicina y cisplatino incrementan la síntesis de MT aunque probablemente este incremento de la síntesis de MT sea a causa de la acción generadora de radicales libres que presentan estas drogas. En este sentido, se han descrito, además, diversos compuestos que producen estrés oxidativo y consecuentemente incrementan la síntesis de MT, principalmente hepática, como son el paraquat, adriamicina y cisplatino (Sato y Bremner, 1993).

Por otro lado, citoquinas como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interleukinas 1 y 6 e interferon, secretados durante la respuesta inmune y/o inflamatoria, son mediadores de

INTRODUCCIÓN

la síntesis hepática de proteínas de fase aguda, inducen la formación de radicales superóxido e inducen la síntesis de MT y la incorporación de Zn al hígado. En este contexto y bajo una situación de incremento de la formación de radicales libres de oxígeno puede existir un aumento de la síntesis de MT. De este modo, la síntesis de MT es inducida por exposición a generadores de radicales de oxígeno externos y sustancias internas que promueven la producción de radicales libres (*Cherian y Chan, 1993; Sato y Bremner, 1993*). El estrés oxidativo incrementa la peroxidación lipídica y el subsecuente daño tisular mediante la producción de radicales libres. La MT puede ser inducida en respuesta al estrés oxidativo y su función podría ser la protección de los tejidos ante el daño tisular. De hecho, según algunos autores, la concentración hepática de MT inducida por generadores de radicales de oxígeno se correlaciona bien con los niveles de peróxidos lipídicos, evaluados mediante la medición de las TBARS (*Sato y Bremner, 1993*). Así, estos mismos autores sugieren que la MT actúa a la vez como un *scavenger* de radicales libres y como un donante de Zn para las enzimas reparadoras de ADN (*Sato y Bremner, 1993*). En este sentido, la administración de interleukina-1 (IL-1) en ratas incrementa significativamente los niveles de mRNA de MT hepática, acompañado de un incremento de la MT e hipozinquemia. La inducción de MT en respuesta a IL-1 sugiere que este agente podría jugar un importante papel incrementando los niveles de MT en ciertos tejidos como parte del mecanismo de defensa del organismo (*Di Silvestro y Cousins, 1984*).

1.6.3.3. DEGRADACIÓN

La MT tiene un catabolismo rápido. Experimentos de repleción-depleción de Zn en ratas demuestran que 24 horas son suficientes para disminuir hasta niveles insignificantes un pool considerable de MT unida a Zn (*Richards y Cousins, 1976^b*). El lisosoma podría ser el lugar principal de la degradación de la MT, siendo la vida media ($T_{1/2}$) de la MT hepática inducida por Zn entre 18 y 20 horas (*Feldman y Cousins, 1976*). Por su lado, la $T_{1/2}$ de la MT inducida por Cu es de 12-17 horas (*Bremner et al., 1978*).

1.7. CERULOPLASMINA

1.7.1. PROPIEDADES

La Ceruloplasmina (CP) es una α_2 -glicoproteína con un PM de 136000 Da formada por una cadena polipeptídica que contiene 6 átomos de Cu por molécula. La CP contiene un 7-8% de carbohidratos como cadenas terminales de ácido siálico unidas al polipéptido. La cadena polipeptídica la constituyen 3 fragmentos de polipéptidos con un PM de 67000, 50000 y 19000 Da (*Silverman y Christenson, 1994*). Con un punto isoeléctrico (pI) de 4.4, la CP migra hacia la región α_2 en la electroforesis en gel de agarosa o celulosa (*Patel y Lott, 1984*).

1.7.2. FUNCIONES BIOLÓGICAS

La CP transporta al 90% del Cu en el plasma y es una proteína de fase aguda. La concentración de CP se incrementa durante la infección, inflamación o necrosis (*Iskra y Majewski, 1999*). Las principales funciones de la CP son: 1) oxidación de Fe^{2+} cuando éste es liberado de los hepatocitos y convertido en Fe^{3+} -transferrina en la regulación de la movilización del hierro hepático; 2) transporte de Cu a los tejidos; 3) actividad antioxidativa en el suero, actuando de hecho como *scavenger* de radicales libres e iones superóxido; 4) modulación endógena de la respuesta inflamatoria; y 5) actividad oxidasa para las aminas aromáticas (*Goldstein et al., 1979*).

Dado que la CP representa el 90% del contenido de Cu del suero, podría considerársela como fuente primaria de Cu para los tejidos extrahepáticos. Se ha propuesto que la CP-Cu²⁺ es reducida en un receptor de la membrana celular, siendo entonces el Cu⁺ transferido a un aceptor intracelular no identificado. Alternativamente, la CP intacta puede ser absorbida por endocitosis, y el Cu⁺ puede ser entonces liberado por proteólisis o un mecanismo que recicla la proteína a la membrana plasmática. El resultado de la entrada de Cu a las células podría ser que el Cu⁺ es oxidativamente transferido a apoenzimas (*Cousins, 1985*).

La función de la CP como antioxidante es una hipótesis atractiva, porque la generación de productos de oxidación, incluyendo $\cdot\text{O}_2^-$ y H_2O_2 , está asociada con condiciones que incrementan los niveles de CP (*Cousins, 1985*).

La actividad antioxidante del plasma se ha relacionado con la CP, demostrándose que ésta puede actuar como *scavenger* de radicales superóxido (*Goldstein et al., 1979*). Dado que la CP es extracelular y la SOD es, en principio, intracelular, la CP podría ser un *scavenger* principal en el plasma, particularmente cuando su concentración es elevada. Así pues, la CP probablemente interviene en el sistema de defensa del organismo debido a sus propiedades como *scavenger* de radicales y donante de Cu (*Cousins, 1985*).

1.7.3. METABOLISMO

La CP se sintetiza principalmente en el hígado en forma de polipéptido de cadena

INTRODUCCIÓN

simple y, después de la incorporación de 6 átomos de Cu, es secretada al plasma como una α_2 -glicoproteína (Daimon, 1998). Los factores hormonales que muestran influencia en la producción de CP por parte del hígado son variados, tal como se muestra en la Fig.3. La expresión del gen de la CP puede ser regulado por estímulos fisiológicos y farmacológicos. La síntesis y la secreción de CP se alteran por la presencia de inflamación, acción de diversas hormonas y Cu. La síntesis de CP implica únicamente a polirribosomas unidos a la membrana. La secreción de CP como un polipéptido simple de 132.000 Da y el concomitante cambio en el contenido plasmático de Cu se ve incrementada por glucocorticoides y, en menor medida, por estrógenos y testosterona (Cousins, 1985).

Las concentraciones en plasma de CP pueden incrementarse por la presencia de daño tisular, inflamación aguda localizada, infección y enfermedades inflamatorias crónicas. En la Tabla VIII se muestra una lista de los factores fisiológicos y condiciones experimentales que incrementan los niveles de CP en plasma. En este sentido, se han observado incrementos en los valores de CP en enfermedades infecciosas como la tuberculosis y la infección aguda respiratoria alta; enfermedades del colágeno como la artritis reumatoide y el lupus eritematoso sistémico; neoplasias, obstrucción biliar, anemia y la administración de estrógenos. En este contexto, probablemente la CP interviene en un papel de defensa del organismo, debido a sus propiedades como *scavenger* de radicales y donante de Cu (Cousins, 1985).

Tabla VIII. Inductores de CP

NATURALES	EXPERIMENTALES
Cáncer	ACTH
Desarrollo	Ácido retinoico
Ejercicio	Artritis
Embarazo	Carragenina
Inflamación crónica	Cobre
Hiperglucemia	Endotoxina
Infección	Epinefrina
Colagenosis	Estrógenos
Anemia	Glucocorticoides
	Inflamación
	IL-1
	Turpentina
	Zinc

Por el contrario, las concentraciones de CP plasmática disminuyen en la enfermedad de Wilson, el síndrome de Menkes, el déficit hereditario de CP, insuficiencia hepática, gastroenteropatías con depleción de proteínas y síndrome nefrótico severo (*Daimon et al., 1998*).

En cuanto al papel hormonal, la secreción de CP, con el consiguiente cambio en el contenido de Cu plasmático, está incrementada por los glucocorticoides, los cuales a su vez, también incrementan la secreción hepática de Cu. En este sentido, se ha propuesto que cualquier cambio en la CP relacionado con el estrés implica a los esteroides adrenales (*Cousins, 1985*).

INTRODUCCIÓN

Los estrógenos y la progesterona también incrementan, aunque en menor medida, la secreción de CP (*Cousins, 1985*). Se ha observado correlación entre el embarazo y niveles elevados de CP (*Speich, 1990*). Niveles elevados de testosterona en humanos se han correlacionado con un incremento de la CP en suero. La regulación de la síntesis y secreción de CP por los glucocorticoides es similar al de otras proteínas de fase aguda. El ejercicio físico también incrementa los niveles séricos de CP mediante el incremento de los niveles plasmáticos de epinefrina y la producción de IL-1, la cual puede incrementar los niveles de CP (*Cousins, 1985*). Asimismo, se han descrito incrementos de los niveles de CP en suero en pacientes con DM 2 posiblemente debidos a la hiperglucemia que presentan estos enfermos (*Daimon, 1998*).

3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se diseñó un estudio de casos y controles realizado a partir de un estudio transversal.

El diseño comprende tres fases:

Fase I. Obtención de muestras de una población control representativa de nuestro medio.

Fase II. Obtención de muestras de una población afecta de DM 2 para el estudio de los niveles de Zn, Cu, MT y CP.

Fase III. Estudio de asociación entre las variables clínico-metabólicas de los dos grupos de población analizados.

El tamaño de la muestra se calculó en base a la probabilidad de obtener una diferencia bilateral entre las medias de los parámetros de cada grupo de 10 unidades, con un poder estadístico del 80% y un nivel de confianza del 95%.

3.2. SUJETOS MOTIVO DEL ESTUDIO

3.2.1. POBLACIÓN CONTROL

La selección del grupo control se realizó a partir de voluntarios aparentemente sanos, residentes en Tarragona. Los criterios de selección fueron los siguientes:

- 1- Edad comprendida entre 35 y 65 años.
- 2- Historia clínica negativa de enfermedad crónica y/o patología aguda conocida en el momento de su inclusión en el estudio.
- 3- Exploración física normal.
- 4- Glucemia basal < 110 mg/dL.
- 5- Ausencia de tratamiento con fármacos durante los tres meses previos al estudio.
- 6- Ausencia de antecedentes familiares de 1^{er} y 2^o grado de DM 2.

Con los mencionados criterios se incluyeron un total de 210 individuos (99 hombres y 111 mujeres) en el grupo control.

3.2.2. POBLACIÓN CON DM 2

La selección del grupo DM 2 se realizó mediante muestreo no probabilístico consecutivo entre pacientes afectos de DM 2, visitados en las Unidades de Endocrinología de los hospitales de Sant Pau i Santa Tecla y Joan XXIII de Tarragona en el periodo comprendido entre los meses de Enero a Diciembre de 1992. Todos los pacientes incluidos cumplían exactamente los criterios de selección, que fueron los siguientes:

- 1- Diagnóstico de DM 2 de acuerdo con los criterios del National Diabetes Data ~~Group~~ (NDDG 1979).
- 2- Edad comprendida entre 35 y 65 años.
- 3- Tiempo de evolución de la DM 2 inferior a 10 años.
- 4- Tratamiento exclusivo con dieta. En ningún caso se aceptó tratamiento insulínico o con hipoglucemiantes orales en el momento de su inclusión en el estudio.
- 5- Ausencia de complicaciones de la DM 2 en el momento de su inclusión en el estudio.

Con los mencionados criterios se incluyeron un total de 170 individuos (71 hombres y 99 mujeres) en el grupo DM 2.

3.3. RECOGIDA DE DATOS

3.3.1. POBLACIÓN CONTROL. DATOS CLÍNICOS Y METABÓLICOS

- 1- Datos de filiación (nombre, dirección y teléfono).
- 2- Edad
- 3- Sexo
- 4- Peso
- 5- Talla
- 6- Índice de Masa Corporal (IMC)
- 7- Glucemia basal
- 8- Zn en suero, orina y hematíes.
- 9- Cu en suero, orina y hematíes.
- 10- MT en suero, orina y hematíes.
- 11- CP en suero.

3.3.2. PACIENTES CON DM 2. DATOS CLÍNICOS Y METABÓLICOS

A los datos clínicos utilizados para el grupo control, se añadió el tiempo de evolución de la DM 2 desde su diagnóstico y a los datos metabólicos del grupo control se añadió la determinación de hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}).

- 1- Datos de filiación (nombre, dirección y teléfono).
- 2- Edad
- 3- Sexo
- 4- Peso
- 5- Talla
- 6- Índice de Masa Corporal (IMC)
- 7- Tiempo de evolución de la DM 2
- 8- Glucemia basal
- 9-HbA_{1c}
- 10- Zn en suero, orina y hematíes.
- 11- Cu en suero, orina y hematíes.
- 12- MT en suero, orina y hematíes.
- 13- CP en suero.

3.4. PROTOCOLO DE ESTUDIO

Previa información y consentimiento de los pacientes y controles se procedió a la determinación, a primera hora de la mañana, del peso y la talla de cada sujeto, así como una extracción de sangre previo ayuno mínimo de 12 horas.

3.4.1. EXTRACCIÓN SANGUÍNEA

La obtención de las muestras sanguíneas se realizó mediante una única punción en la vena antecubital obteniéndose sangre venosa en las siguientes condiciones:

- 5 mL se recogieron en un tubo con gelatina y paredes siliconadas para la obtención de suero.
- 5 mL en una jeringa conteniendo heparina al 1% para la obtención de hematíes.

3.4.1.1. OBTENCIÓN DEL SUERO

Se dejó reposar la muestra de sangre a temperatura ambiente durante 1-2 horas hasta la completa retracción del coágulo. A continuación, se centrifugó durante 10 minutos a 2000-3000 rpm con el fin de obtener la separación óptima del suero y los hematíes en dos fases, aisladas por una capa de gelosa inerte, la cual permite una mayor estabilidad de los componentes séricos.

3.4.1.2. OBTENCIÓN DEL HEMOLIZADO

Las muestras de sangre obtenidas en la jeringa con heparina se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos para separar las células del plasma. Se añadió a las células un volumen igual de NaCl 0,9% a 4°C y se mezcló varias veces, después de lo cual se centrifugaron los tubos, repitiéndose este procedimiento dos veces. Los hematíes así lavados fueron lisados añadiendo H₂O destilada en proporción 1:1. Las muestras se conservaron a -40°C hasta el momento de efectuar las determinaciones pertinentes.

3.4.2. OBTENCIÓN DE LA ORINA

Se utilizó la orina de la primera micción de la mañana, recogida en un recipiente estéril de plástico. Se centrifugó a 1500 rpm y se recogió el sobrenadante. El sobrenadante se congeló a -40°C hasta el momento de las determinaciones analíticas.

3.5. MÉTODOS ANALÍTICOS

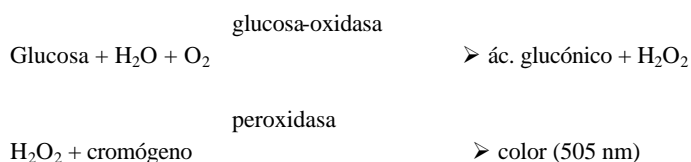
3.5.1. ÍNDICE DE MASA CORPORAL

El Índice de Masa Corporal (IMC) equivalente al índice de Quetelet (*Quetelet, 1869*) es un parámetro clínico que está en función del peso y la talla del individuo. Se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\text{IMC} = \frac{\text{Peso en Kg}}{(\text{Talla en m})^2}$$

3.5.2. DETERMINACIÓN DE LA GLUCEMIA

La determinación de la glucemia en el suero se realizó en un autoanalizador Cobas-Mira (Roche[®], Basilea, Suiza) mediante el método enzimático-colorimétrico de la glucosa-oxidasa a punto final, con liberación de peróxido de hidrógeno, el cual, tras su reacción con el cromógeno fenol + 4-aminoantipirina proporciona el compuesto coloreado quinoneimina que absorbe a 505 nm (*Trinder, 1969*). El fundamento de la reacción es el siguiente:



3.5.3. HEMOGLOBINA GLICOSILADA

La hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}) se determinó por cromatografía de alta resolución (HPLC) en un cromatógrafo Hi-Auto A1_c Analyzer[®], modelo HA-8121 (Kyoto Daiichi, Japón). La fracción HbA_{1c} indica las concentraciones medias de glucosa durante el ciclo vital de los hematíes.

El autoanizador consta de una columna empaquetada con un tipo de gel constituido por partículas porosas de copolímeros de metacrilato, transportando un grupo hidrofóbico y un grupo de intercambio iónico en la superficie del gel. El mecanismo de separación de la HbA_{1c} se basa en el principio de cromatografía de intercambio catiónico, previa dilución de la muestra a 48⁰C con una solución de hemólisis incorporada al cromatógrafo. Esta solución de hemólisis está constituida por tetrapolifosfato (TPP), un fosfato inorgánico que cuando se calienta a 48⁰C durante 2 minutos y a pH 6.0 elimina la fracción HbA_{1c} lábil. Posteriormente la muestra pasa a una columna termostaticada a 40⁰C donde tiene lugar la separación cromatográfica. Se efectúa la lectura de las fracciones eluidas (HbA_{1c}, HbA₁ y HbF), por cada uno de los tres eluyentes incorporados a 2 longitudes de onda: 415 y 500 nm mediante un fotómetro de doble longitud de onda, el cual permite eliminar automáticamente las interferencias debido a impurezas o a los efectos de dispersión de la luz. Un microprocesador

MÉTODOS

procesa los resultados en tiempo de elución, área del eluído y porcentaje de cada una de las hemoglobinas.

Los coeficientes de variación intra e inter-ensayo fueron 1,01% y 1,64%, respectivamente. Los valores de normalidad se sitúan entre 6-8%.

3.5.4. ANÁLISIS DE ZINC Y COBRE

3.5.4.1. SUERO

Se recogieron alícuotas de 200 μ L y se enrasaron hasta 2 mL con agua bidestilada. El agua empleada en estas técnicas es bidestilada. Con el fin de eliminar cualquier traza de metales, todo el material empleado en la manipulación de las muestras está lavado al ácido o se trata de material de un sólo uso.

3.5.4.2. HEMOLIZADOS Y ORINA. DIGESTIÓN ÁCIDA

Para llevar a cabo la mineralización se utilizó la digestión húmeda con ácido nítrico (65%). El ácido nítrico fue seleccionado como agente oxidante por su efectividad para disolver la materia orgánica y minimizar así las posibles interferencias producidas por la presencia de residuos orgánicos.

3.5.4.2.a. Hemolizados

- 0,5 mL de hemolizado + 2 mL HNO₃

MÉTODOS

- Predigestión en campana de extracción de gases, a temperatura ambiente, durante 24h.
- Colocación de las muestras en el digestor a 135⁰C durante 2-3 h. Finalizado este ciclo, aumento a 180⁰C durante un tiempo no inferior a 3-4 h. Comprobada la transparencia de la digestión aumento a 200⁰C durante 30 min.
- Añadir 5 mL de HNO₃ al 0,5%

3.5.4.2.b. Orina

- 1 mL de orina + 2 mL HNO₃
- Idéntico procedimiento al seguido en los hemolizados

3.5.4.3. DETERMINACIÓN DE ZINC Y COBRE**• 3.5.4.3.a. Zn**

- **Blancos:** solución al 5% de glicerina pura (suero) y HNO₃ al 0,5% (digestiones).
- **Solución madre:** 1 mg/mL de Zn. Disolución de 1 g de Zn metálico en 20 mL de HCl 6N. Diluir hasta 1000 mL con agua bidestilada.
- **Standards:** se preparan a una concentración de 50 µg/dL (S₁) y 100 µg/dL (S₂).

• 3.5.4.3.b. Cu

- **Blancos:** agua bidestilada (suero) y HNO₃ al 0,5% (digestiones).
- **Solución madre:** 1 mg/mL de Cu. Disolución de 1 g de Cu en 20 mL de HNO₃. Diluir hasta 1000 mL con agua bidestilada.

MÉTODOS

- **Standards:** se preparan a una concentración de 50 µg/dL (S₁) y 100 µg/dL (S₂).

Las determinaciones de Zn y Cu en suero, orina y hematíes se realizaron mediante espectroscopía de emisión atómica de inducción por plasma (ICP-Termo Jarrell ASH, PolyScan 61E) en el Servei Tècnic de la Universidad de Barcelona.

Los valores de las determinaciones realizadas en orina (Zn, Cu y MT) se expresan ajustados a la concentración urinaria de creatinina, donde la concentración del soluto ($[M]_u$) es corregida según la concentración de creatinina de la misma muestra ($[C]_u$). Así, M ajustado = $[M]_u/[C]_u$ (Bleiler y Schedle, 1962).

Con el fin de valorar la exactitud se utilizó un patrón internacional de referencia de la National Bureau Standards (NBS 1577 Bovine Liver) obteniéndose una recuperación de al menos un 90% de los metales analizados.

3.5.5. DETERMINACIÓN DE METALOTIONEÍNA

Las concentraciones de MT en suero, orina y hematíes se determinaron mediante un método de RIA desarrollado por Folch y colaboradores (Folch *et al.*, 1992).

3.5.5.1. OBTENCIÓN DEL ANTISUERO ANTI-MT

Como en cualquier técnica de RIA se necesita una molécula capaz de interaccionar

MÉTODOS

con el metabolito problema con el fin de hacer más evidente la molécula que se quiere cuantificar. En éste tipo de técnicas esta molécula es un antisuero policlonal específico frente a la MT, del tipo IgG obtenida por inmunización a conejos tratados con un conjugado de MT e IgG bovina (*Vander Mallie y Garvey, 1979; Sobocinski y Canterbury, 1982*). Al combinarse este anticuerpo con la MT de la muestra se produce un complejo MT-anti MT de PM elevado, para, en una segunda fase del ensayo, ser capaz de unirse a un agente precipitante tipo PEG, y debido al gran PM del conjugado, poder ser separado por técnicas de precipitación y detectarlo mediante un trazador radioactivo

Para la obtención de este anticuerpo, se emplearon los siguientes reactivos:

- MT I y II (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA).
- IgG bovina (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA).

Procedimiento:

- 1- Polimerización y conjugación de MT con IgG bovina y glutaraldehido.
- 2- Administración a conejos de la MT conjugada y emulsionada con coadyuvante completo de Freund.
- 3- Inyecciones de recuerdo: mismo protocolo que 1) y 2) cambiando a coadyuvante incompleto de Freund. Fechas de administración: 6, 15, 22 y 28 semanas.
- 4- Titulación de la producción de anticuerpos: extracciones de sangre a los conejos las semanas: 13, 18, 24, 26 y 29.

3.5.5.2. MARCAJE DE LA MT CON ^{125}I

Para la obtención de este trazador es necesario MT pura (isoformas I y II) y reactivo de Bolton-Hunter (N-succimidil-3-4-hidroxi-5- ^{125}I -iodo-fenil-propionato, Amersham IM5861) donador de ^{125}I de una actividad de 2000 Ci/mmol (*Vander Mallie y Garvey, 1979*). Para obtener el trazador radioactivo se siguió el siguiente proceso:

- 1- Evaporar bajo N_2 el reactivo de Bolton-Hunter (500 μCi).
- 2- Añadir 5 μg de MT en 10 μL de tampón borato 0,1 M, pH 8,5.
- 3- Incubar 60 minutos en baño de hielo con agitación.
- 4- Añadir 0,25 ml de glicina 0,4 M en tampón borato 0,1M, pH 8,5.
- 5- Incubar 5 minutos en baño de hielo con agitación.
- 6- Añadir 0,25 mL de tampón gelatina.
- 7- Purificación del trazador mediante separación cromatográfica a través de una columna de Sephadex G-10 (20 x 0,6 cm), lavada y eluída con tampón gelatina.
- 8- Recoger fracciones de 0,3 mL.
- 9- Contar la radioactividad de estas fracciones.
- 10- Reunir fracciones de los eluatos de la MT marcada.

3.5.5.3. PROTOCOLO DE RIA

Para la técnica de RIA, se siguieron las pautas generales descritas en la literatura

MÉTODOS

(*Vander Mallie y Garvey, 1979; Mehra y Bremner, 1984; Leibrandt et al., 1991*). En las pruebas de optimización preliminares en estos tipos de RIA se obtuvieron los mejores resultados empleando PEG como agente precipitante que confería unos valores mínimos de unión inespecífica en los tubos blanco de reacción y una unión máxima para la recuperación del complejo radiactivo precipitado. Todo el proceso se realizó a 4⁰C, con el fin de no alterar las propiedades inmunológicas de los anticuerpos (*Vander Mallie y Garvey, 1979; Sobocinski y Canterbury, 1982*).

- a.- En una 1^a fase se procedió a la descongelación, en baño de hielo, de muestras y anticuerpos.
- b.- Diluciones de los sueros, orinas y hemolizados a 1/2, 1/5 y 1/10.
- c.- Montaje de la curva standard:

Se parte de una solución madre de MT de 1 mg/mL. Mediante diluciones se elaboran los puntos de la curva de desplazamiento: 10, 27, 72.4, 195, 524, 1445, 3890, 10471, 28183 y 75812 pg MT/tubo. En la figura 5 se representa gráficamente una curva de desplazamiento típica del método desarrollado. Se representa en el eje de abcisas el logaritmo de la concentración de MT (de 10 a 75812 pg MT/tubo) y en el eje de ordenadas el cociente $(B-N) \times 100 / B_0 - N$. El anticuerpo primario se añadió a una dilución de 1/1000:

- e.- Técnica propiamente dicha:

MÉTODOS

Se realizó por duplicado y con un volumen total de 0,4 mL/tubo.

- 1- Tampón de Tris-gelatina: 0,1mL de tampón Tris-HCl 50 mM, gelatina 0,1%, azida sódica 0,1%, pH 8,0.
- 2- 0,1 ml de muestra o 0,1 mL de la dilución del standard.
- 3- 0,1 mL de antisuero de conejo anti-MT en tampón Tris-gelatina al 1/500.
- 4- 0,1 mL de ¹²⁵I-MT (10.000 cpm) en tampón Tris-gelatina.
- 5- Incubación de 18 horas a 4⁰C.
- 6- Añadir 0,1 mL de polietilenglicol 6000 al 30% en tampón Tris-Gelatina.
- 7- Incubación de 15 minutos a 4⁰C.
- 8- Centrifugar a 5000 rpm, 30 minutos a 4⁰C.
- 9- Desechar el sobrenadante.
- 10- Añadir 0,2 mL de polietilenglicol 6000 al 15% en tampón gelatina.
- 11- Incubación de 5 minutos a 4⁰C.
- 12- Centrifugar a 5000 rpm 15 minutos a 4⁰C.
- 13- Desechar el sobrenadante.
- 14- Contar radioactividad del precipitado (Contador gamma, LKB).
- 15- Representación de la recta de desplazamiento: X= log MT; Y = log B/Bo

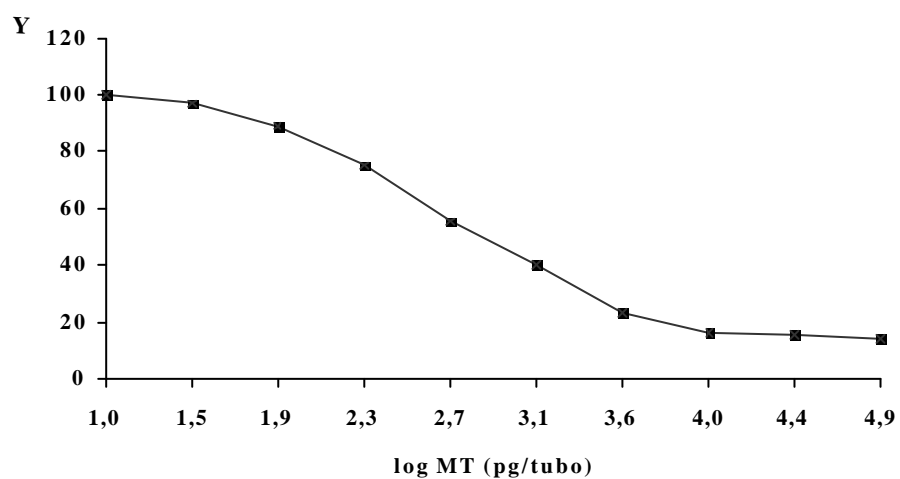
Para cada testaje se calcularon los parámetros de la recta standard, el punto de corte en el origen, la pendiente y el coeficiente de regresión. Los valores de MT se calcularon por interpolación a la recta siempre que $r > 0,95$. Con el fin de evitar la interferencia del ruido de

MÉTODOS

fondo en la determinación de MT se utilizaron los siguientes blancos:

- 1- 0,3 mL tampón Tris-gelatina + 0,1 mL ^{125}I -MT.
- 2- 0,2 mL tampón Tris-gelatina + 0,1 mL suero preimmune + 0,1 mL ^{125}I -MT.
- 3- 0,2 mL tampón Tris-gelatina + 0,1 mL suero inmune + 0,1 mL ^{125}I -MT (B_0).

Fig. 5. Representación gráfica semilogarítmica de la curva de desplazamiento de la MT

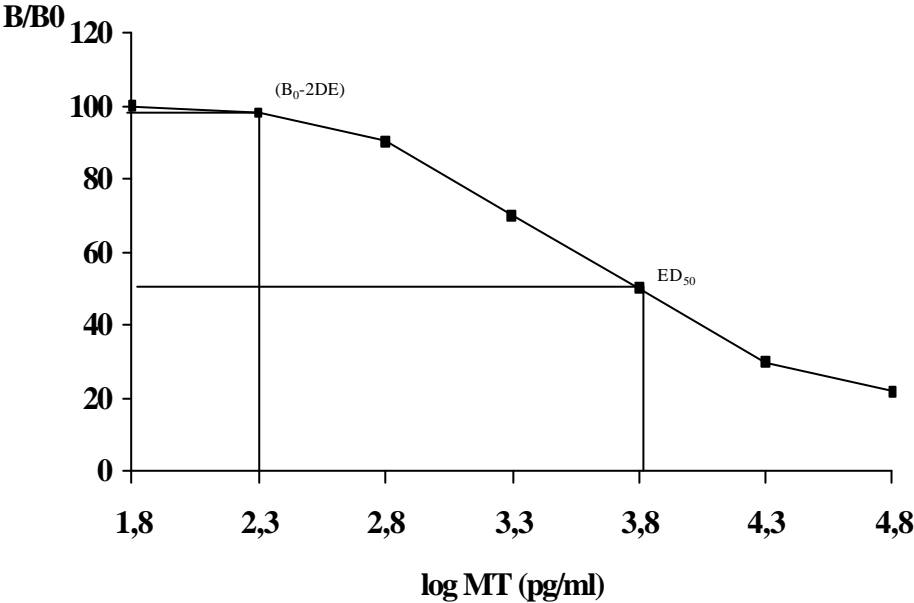


3.5.5.4. SENSIBILIDAD Y LÍMITES DE DETECCIÓN DEL RIA

La sensibilidad (ED_{50}) del ensayo queda definida como la concentración de MT que se corresponde con un 50% del cociente B/B_0 y tuvo un valor de 5,7 ng MT/mL con un intervalo lineal dosis-respuesta entre 0,7 y 20 ng MT/mL (Fig.6). Se considera el límite de detección (B_0-2DE) del ensayo como el valor interpolado correspondiente al B_0-2DE y tuvo un valor de 0,2 ng MT/mL (Fig.6).

Fig. 6. Límite de detección (B_0-2DE) y sensibilidad (ED_{50}) del método RIA para MT.

MÉTODOS



MÉTODOS**3.5.5.5. REPRODUCIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD DEL RIA**

Se valoró la reproducibilidad calculando el coeficiente de variación (CV) intraensayo, testando 20 veces 3 muestras de MT de diferentes concentraciones. Para la reproducibilidad interensayo se testaron durante 10 días consecutivos por triplicado. Se calculó el CV como $CV = DS/X \times 100$. En la Tabla IX se muestran los coeficientes de variación (CV) intra e inter ensayo en 3 puntos diferentes de la curva y en una muestra de hígado fetal. Se observa en todos los casos un mayor CV para los datos interensayo. La mayor variación en el interensayo se obtuvo al medir la concentración de MT en hígado fetal.

Tabla IX. Reproducibilidad del método de RIA.

MT ng MT/mL	INTRAENSAYO (CV) %	INTERENSAYO (CV) %
75	3,6	8,7
5,8	4,5	5,6
0,52	7	13
hígado fetal	8,2	11,4
N muestras	15	10

MÉTODOS

La especificidad se valoró testando la respuesta del método frente a diluciones seriadas de MT en tampón Tris-gelatina y frente a diluciones de albúmina e IgG bovina. Únicamente la MT desplazó al trazador, no apreciándose efecto matriz sobre el desplazamiento del trazador por la MT fría.

Se calculó el efecto de la composición de las muestras de suero, orina y hemolizado sobre el desplazamiento del trazador radioactivo, preparando varias curvas de MT standard a las cuales se les añadió 50 µL de suero humano, orina y hemolizado de hematíes humanos a distintas diluciones en tampón Tris-gelatina, determinando la concentración de MT por el método de RIA descrito.

3.5.6. DETERMINACIÓN DE CERULOPLASMINA

La ceruloplasmina (CP) en suero se determinó, en un autoanalizador Cobas-Mira (Roche[®], Basilea, Suiza), mediante la medición de su actividad oxidasa, en la cual el dihidrocloruro de o-dianisina se usa como sustrato (*Schosinsky et al., 1974*). El dihidrocloruro de o-dianisina se transforma, a pH 5, en un producto amarillo-marrón en presencia de ceruloplasmina y oxígeno. La acidificación detiene la reacción enzimática y se forma una solución rojo-púrpura estable con una absorbancia máxima a 540 nm.

Reactivos:

MÉTODOS

- Tampón acetato sódico 0,1 M, pH 5 (Acetato de sodio, CH_3COONa , Merck, Darmstadt, Alemania).
- o-Dianisina [o-Dianisina (3,3'-dimetoxibencidina, diclorhidrato, $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2 \cdot 2\text{HCl}$), Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA].
- Ácido sulfúrico 9 M (ácido sulfúrico 95-97%, Merck, Darmstadt, Alemania).

Procedimiento:

- 1- 150 μL de T.acetato
- 2- 10 μL suero
- 3- 40 μL o-dianisina
- 4- mezcla e incubación a 30°C
- 5- detención de la reacción a 5 y 15 min ac.sulfúrico
- 6- determinación de la D.O. a 540 nm frente a blanco de agua

3.5.6.1. CÁLCULO DE LA ACTIVIDAD CERULOPLASMINA OXIDASA

La actividad enzimática de la ceruloplasmina se expresa en Unidades Internacionales, en términos de sustrato consumido: $(A_{15} - A_5) \times 6,25 \times 10^2 \text{ U/L}$.

A_{15} y A_5 son las absorbancias a 15 y 5 minutos respectivamente. Se consideran valores normales a 60 - 140 U/L.

3.5.7. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

El análisis estadístico de los datos se realizó usando el paquete estadístico SPSS/PC+.

3.5.7.1. PRUEBAS ESTADÍSTICAS UTILIZADAS

- Pruebas de ajuste a la curva de Gauss de todas las variables: prueba de Shapiro-Wilks, para posteriormente aplicar la prueba correspondiente.

- Estadística descriptiva. Media y desviación standard, para las variables cuantitativas con distribución normal, mediana y desviación cuartil (definida como la mitad de la diferencia entre el percentil 75 y el percentil 25) para las variables cuantitativas con distribución no normal. Distribución de frecuencias para las variables cualitativas.

- Prueba t de Student-Fisher (previa comprobación de la homogeneidad de las variancias mediante la prueba F de Snedecor), o U de Mann-Whitney (no paramétrica). Para la comparación de medias de variables cuantitativas con dos categorías.

- Análisis de correlación y regresión múltiple. Coeficientes de correlación de Pearson.

MÉTODOS

- Estudio de regresión múltiple para identificar factores de confusión en las correlaciones significativas.
- Intervalo de confianza (IC) del 95% de la media. Calculado para interpretar la significación de un resultado. Indica en qué intervalo se encuentra el verdadero valor de la estimación de la media. Para alcanzar la significación estadística no deben contener el valor 0.
- El nivel de significación estadístico aceptado fue de $p < 0,05$.

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

Dado que:

- 1.- Tanto el Zn como el Cu tienen numerosas funciones biológicas.
- 2.- Los pacientes con DM 2 presentan alteraciones en las concentraciones de Zn y Cu en suero, orina y hematíes.
- 3.- La MT ejerce funciones de control y homeostasis celular del Zn y Cu, con implicaciones fisiológicas en la regulación y distribución de estos elementos traza.

Pensamos que:

El análisis de las determinaciones de MT en individuos con DM 2 resultará de interés en el estudio de las variaciones observadas en el status de Zn y Cu en esta población.

2.1. OBJETIVO PRINCIPAL

- 1.- Valorar la MT como indicador del status de Zn y Cu en el organismo en la DM 2.

2.2. OBJETIVOS SECUNDARIOS

- 1.- Determinar las concentraciones séricas de Zn, Cu, CP y MT en los grupos Control y DM 2.
- 2.- Determinar las concentraciones eritrocitarias de Zn, Cu y MT en los grupos Control y DM 2.
- 3.- Determinar el valor de la excreción urinaria de Zn, Cu y MT en los grupos Control y DM 2.
- 4.- Analizar las diferencias observadas entre el grupo Control y el grupo DM 2 en los mencionados parámetros.
- 5.- Analizar las relaciones entre los parámetros séricos, urinarios y eritrocitarios en el grupo Control y en el grupo DM 2.
- 6.- Analizar las relaciones entre estos últimos y los parámetros clínicos y metabólicos en ambos grupos.

RESULTADOS

4.1. DESCRIPCIÓN DEL GRUPO CONTROL

En la Tabla X se describe el número de individuos, el sexo, la media de la edad y del IMC, y los resultados de las determinaciones analíticas del grupo Control estudiado. Los valores se expresan como mediana (y desviación cuartil) para los parámetros con distribución no normal, y como media \pm desviación standard para aquellos con distribución normal.

En la Tabla XI se describen de manera separada los mismos parámetros arriba indicados en función del sexo. El subgrupo de mujeres del grupo Control presentó unos valores significativamente más altos que el subgrupo de hombres en las concentraciones de Cu en suero [$965,26 \pm 268,67$ vs $803,00$ (147,50) ng/mL ($p < 0,001$)], Cu en hematíes [2,10 (0,60) vs 1,42 (0,57) $\mu\text{g/g}$ Hb ($p < 0,001$)] y Cu en orina [$73,23 \pm 31,27$ vs $47,50$ (13,12) $\mu\text{g/g}$ creatinina ($p < 0,05$)]. No se observó ninguna otra diferencia en los valores de las determinaciones analíticas entre hombres y mujeres del grupo Control.

RESULTADOS

Tabla X. Parámetros clínicos y metabólicos del grupo Control. Los resultados se expresan como media \pm desviación standard o mediana (desviación cuartil).

	GRUPO CONTROL
N_ individuos	210
Edad (a_os)	51,77 \pm 9,09
Sexo (H/M)	(99/111)
IMC (Kg/m ²)	25,20 \pm 2,69
srm-Glucosa (mg/dL)	89,95 \pm 7,75
srm-Zn (ng/mL)	980,00 (111,87)
srm-Cu (ng/mL)	877,00 (173,00)
srm-MT (ng/mL)	37,20 (17,82)
srm-CP (U/L)	103,00 (12,00)
hem-Zn (μ g/g Hb)	12,00 (1,28)
hem-Cu (μ g/g Hb)	1,77 (0,62)
hem-MT (μ g/g Hb)	48,70 (45,32)

RESULTADOS

uri-Zn ($\mu\text{g/g}$ Creatinina)	430,00 (190,00)
uri-Cu ($\mu\text{g/g}$ Creatinina)	58,50 (25,00)
uri-MT ($\mu\text{g/g}$ Creatinina)	61,25 (58,20)

IMC: índice de masa corporal; **srm-Glucosa:** concentración de glucosa en suero; **srm-Zn:** concentración de zinc en suero; **srm-Cu:** concentración de Cu en suero; **srm-MT:** concentración de MT en suero; **srm-CP:** CP en suero; **hem-Zn:** Zn eritrocitario; **hem-Cu:** Cu eritrocitario; **hem-MT:** MT eritrocitaria; **uri-Zn:** excreción urinaria de Zn; **uri-Cu:** excreción urinaria de Cu; **uri-MT:** excreción urinaria de MT.

Tabla XI. Parámetros clínicos y metabólicos del grupo Control en función del sexo. Los resultados se expresan como media \pm desviación standard o mediana (desviación cuartil).

	HOMBRES	MUJERES
N_ individuos	99	111
Edad (a_os)	51,10 \pm 8,87	52,36 \pm 9,29
IMC (Kg/m^2)	25,12 \pm 1,91	25,28 \pm 3,23
srm-Glucosa (mg/dL)	89,67 \pm 6,93	90,21 \pm 8,43

RESULTADOS

srm-Zn (ng/mL)	984,16 ± 168,97	982,24 ± 179,17
srm-Cu (ng/mL)	803,00 (147,50)	965,26 ± 268,67 ^a
srm-MT (ng/mL)	43,60 (15,80)	36,90 (19,85)
srm-CP (U/L)	97,45 ± 19,77	105,13 ± 17,58 ^b
hem-Zn (µg/g Hb)	12,52 (1,24)	11,81 (0,85) ^c
hem-Cu (µg/g Hb)	1,42 (0,57)	2,10 (0,60) ^a
hem-MT (µg/g Hb)	45,20 (30,05)	66,30 (55,42)
uri-Zn (µg/g Crea.)	450,00 (480,00)	380,00 (160,00)
uri-Cu (µg/g Crea.)	47,50 (13,12)	73,23 ± 31,27 ^c
uri-MT (µg/g Crea.)	57,20 (67,55)	79,20 (52,47)

^a p<0,001 (Prueba U de Mann-Whitney)

^b p<0,01 (t de Student-Fisher). IC 95%: 1,99 a 13,38 U/L

^c p<0,05 (Prueba U de Mann-Whitney)

RESULTADOS

4.2. DESCRIPCIÓN DEL GRUPO DM 2

En la Tabla XII se describe el número de individuos, el sexo, la media de la edad y del IMC y los resultados de las determinaciones analíticas del grupo de DM 2 estudiado. Los valores se expresan como mediana (y desviación cuartil) para los parámetros con distribución no normal, y como media \pm desviación standard para aquellos con distribución normal.

En la Tabla XIII se describen separadamente los mismos parámetros arriba indicados en función del sexo. El subgrupo de mujeres DM 2 presentó unas concentraciones de Cu en suero significativamente más altas que el subgrupo de hombres DM 2 [1156,56 \pm 215,81 vs 1055,00 (157,50) ng/mL, $p < 0,05$]. No se observó ninguna otra diferencia significativa en los valores de las determinaciones analíticas entre hombres y mujeres del grupo DM 2.

RESULTADOS

Tabla XII. Parámetros clínicos y metabólicos del grupo DM 2. Los resultados se expresan como media \pm desviación standard o mediana (desviación cuartil).

	GRUPO DM 2
N_ individuos	170
Edad (a_os)	58,90 \pm 9,96
Sexo (H/M)	(71/99)
IMC (Kg/m ²)	27,78 \pm 4,09
Evolución (a_os)	5,00 (4,00)
srm-Glucosa (mg/dL)	190,56 \pm 64,83
HbA _{1c} (%)	9,23 \pm 2,03
srm-Zn (ng/mL)	937,50 (125,00)
srm-Cu (ng/mL)	1124,71 \pm 223,81
srm-MT (ng/mL)	98,65 (45,70)
srm-CP (U/L)	110,00 (19,00)
hem-Zn (μ g/g Hb)	13,23 \pm 1,70

RESULTADOS

hem-Cu ($\mu\text{g/g Hb}$)	$3,59 \pm 1,06$
hem-MT ($\mu\text{g/g Hb}$)	965,30 (300,60)
uri-Zn ($\mu\text{g/g Creatinina}$)	2310,00 (830,00)
uri-Cu ($\mu\text{g/g Creatinina}$)	$80,65 \pm 28,64$
uri-MT ($\mu\text{g/g Creatinina}$)	1222 (260,50)

RESULTADOS

Tabla XIII. Parámetros clínicos y metabólicos del grupo DM 2 en función del sexo. Los resultados se expresan como media \pm desviación standard o mediana (desviación cuartil).

	HOMBRES	MUJERES
N_ individuos	71	99
Edad (a_os)	59,31 \pm 9,73	58,60 \pm 10,17
IMC (Kg/m ²)	27,62 \pm 3,48	27,91 \pm 4,51
Evolución (a_os)	5,00 (4,25)	6,00 (4,00)
srm-Glucosa (mg/dL)	188,03 \pm 58,51	192,49 \pm 69,60
HbA _{1c} (%)	9,20 \pm 2,01	9,26 \pm 2,06
srm-Zn (ng/mL)	940,00 (125,00)	935,00 (122,50)
srm-Cu (ng/mL)	1055,00 (157,50)	1156 \pm 215,81 ^a
srm-MT (ng/mL)	112,10 (56,00)	95,55 (39,30)
srm-CP (U/L)	108,69 \pm 24,34	115,28 \pm 25,65
hem-Zn (μ g/g Hb)	13,25 \pm 1,97	13,22 \pm 1,51
hem-Cu (μ g/g Hb)	3,56 \pm 1,10	3,62 \pm 1,05

RESULTADOS

hem-MT ($\mu\text{g/g Hb}$)	912,90 (277,50)	970,55 (357,42)
uri-Zn ($\mu\text{g/g Crea.}$)	2280,00 \pm 1440	2330,00 (900,00)
uri-Cu ($\mu\text{g/g Crea.}$)	81,35 \pm 30,79	80,19 \pm 27,41
uri-MT ($\mu\text{g/g Crea.}$)	1130,64 \pm 351,31	1261,00 (244,25)

^a $p < 0,05$ (Prueba U de Mann-Whitney)

RESULTADOS

4.3. COMPARACIÓN DE LOS PARÁMETROS CLÍNICOS Y METABÓLICOS ENTRE EL GRUPO CONTROL Y EL GRUPO DM 2

Como puede observarse en la Tabla XIV, el grupo de pacientes DM 2 presentó unos valores significativamente más altos de concentración de Cu en suero [$1124,71 \pm 223,81$ vs $877,00$ ($173,00$) ng/mL, $p < 0,001$], concentración de Cu en hematíes [$3,59 \pm 1,06$ vs $1,77$ ($0,62$) $\mu\text{g/g}$ Hb, $p < 0,001$] y excreción urinaria de Cu [$80,65 \pm 28,64$ vs $58,50$ ($25,00$) $\mu\text{g/g}$ Creatinina, $p < 0,001$]; unos valores significativamente más altos de concentración de Zn en hematíes [$13,23 \pm 1,70$ vs $12,00$ ($1,28$) $\mu\text{g/g}$ Hb, $p < 0,001$] y excreción urinaria de Zn [$2310,00$ ($830,00$) vs $430,00$ ($190,00$) $\mu\text{g/g}$ Creatinina, $p < 0,001$]; unos valores significativamente más altos de concentración de MT en suero [$98,65$ ($45,70$) vs $37,20$ ($17,82$) ng/mL, $p < 0,001$], concentración de MT en hematíes [$965,30$ ($300,60$) vs $48,70$ ($45,32$) $\mu\text{g/g}$ Hb, $p < 0,001$] y excreción urinaria de MT [$1222,00$ ($260,50$) vs $61,25$ ($58,20$) $\mu\text{g/g}$ Creatinina, $p < 0,001$]; y unos valores significativamente más altos de CP en suero [$110,00$ ($19,00$) vs $103,00$ ($12,00$) U/L, $p < 0,001$].

Una vez comparados los grupos del estudio, se quiso poner de manifiesto la influencia del sexo sobre los parámetros estudiados (Tablas XV y XVI), observándose que las diferencias significativas encontradas en los valores de Zn en hematíes sólo ocurren en el grupo de mujeres y las diferencias observadas en los valores de Cu en orina sólo ocurren en el grupo de hombres. Sin embargo, tanto los valores de Zn en hematíes de los hombres

RESULTADOS

pertenecientes al grupo de pacientes con DM 2 como los valores de Cu en orina de las mujeres pertenecientes al grupo de pacientes con DM 2 fueron más elevados que los valores de los individuos del mismo sexo pertenecientes al grupo Control, aunque sin llegar a alcanzar significancia estadística.

Tabla XIV. Comparación de los parámetros clínico-metabólicos del grupo Control y del grupo DM 2.

	GRUPO CONTROL	GRUPO DM 2
N_ individuos	210	170
Edad (a_os)	51,77 ± 9,09	58,90 ± 9,96 ^b
Sexo (H/M)	(99/111)	(71/99)
IMC (Kg/m ²)	25,20 ± 2,69	27,78 ± 4,09 ^c
Evolución (a_os)		5,00 (4,00)
srm-Glucosa (mg/dL)	89,95 ± 7,75	190,56 ± 64,83 ^a
HbA _{1c} (%)		9,23 ± 2,03
srm-Zn (ng/mL)	980,00 (111,87)	937,50 (125,00)
srm-Cu (ng/mL)	877,00 (173,00)	1124,71 ± 223,81 ^d

RESULTADOS

srm-MT (ng/mL)	37,20 (17,82)	98,65 (45,70) ^d
srm-CP (U/L)	103,00 (12,00)	110,00 (19,00) ^d
hem-Zn (µg/g Hb)	12,00 (1,28)	13,23 ± 1,70 ^d
hem-Cu (µg/g Hb)	1,77 (0,62)	3,59 ± 1,06 ^d
hem-MT (µg/g Hb)	48,70 (45,32)	965,30 (300,60) ^d
uri-Zn (µg/g Crea.)	430,00 (190,00)	2310,00 (830,00) ^d
uri-Cu (µg/g Crea.)	58,50 (25,00)	80,65 ± 28,64 ^d
uri-MT (µg/g Crea.)	61,25 (58,20)	1222,00 (260,50) ^d

^a p<0,001 (t de Student-Fisher). IC 95%: 91,7 a 109,0 mg/dL; ^b p<0,05 (t de Student-Fisher). IC 95%: 5,21 a 9,05 a_os; ^c p<0,05 (t de Student-Fisher). IC 95%: 1,89 a 3,27 Kg/m²; ^d p<0,001 (Prueba U de Mann-Whitney)

Los hombres pertenecientes al grupo de pacientes con DM 2 presentaron unos valores significativamente más altos de concentración de Cu en suero [1055,00 (157,50) vs 803,00 (147,50) ng/mL, p<0,001], concentración de Cu en hematíes [3,56 ± 1,10 vs 1,42 (0,57) µg/g Hb, p<0,001] y excreción urinaria de Cu [81,35 ± 30,79 vs 47,50 (13,12) µg/g Creatinina, p<0,001]; unos valores significativamente más altos de excreción urinaria de Zn [2228,0 ± 1440,0 vs 450,0 (480,0) µg/g Creatinina, p<0,001]; unos valores significativamente más altos de concentración de MT en suero [112,10 (56,00) vs 43,60 (15,80) ng/mL, p<0,001], concentración de MT en hematíes [912,90 (277,50) vs 45,20

RESULTADOS

(30,05) $\mu\text{g/g}$ Hb, $p < 0,001$] y excreción urinaria de MT [1130,60 \pm 351,30 vs 57,20 (67,55) $\mu\text{g/g}$ Creatinina, $p < 0,001$]; y unos niveles significativamente más altos de CP en suero (108,69 \pm 24,34 vs 97,45 \pm 19,77 U/L, $p < 0,01$).

Las mujeres pertenecientes al grupo de pacientes con DM 2 presentaron unos valores significativamente más altos de concentración de Cu en suero (1156 \pm 215,81 vs 965,20 \pm 268,70 ng/mL, $p < 0,001$) y concentración de Cu en hematíes [3,62 \pm 1,05 vs 2,10 (0,60) $\mu\text{g/g}$ Hb, $p < 0,001$]; unos valores significativamente más altos de concentración de Zn en hematíes [13,22 \pm 1,51 vs 11,81 (0,85) $\mu\text{g/g}$ Hb, $p < 0,001$] y de excreción urinaria de Zn [2333,0 (900,00) vs 380,00 (160,00) $\mu\text{g/g}$ Creatinina, $p < 0,001$]; unos valores significativamente más altos de concentración de MT en suero [95,55 (39,30) vs 36,90 (19,85) ng/mL, $p < 0,001$], concentración de MT en hematíes [970,55 (357,42) vs 66,30 (55,42) $\mu\text{g/g}$ Hb, $p < 0,001$] y excreción urinaria de MT [1261,00 (244,25) vs 79,20 (52,47) $\mu\text{g/g}$ Creatinina, $p < 0,001$]; y unos niveles significativamente más altos de CP en suero (115,28 \pm 25,65 vs 105,13 \pm 17,58 U/L, $p < 0,01$).

Tabla XV. Comparación de los parámetros clínico-metabólicos del grupo Control y del grupo DM 2. Hombres.

	GRUPO CONTROL	GRUPO DM 2
N_ individuos	99	71
Edad (a_os)	51,10 \pm 8,87	59,31 \pm 9,73 ^c

RESULTADOS

IMC (Kg/m ²)	25,12 ± 1,91	27,62 ± 3,48 ^d
Evolución (a_os)		5,00 (4,25)
srm-Glucosa (mg/dL)	89,67 ± 6,93	188,03 ± 58,51 ^a
HbA _{1c} (%)		9,20 ± 2,01
srm-Zn (ng/mL)	984,16 ± 168,97	940,00 (125,00)
srm-Cu (ng/mL)	803,00 (147,50)	1055,00 (157,50) ^e
srm-MT (ng/mL)	43,60 (15,80)	112,10 (56,00) ^e
srm-CP (U/L)	97,45 ± 19,77	108,69 ± 24,34 ^b
hem-Zn (µg/g Hb)	12,52 (1,24)	13,25 ± 1,97
hem-Cu (µg/g Hb)	1,42 (0,57)	3,56 ± 1,10 ^e
hem-MT (µg/g Hb)	45,20 (30,05)	912,90 (277,50) ^e
uri-Zn (µg/g Crea.)	450,00 (480,00)	2228,0 ± 1440,0 ^e
uri-Cu (µg/g Crea.)	47,50 (13,12)	81,35 ± 30,79 ^e
uri-MT (µg/g Crea.)	57,20 (67,55)	1130,60 ± 351,30 ^e

RESULTADOS

- ^a $p < 0,001$ (t de Student-Fisher). IC 95%: 86,7 a 110,0 mg/dL
- ^b $p < 0,01$ (t de Student-Fisher). IC 95%: 4,04 a 18,43 U/L
- ^c $p < 0,05$ (t de Student-Fisher). IC 95%: 5,37 a 11,0 a_os
- ^d $p < 0,05$ (t de Student-Fisher). IC 95%: 1,68 a 3,32 Kg/m²
- ^e $p < 0,001$ (Prueba U de Mann-Whitney)

RESULTADOS

Tabla XVI. Comparación de los parámetros clínico-metabólicos del grupo Control y del grupo DM 2. Mujeres.

	GRUPO CONTROL	GRUPO DM 2
N_ individuos	111	99
Edad (a_os)	52,36 ± 9,29	58,60 ± 10,17 ^e
IMC (Kg/m ²)	25,28 ± 3,23	27,91 ± 4,51 ^f
Evolución (a_os)		6,00 (4,00)
srm-Glucosa (mg/dL)	90,21 ± 8,43	192,49 ± 69,60 ^a
HbA _{1c} (%)		9,26 ± 2,06
srm-Zn (ng/mL)	982,24 ± 179,17	935,00 (122,50)
srm-Cu (ng/mL)	965,20 ± 268,70	1156,56 ± 215,81 ^c
srm-MT (ng/mL)	36,90 (19,85)	95,55 (39,30) ^g
srm-CP (U/L)	105,13 ± 17,58	115,28 ± 25,65 ^d
hem-Zn (µg/g Hb)	11,81 (0,85)	13,22 ± 1,51 ^g
hem-Cu (µg/g Hb)	2,10 (0,60)	3,62 ± 1,05 ^g
hem-MT (µg/g Hb)	66,30 (55,42)	970,55 (357,42) ^g

RESULTADOS

uri-Zn ($\mu\text{g/g}$ Crea.)	380,00 (160,00)	2333,0 (900,00) ^g
uri-Cu ($\mu\text{g/g}$ Crea.)	73,23 \pm 31,27	80,19 \pm 27,41
uri-MT ($\mu\text{g/g}$ Crea.)	79,20 (52,47)	1261,00 (244,25) ^g

^a $p < 0,001$ (t de Student-Fisher). IC 95%: 89,2 a 115,0 mg/dL

^b $p < 0,001$ (t de Student-Fisher). IC 95%: 22,3 a 50,0 mg/dL

^c $p < 0,001$ (t de Student-Fisher). IC 95%: 125 a 258 ng/mL

^d $p < 0,01$ (t de Student-Fisher). IC 95%: 3,78 a 18,52 U/L

^e $p < 0,05$ (t de Student-Fisher). IC 95%: 3,59 a 8,89 a_os

^f $p < 0,05$ (t de Student-Fisher). IC 95%: 1,57 a 3,69 Kg/m²

^g $p < 0,001$ (Prueba U de Mann-Whitney)

RESULTADOS

4.4. ESTUDIO DE CORRELACIÓN

4.4.1. GRUPO CONTROL

En la Tabla XVII se muestran los coeficientes de correlación, con sus niveles de significancia estadística, entre las diferentes determinaciones analíticas y datos clínicos.

En el estudio de las relaciones existentes entre los parámetros del grupo Control se observaron diversas correlaciones significativas (Tabla XVII). Destacan las correlaciones observadas entre el Cu en suero y el Cu en hematíes ($r=0,68$; $p<0,001$), el Cu en suero y la MT en hematíes ($r=0,30$; $p<0,001$), el Cu en suero y la actividad de CP en suero ($r=0,21$; $p<0,01$) y entre el Zn y la MT en orina ($r=0,66$; $p<0,001$).

A continuación, se describen también los valores del estudio de correlación de manera separada en hombres (Tabla XVIII) y en mujeres (Tabla XIX).

RESULTADOS

Tabla XVII. Coeficientes de correlación en el grupo Control.

	Edad	IMC	s.-Glu	s.-Zn	s.-Cu	s.-MT	s.-CP	u.-Zn	u.-Cu	u.-MT	h.-Zn	h.-Cu	h.-MT
Edad		0,34 ^a	-0,15	-0,18	0,13	-0,09	-0,01	-0,07	-0,06	-0,28	0,08	0,07	0,04
IMC			-0,01	-0,01	-0,01	0,07	0,04	0,10	0,03	0,13	0,07	-0,08	0,02
s.-Glu				-0,03	0,15	0,10	0,18	0,17	0,06	0,13	-0,01	0,09	0,09
s.-Zn					0,08	0,11	-0,08	0,14	-0,11	-0,003	0,01	0,02	0,06
s.-Cu						-0,20	0,21 ^b	-0,05	-0,13	-0,27	-0,33	0,68 ^a	0,30 ^b
s.-MT							0,04	0,15	0,19	0,09	0,09	-0,16	-0,21
s.-CP								0,25	0,29	0,23	0,03	-0,12	0,04
u.-Zn									-0,05	0,66 ^a	0,12	0,09	0,08
u.-Cu										0,17	-0,17	0,03	-0,25
u.-MT											0,04	-0,16	-0,09
h.-Zn												-0,24	-0,18
h.-Cu													0,13

^ap<0,001; ^bp<0,01;

RESULTADOS

Tabla XVIII. Coeficientes de correlación en el grupo Control. Hombres

	Eda	IMC	s.-Glu	s.-Zn	s.-Cu	s.-MT	s.-CP	u.-Zn	u.-Cu	u.-MT	h.-Zn	h.-Cu	h.-MT
Edad		0,33 ^a	-0,04	0,04	0,19	-0,23	0,007	-0,02	-0,26	-0,39	0,11	-0,05	0,16
IMC			-0,03	-0,09	-0,02	-0,03	0,14	0,06	-0,03	0,10	0,06	0,04	0,04
s.-Glu				-0,01	0,21	0,16	0,27	0,18	0,25	0,24	0,002	0,13	0,17
s.-Zn					0,25	-0,01	-0,13	0,23	-0,02	0,15	0,04	0,24	0,06
s.-Cu						-0,16	0,10	0,16	-0,20	-0,19	-0,30	0,68 ^a	0,30 ^c
s.-MT							0,02	-0,12	0,23	-0,08	-0,01	-0,12	-0,24
s.-CP								-0,20	0,28	-0,16	0,01	-0,22	0,04
u.-Zn									-0,02	0,69 ^a	0,03	0,03	0,17
u.-Cu										0,24	-0,17	-0,10	-0,33
u.-MT											0,10	-0,15	-0,08
h.-Zn												-0,03	-0,20
h.-Cu													0,12

^ap<0,001; ^bp<0,01; ^cp<0,05

Tabla XIX. Coeficientes de correlación en el grupo Control. Mujeres.

	Eda	IMC	s.-Glu	s.-Zn	s.-Cu	s.-MT	s.-CP	u.-Zn	u.-Cu	u.-MT	h.-Zn	h.-Cu	h.-MT
Edad		0,35 ^a	-0,24	-0,01	0,08	0,02	-0,05	-0,03	0,08	-0,12	0,10	0,24	-0,10
IMC			-0,01	0,06	-0,03	0,12	-0,02	0,18	0,10	0,16	0,14	-0,26	0,001
s.-Glu				-0,04	0,10	0,06	0,07	0,22	-0,07	0,06	0,01	-0,05	0,01

RESULTADOS

s.-Zn					-0,03	0,19	-0,06	-0,09	-0,13	-0,23	-0,04	-0,19	0,06
s.-Cu						-0,24	0,22 ^c	-0,22	-0,27	-0,38	-0,26	0,56 ^a	0,26 ^c
s.-MT							0,05	0,41	0,34	0,29	0,17	-0,16	-0,17
s.-CP								0,25	0,18	0,25	0,13	-0,09	0,02
u.-Zn									0,03	0,63 ^a	0,08	-0,14	0,03
u.-Cu										0,10	-0,02	0,11	-0,24
u.-MT											-0,04	-0,15	-0,10
h.-Zn												-0,44	-0,14
h.-Cu													0,11

^ap<0,001; ^bp<0,01; ^cp<0,05

4.4.2. GRUPO DM 2

En la Tabla XX se muestran los coeficientes de correlación, con sus niveles de significancia estadística, entre las diferentes determinaciones analíticas y datos clínicos del grupo DM 2.

En el estudio de las relaciones existentes entre los parámetros del grupo DM 2, se observaron diversas correlaciones estadísticamente significativas (Tabla XX). Destacan las correlaciones observadas entre la glucemia y el Cu en suero ($r=0,28$; $p<0,001$), la glucemia y la cupruria ($r=0,36$; $p<0,001$), la glucemia y el Cu en hematíes ($r=0,63$; $p<0,001$) y entre la glucemia y la MT en hematíes ($r=0,47$; $p<0,001$); las correlaciones entre la HbA_{1c} y el Cu en suero ($r=0,27$; $p<0,001$), la HbA_{1c} y la cupruria ($r=0,60$; $p<0,001$), la HbA_{1c} y el Cu en

RESULTADOS

hematíes ($r=0,39$; $p<0,001$) y entre la HbA_{1c} y la MT en hematíes ($r=0,21$; $p<0,05$); las correlaciones entre el Cu en suero y la CP en suero ($r=0,29$; $p<0,001$), el Cu en suero y el Cu en orina ($r=0,20$; $p<0,05$), el Cu en suero y el Cu en hematíes ($r=0,34$; $p<0,001$) y entre el Cu en suero y el Zn en orina ($r=0,67$; $p<0,001$); la correlación entre la MT en suero y la MT en orina ($r= -0,41$; $p<0,001$); la correlación entre el Zn eritrocitario y la excreción urinaria de MT ($r=0,30$; $p<0,01$) y la correlación entre el Cu en orina y el Cu en hematíes ($r=0,40$; $p<0,001$).

A continuación, se describen los valores del estudio de correlación de manera separada en hombres (Tabla XXI) y en mujeres (Tabla XXII).

RESULTADOS

Tabla XX. Coeficientes de correlación en el grupo DM 2.

	Eda	IMC	s-Glu	HbA _{1c}	s-Zn	s-Cu	s-MT	s-CP	u-Zn	u-Cu	u-MT	h-Zn	h-Cu	h-MT
Edad		-0,07	0,07	-0,01	-0,11	0,09	0,17 ^c	0,04	0,08	0,09	-0,06	0,04	0,10	-0,05
IMC			-0,06	0,10	0,04	-0,06	-0,03	-0,01	0,02	-0,03	0,001	-0,30	-0,08	0,09
s.-Glu				0,59 ^a	0,001	0,28 ^a	0,09	0,09	0,15	0,36 ^a	-0,16	0,10	0,63 ^a	0,47 ^a
HbA _{1c}					0,04	0,27 ^a	0,06	0,17 ^c	0,20	0,60 ^a	-0,15	0,07	0,39 ^a	0,21 ^c
s-Zn						-0,05	-0,27	-0,04	-0,17	-0,18	0,09	0,01	-0,17	0,004
s-Cu							-0,005	0,29 ^a	0,67 ^a	0,20 ^c	-0,08	-0,06	0,34 ^a	0,23 ^c
s-MT								-0,01	-0,08	0,02	-0,41 ^a	-0,13	0,02	0,03
s-CP									0,04	-0,01	-0,09	-0,14	-0,10	-0,08
u-Zn										0,25 ^c	0,11	-0,05	0,28	0,13
u-Cu											-0,07	0,14	0,40 ^a	0,07
u-MT												0,30 ^b	0,03	0,04
h-Zn													0,14	-0,06
h-Cu														0,22 ^c

^ap<0,001; ^bp<0,01; ^cp<0,05

RESULTADOS

Tabla XXI. Coeficientes de correlación en el grupo DM 2. Hombres.

	Eda.	IMC	s-Glu	HbA _{1c}	s-Zn	s-Cu	s-MT	s-CP	u-Zn	u-Cu	u-MT	h-Zn	h-Cu	h-MT
Edad		0,07	-0,03	-0,02	-0,09	0,13	0,22	-0,12	0,17	0,29	0,08	-0,10	-0,01	-0,13
IMC			-0,07	-0,07	0,07	-0,15	-0,06	-0,14	0,11	0,03	-0,14	-0,28	-0,03	0,16
s.-Glu				0,51 ^a	-0,10	0,23 ^c	0,16	0,01	0,07	0,17	-0,13	0,08	0,53 ^a	0,35 ^c
HbA _{1c}					0,11	0,40 ^a	0,10	0,07	0,29	0,54 ^a	-0,13	0,08	0,23	0,09
s-Zn						-0,12	-0,30	0,03	-0,11	-0,21	0,10	0,01	-0,37	0,10
s-Cu							0,01	0,36 ^b	0,74 ^a	0,27	-0,16	-0,16	-0,001	0,07
s-MT								-0,09	0,01	-0,01	-0,44 ^b	-0,29	-0,05	-0,07
s-CP									0,07	-0,14	-0,15	-0,09	-0,28	0,10
u-Zn										0,18	-0,13	-0,14	-0,04	-0,08
u-Cu											0,04	0,08	0,32 ^c	-0,20
u-MT												0,56 ^a	0,14	0,11
h-Zn													0,12	0,02
h-Cu														0,01

Tabla XXII. Coeficientes de correlación en el grupo DM 2. Mujeres.

	Eda.	IMC	s-Glu	HbA _{1c}	s-Zn	s-Cu	s-MT	s-CP	u-Zn	u-Cu	u-MT	h-Zn	h-Cu	h-MT
Edad		-0,15	0,14	0,01	-0,13	0,07	0,12	0,17	0,05	-0,05	-0,11	0,15	0,17	-0,003
IMC			-0,06	0,19	0,01	-0,02	-0,01	0,06	-0,01	-0,06	0,06	-0,33	-0,10	0,07
s.-Glu				0,64 ^a	0,06	0,31 ^b	0,03	0,15	0,19	0,48 ^a	-0,18	0,12	0,70 ^a	0,53 ^a

RESULTADOS

HbA _{1c}					-0,04	0,18	0,02	0,24 ^c	0,15	0,66 ^a	-0,15	0,05	0,49 ^a	0,27 ^c
s-Zn						-0,01	-0,24	-0,09	-0,21	-0,16	0,09	0,01	-0,03	-0,05
s-Cu							0,02	0,20 ^c	0,63 ^a	0,17	-0,09	0,02	0,59 ^a	0,30 ^c
s-MT								0,13	-0,13	0,04	-0,41 ^b	0,07	0,11	0,14
s-CP									0,02	0,09	-0,10	-0,18	-0,01	0,04
u-Zn										0,31 ^c	0,20	0,02	0,47 ^a	0,22
u-Cu											-0,12	0,19	0,46 ^a	0,23
u-MT												0,15	-0,03	-0,01
h-Zn													0,16	-0,12
h-Cu														0,34 ^b

^ap<0,001; ^bp<0,01; ^cp<0,05

RESULTADOS

4.5. INFLUENCIA DEL TIEMPO DE EVOLUCIÓN DE LA DM 2 SOBRE LOS PARÁMETROS DEL ESTUDIO

Con el fin de averiguar las relaciones existentes entre los parámetros estudiados y el tiempo de evolución de la DM 2 se empleó el test de correlación basado en el cálculo del coeficiente de correlación. Al determinar dichos coeficientes no se observó ninguna correlación significativa entre el tiempo de evolución de la enfermedad y los mencionados parámetros (Tabla XXV).

Tabla XXV. Coeficientes de correlación del tiempo de evolución de la DM 2.

srn-Zn	r=0,004 (NS)	uri-Zn	r=0,31 (NS)
srn-Cu	r=0,05 (NS)	uri-Cu	r=0,22 (NS)
srn-MT	r=0,09 (NS)	uri-MT	r=0,10 (NS)
Edad	r=0,15 (NS)	CP	r=0,12 (NS)
srn-Glucosa	r=0,15 (NS)	hem-Zn	r=0,04 (NS)
HbA _{1c}	r=0,06 (NS)	hem-Cu	r=-0,36 (NS)
IMC	r=0,07 (NS)	hem-MT	r=0,25 (NS)

RESULTADOS

RESULTADOS

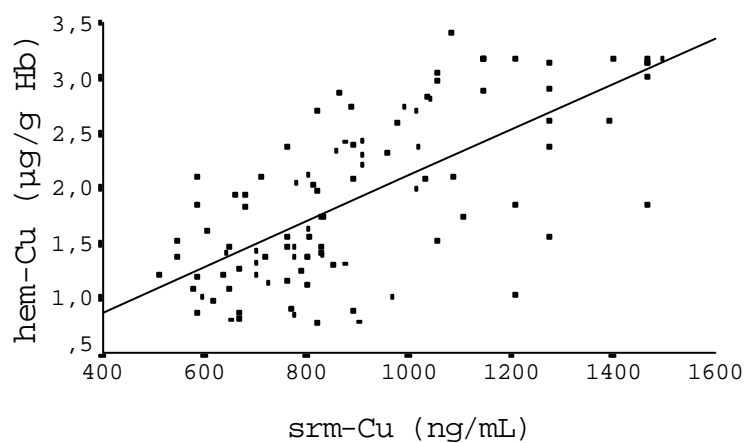
4.6. ESTUDIO DE REGRESIÓN MÚLTIPLE

Se realizó un estudio de regresión múltiple para identificar posibles factores de confusión en las correlaciones obtenidas en los distintos grupos estudiados.

4.6.1. GRUPO CONTROL

Se utilizó un modelo de regresión múltiple para identificar determinantes independientes de los niveles de Cu en hematíes: Cu en suero, CP y sexo se evaluaron como parámetros independientes. El modelo indicó que sólo el Cu en suero era predictor de los niveles de Cu en hematíes (Fig.7).

Fig.7. Grupo Control. Recta de regresión que expresa la relación encontrada entre el Cu en



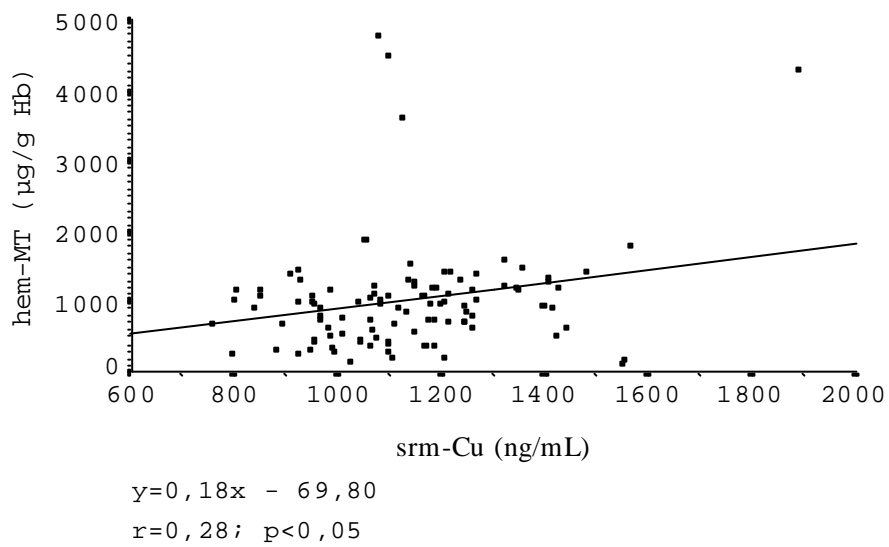
hematíes y el Cu en suero ajustada por CP y sexo.

$$y=0.002x + 0.05$$

$$r=0.63; p<0.001$$

RESULTADOS

En el estudio de regresión entre la MT en hematíes y el Cu en suero ajustado por sexo, CP, Cu en hematíes y MT en suero, sólo el Cu en suero entró a formar parte del



modelo (Fig.8).

Fig.8. Grupo Control. Recta de regresión que expresa la relación encontrada entre la MT en hematíes y el Cu en suero ajustada por sexo, CP, Cu en hematíes y MT en suero.

RESULTADOS

RESULTADOS

4.6.2. GRUPO DM 2

Se utilizó un modelo de regresión múltiple para identificar determinantes independientes de los niveles de MT en hematíes: sexo, Glucemia, HbA_{1c}, Cu en suero, MT en suero, CP y Cu en hematíes se evaluaron como parámetros independientes. El modelo indicó que sólo la Glucemia era predictor de los niveles de MT en hematíes (Fig.9).

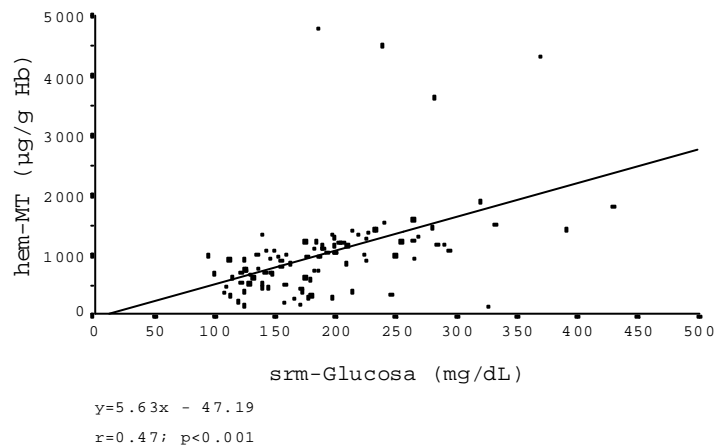


Fig.9. Grupo DM 2. Recta de regresión que expresa la relación encontrada entre la glucemia y la MT en hematíes ajustada por sexo, HbA_{1c}, Cu en suero, MT en suero, CP y Cu en hematíes.

RESULTADOS

En el estudio de regresión múltiple entre la concentración de Cu en suero y sexo, glucemia, HbA_{1c}, CP, Cu en hematíes y MT en hematíes evaluados como variables independientes. El modelo de regresión múltiple concluyó que entraban a formar parte del mismo las variables sexo (a cargo del grupo de mujeres), CP, HbA_{1c} y Cu en hematíes (Tabla XXIII).

Tabla XXIII. Grupo DM 2. Estudio de regresión múltiple entre la concentración de Cu en suero y el sexo, CP, HbA_{1c} y Cu en hematíes.

Variable dependiente: srm-Cu	B	T	p
Variables independientes: sexo	81,47	2,26	<0,05
CP	1,51	2,09	<0,05
HbA _{1c}	23,64	2,31	<0,05
Hem-Cu	49,77	2,79	<0,01
r=0,52	Constante:	439,38	

B: coeficientes de la recta de regresión; T: T de Student-Fisher

Al realizar el estudio de regresión múltiple entre el Cu en hematíes y sexo, glucemia,

RESULTADOS

HbA_{1c}, concentración de Cu en suero, CP y MT en hematíes evaluados como parámetros independientes, resultó que entraban a formar parte del modelo las variables glucemia, Cu en suero y CP (Tabla XXIV).

Tabla XXIV. Grupo DM 2. Estudio de regresión múltiple entre el Cu en hematíes y la glucemia, Cu en suero y CP.

Variable dependiente:	Hem-Cu	B	T	p
Variables independientes:	glucemia	0,0094	6,99	<0,001
	Srm-Cu	9,28·10 ⁻⁴	1,99	<0,05
	CP	-0,0072	-2,16	<0,05
r=0,66	Constante:	1,56		

B: coeficientes de la recta de regresión; T: T de Student-Fisher

En el estudio de regresión múltiple entre la excreción urinaria de Cu y sexo, glucemia, HbA_{1c}, concentración de Cu en suero, CP, Cu en hematíes y excreción urinaria de Zn evaluados como variables independientes. El modelo de regresión múltiple concluyó que entraban a formar parte del mismo las variables HbA_{1c}, Cu en suero, Cu en hematíes y excreción urinaria de Zn (Tabla XXV).

Tabla XXV. Grupo DM 2. Estudio de regresión múltiple entre la excreción urinaria de Cu y HbA_{1c}, Cu en suero, Cu en hematíes y excreción urinaria de Zn.

RESULTADOS

Variable dependiente:	Uri-Cu	B	T	p
Variables independientes:	HbA _{1c}	8,69	6,46	<0,001
	Srm-Cu	-0,034	1,99	<0,05
	Hem-Cu	5,20	2,22	<0,05
	Uri-Zn	0,0043	2,29	<0,05
r=0,66	Constante:	10,54		

B: coeficientes de la recta de regresión; T: T de Student-Fisher

RESULTADOS

4.7. RESUMEN DE RESULTADOS

1. La concentración de Zn en suero de los pacientes con DM 2 no presenta diferencias con la concentración de Zn en suero de los individuos pertenecientes al grupo Control. Sin embargo, los pacientes con DM 2 presentan unos valores más elevados de concentración eritrocitaria de Zn y de excreción urinaria de Zn.
2. Los pacientes con DM 2 presentan una concentración de Cu en suero, una concentración eritrocitaria de Cu y una excreción urinaria de Cu mayores que los individuos pertenecientes al grupo Control.
3. Los valores de la concentración de MT en suero, la concentración eritrocitaria de MT y la excreción urinaria de MT son mayores en los pacientes con DM 2.
4. Los pacientes con DM 2 presentan unos niveles de CP en suero más elevados que los individuos pertenecientes al grupo Control. Estos valores de CP se correlacionan con la cupremia tanto en los individuos del grupo Control como en los pacientes con DM 2.
5. En los pacientes con DM 2 tanto los valores de glucemia como los de HbA_{1c} se

RESULTADOS

encuentran relacionados con los valores de Cu en suero, hematíes y orina.

6. En los pacientes con DM 2 el nivel de glucemia es el único parámetro predictor de la concentración de MT eritrocitaria.

7. Ni el tiempo de evolución de la DM 2 ni el IMC ejercen ningún tipo de influencia sobre los niveles de Zn, Cu y MT de los pacientes estudiados.

**UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
FACULTAT DE MEDICINA I CIÈNCIES DE LA SALUT**

**ALTERACIONES EN EL METABOLISMO DEL ZINC, COBRE
Y METALOTIONEÍNA EN LA DIABETES MELLITUS TIPO 2**

Memoria para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía

Doctorando: Xavier Raga Luria

Director de la tesis: Prof. José Luis Paternain Suberviola

Tarragona, 2001