

UNIVERSIDAD DE GRANADA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA
DEPARTAMENTO DE FISCOQUÍMICA
INSTITUTO DE NUTRICIÓN Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS “*José Mataix*”
CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA
FACULTAD DE FARMACIA



OPTIMIZACIÓN EN EL DIAGNÓSTICO DE DEFICIENCIA DE COBRE EN PACIENTE CRÍTICO. APLICACIÓN DE QUANTUM DOT A LA DETERMINACION DE COBRE EN MUESTRAS BIOLÓGICAS.

Laura Sáez Pérez

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Laura Sáez Pérez
D.L.: GR 193-2014
ISBN: 978-84-9028-713-2

***OPTIMIZACIÓN EN EL DIAGNÓSTICO DE DEFICIENCIA DE
COBRE EN PACIENTE CRÍTICO. APLICACIÓN DE QUANTUM DOT
A LA DETERMINACION DE COBRE EN MUESTRAS BIOLÓGICAS.***

**Memoria que presenta para aspirar al Grado de Doctor por la Universidad de
Granada la Licenciada D^a Laura Sáez Pérez**

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada bajo la dirección de:

Dr^a D^a Elena M^a Planells del Pozo

Dr^a D^a Carmen Cabeza González

Dr D Bartolomé Quintero Osso

Lda. D^a Laura Sáez Pérez

Aspirante al Grado de Doctor

Granada, 2013

D^a Elena María Planells del Pozo, Profesora Titular del Departamento de Fisiología de la Universidad de Granada

D^a Carmen Cabeza González, Profesora Titular del Departamento de Físicoquímica de la Universidad de Granada

D Bartolomé Quintero Osso, Catedrático del Departamento de Físicoquímica de la Universidad de Granada

Directores de la Memoria de Tesis Doctoral de título:

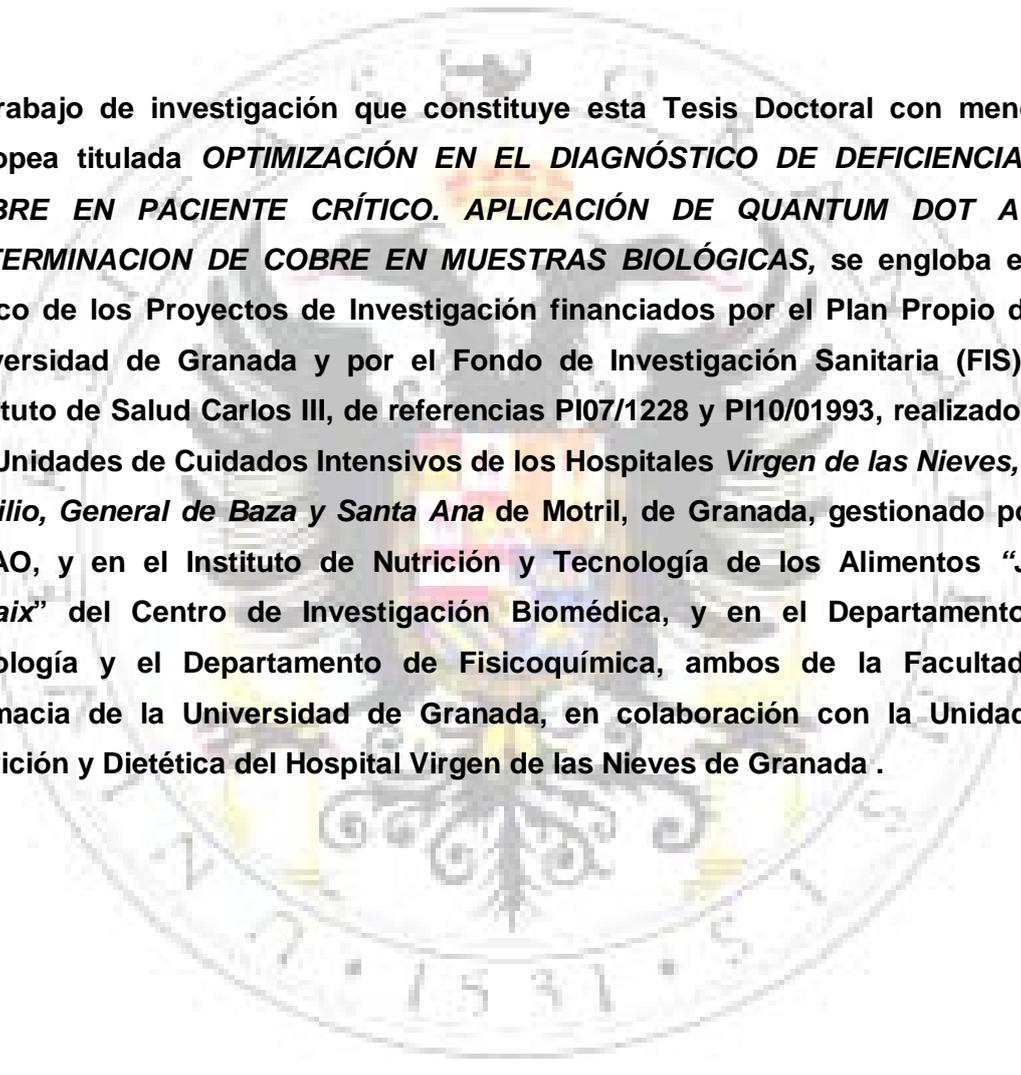
OPTIMIZACIÓN EN EL DIAGNÓSTICO DE DEFICIENCIA DE COBRE EN PACIENTE CRÍTICO. APLICACIÓN DE QUANTUM DOT A LA DETERMINACION DE COBRE EN MUESTRAS BIOLÓGICAS, realizada por la Licenciada Laura Sáez Pérez, autorizan su presentación ante el Tribunal que en su día se designe.

Y para que así conste, y en cumplimiento de las disposiciones vigentes, firman la presente Tesis Doctoral a 21 de junio de 2013.

Fdo. Elena M^a Planells del Pozo

Fdo. Carmen Cabeza González

Fdo. Bartolomé Quintero Osso



El trabajo de investigación que constituye esta Tesis Doctoral con mención Europea titulada **OPTIMIZACIÓN EN EL DIAGNÓSTICO DE DEFICIENCIA DE COBRE EN PACIENTE CRÍTICO. APLICACIÓN DE QUANTUM DOT A LA DETERMINACION DE COBRE EN MUESTRAS BIOLÓGICAS**, se engloba en el marco de los Proyectos de Investigación financiados por el Plan Propio de la Universidad de Granada y por el Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) del Instituto de Salud Carlos III, de referencias PI07/1228 y PI10/01993, realizados en las Unidades de Cuidados Intensivos de los Hospitales *Virgen de las Nieves, San Cecilio, General de Baza y Santa Ana* de Motril, de Granada, gestionado por el FIBAO, y en el Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos “*José Mataix*” del Centro de Investigación Biomédica, y en el Departamento de Fisiología y el Departamento de Fisicoquímica, ambos de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada, en colaboración con la Unidad de Nutrición y Dietética del Hospital Virgen de las Nieves de Granada .

Agradecimientos

AGRADECIMIENTOS

Al paciente crítico y sus familiares, por consentir la participación en este proyecto, así como a todas las personas que han participado como sujetos control del estudio. Sin ellos la realización de esta tesis no habría sido posible.

A mis directores de tesis.

A Bartolomé Quintero Osso, por su constante trabajo, perseverancia y paciencia, y por la gran cantidad de conocimientos que me ha transmitido durante estos años de trabajo.

A M^a Carmen Cabeza González, por tu ayuda y trabajo, siempre a mi lado en el laboratorio. Por tu ternura.

A mi directora, además de amiga, Elena Planells del Pozo. Sin ti habría sido imposible sacar esta tesis adelante, tanto profesional como emocionalmente.

Al Dr. Antonio Pérez de la Cruz, Jefe de la Unidad de Nutrición y Dietética del Hospital Universitario Virgen de las Nieves, por abrimos las puertas y ofrecernos su apoyo y supervisión en todo momento.

A la Directora del Departamento de Fisiología, Dra. María López Jurado, al Director del Departamento de Físicoquímica, Dr. Jose M^a Álvarez Pez, y a la Directora del Máster de Nutrición Humana, Dra. Magdalena López Frías. También al Director del Instituto de Nutrición Humana y Tecnología de los Alimentos, Dr. Emilio Martínez de Victoria, así como a todo el personal que ha colaborado.

A los profesionales del ámbito hospitalario, Dr. Manuel Rodríguez Elvira, Dr. José Castaño Pérez, Dr. Javier Martín, Dr. Francisco González Díaz, así como al personal de enfermería, por facilitar la realización de este trabajo de investigación.

A mis compañeros de camino, M^a Ángeles, Jorge, Bea, Daniela, Elena, Adrián, Mario, Nuri, Silvia..., a vuestro lado este trabajo ha sido mucho más llevadero.

También al equipo de la Dra. Germaine Escames Rosa, por su ayuda y colaboración en mi trabajo.

A todos los compañeros y amigos que he tenido la fortuna de conocer durante mi estancia en Camerino, Profesor Giancarlo Falcioni, Maria Letizia, Durai, Elena, Nízar, Trini, Gianluca..., hicisteis de esos tres meses una aventura maravillosa.

A mis amigos, Rocío, Rosa, Sergio, Loreto, Marta, Cris, Oli, Peich, Susi, Eme, Juanjo, Anica, Bea... por hacerme pasar los mejores ratos que una persona puede desear y por acompañarme en mis malos momentos.

Y a mi familia, lo más importante de mi vida.

A ti, MAMÁ, por tu apoyo y consuelo incondicional en los momentos más duros de mi vida. Por nuestras risas. GRACIAS.

A mi padre, por estar ahí y poder permitir que este sueño se haga realidad.

A mi hermano, Julio, por estar siempre a mi lado y saber que puedo contar contigo.

A mi tía Mati, por apoyarme y animarme en cada labor que realizo.

ABREVIATURAS

ACCP	American College of Chest Physicians
AGA	American Gastroenterological Association
AO	Antioxidante
APACHE II	Acute Physiologic and Chronic Health Evaluation II
APP	Proteína Precursora Amiloide
ASPEN	American Society for Enteral and Parenteral Nutrition
BCR	Bovine liver Reference material
BN	Balance Nitrogenado
Ca	Calcio
Cd	Cadmio
Cu	Cobre
Cu/Zn-SOD	Superóxido Dismutasa dependiente de cobre y cinc
DMSO	Dimetil Sulfóxido
EEM	Error Estándar de la Media
ESPEN	European Society for Parenteral and Enteral Nutrition
FAAS	Espectroscopía de absorción atómica de llama
Fe	Hierro
ICA	Índice Creatinina-Altura
ICP-MS	Espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo
IMC	Índice de Masa Corporal
IP	Ingesta Proteica
Kcal/Kg/día	Kilocaloría/kilogramo de peso/día
LMA	Agarosa de baja fusión
Mg	Magnesio
NCC	Cobre no unido a ceruloplasmina
NE	Nutrición Enteral
NMA	Agarosa de fusión media
NP	Nutrición Parenteral
UN	Nitrógeno Ureico
PAO	Poder Antioxidante Total
PBS	Tampón fosfato alcalino
PCO ₂	Presión de CO ₂
PLR	Proteína ligada a retinol
QD	Quantum Dots
RDA	Recommended Dietary Allowances
RNS	Especies Reactivas del Nitrógeno
ROS	Especies Reactivas del Oxígeno
Rpm	Revoluciones por minuto
SD	Desviación estándar
SOD	Superóxido Dismutasa
SOFA	Sequential Organ Failure Assessment
SRIS	Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica
Te	Teluro
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
Zn	Cinc

Índice

ÍNDICE

RESUMEN DE LA TESIS	19
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	25
ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	31
1. Evaluación del estado nutricional	34
1. 1. Situación de déficit nutricional	34
1. 2. Valoración bioquímica del estado nutricional	34
1.2.1. Determinaciones características	36
1.2.2. Marcadores específicos en la evolución bioquímica del estado nutricional	37
2. Cobre	40
2.1. Participación del cobre en diferentes procesos	40
2.1.1. Cobre y estrés oxidativo	41
2.1.2. Cobre y Sistema Nervioso	42
2.1.3. Cobre y Sistema Cardiovascular	42
2.1.4. Cobre, hierro y anemia	43
2.1.5. Cobre y salud ósea	43
2.1.6. Cobre y Sistema Inmunológico	43
2.1.7. Otros procesos	44
2.2. Metabolismo del cobre	44
2.3. Fuentes y biodisponibilidad	46
2.4. Requerimientos	47
2.5. Deficiencia de cobre	48
3. Paciente crítico	52
3.1. Situación clínica y nutricional del paciente	53
3.1.1. Tipos de valoraciones	54
- SRIS/SOFA	54
- SOFA	55
- APACHE II	56
3.2. Valoración clínica del estado nutricional del paciente	57
3.2.1. Valoración bioquímica	58
3.2.2. Valoración inmunológica	61
3.2.3. Contenido corporal de cobre	61
3.3. Requerimientos nutricionales específicos en el paciente crítico	62
3.3.1. Energía	63
3.3.2. Proteínas	64
3.3.3. Carbohidratos	66
3.3.4. Lípidos	66
3.3.5. Vitaminas y minerales	68
3.4. Soporte nutricional y cobre en paciente crítico	69

3.4.1. Soportes nutricionales que pueden aportar cobre al paciente crítico	71
3.4.2. Suplementación de cobre en Nutrición Parenteral	72
3.5. Estrés oxidativo en el paciente crítico	73
3.5.1. Ceruloplasmina	76
3.5.2. SOD	77
- SOD y cobre	78
- Papel de la SOD	80
- Mecanismo de acción de la SOD	80
3.5.3. Daño oxidativo en el ADN	81
- Ensayo Comet	82
4. Determinación del ión cobre en personas sanas y pacientes críticos	83
4.1. Semiconductores	84
4.2. Quantum Dots	84
SUJETOS Y METODOLOGÍA	93
1. Sujetos del estudio y criterios de inclusión	95
1.1. Grupo control	95
1.2. Grupo pacientes críticos	97
1.3. Tipo de muestreo	98
1.4. Recogida de datos	98
2. Metodología	99
2.1. Análisis y valoración de la ingesta dietética	99
2.2. Determinaciones antropométricas	105
2.3. Tratamiento de la muestra	105
2.4. Análisis bioquímico	106
2.5. Mineralización por vía húmeda	107
2.6. Determinación de cobre	107
2.7. Determinación de la actividad de la SOD	108
2.8. Poder Antioxidante Total (PAO)	109
2.9. Ensayo Comet	110
2.9.1. Aislamiento de leucocitos	110
2.9.2. Electroforesis alcalina	110
2.10. Determinación de cobre por QD	111
2.10.1. Síntesis de QD	111
2.10.2. Obtención de las muestras biológicas	112
2.10.3. Medidas de absorción	113
2.10.4. Análisis por microscopía electrónica de barrido	114
2.10.5. Medidas por ICP-MS	114
2.10.6. Medidas de fluorescencia	114
3. Análisis estadístico de los datos	115

4. Limitaciones del estudio	115
RESULTADOS DEL ESTUDIO	117
1. Estudio en la muestra total	119
1.1. Características generales de la muestra	119
1.2. Ingesta de energía, nutrientes y cobre	120
1.3. Valores de cobre en plasma y eritrocito	121
1.4. Estudio comparativo control-crítico	122
1.5. Estudio de individuos deficientes en cobre	122
1.6. Evolución en la UCI.	123
1.7. Estudio de correlación entre parámetros en paciente crítico	123
2. Estudio en subgrupo	124
3.1. Resultados de Comet y estrés oxidativo	124
4. Resultados de QD	125
4.1. Síntesis y caracterización de los CdTe QD-Lcys	125
4.2. Desactivación de la luminiscencia de QD por iones Cu (II)	132
4.3. Determinación fluorimétrica de Cu (II) en plasma y eritrocitos utilizando CdTe QD-Lcys	133
DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	135
1. Estudio de valoración del estado nutricional en cobre y estrés oxidativo	137
1.1. Ingesta de cobre	137
1.2. Estudio comparativo sujetos control y paciente crítico	138
1.3. Estudio de evolución del paciente crítico	140
1.4. Correlaciones entre parámetros en paciente crítico	142
1.5. Análisis de regresión en paciente crítico	145
2. Estudio de daño en el ADN	146
3. Determinación de cobre por QD	148
3.1. Síntesis y caracterización de los CdTe QD-Lcys	148
3.2. Fluorescencia de CdTe QD-Lcys	151
3.3. Desactivación de la luminiscencia de QD por iones Cu (II)	154
3.4. Determinación fluorimétrica de Cu (II) en plasma y eritrocitos utilizando CdTe QD-Lcys	156

CONCLUSIONES DEL ESTUDIO	159
BIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS	165

Resumen de la tesis/Thesis abstract

RESUMEN TESIS

Antecedentes

El paciente crítico se encuentra en una situación especial de hipercatabolismo y con un proceso inflamatorio sistémico que deriva en un gasto extra que puede llevar a deficiencia de micronutrientes antioxidantes como el cobre, y por tanto los requerimientos varían en estado crítico. Una carencia de este tipo aumentaría el estrés oxidativo y agotaría las reservas en antioxidantes, y si no se corrige a tiempo, puede desencadenar un incremento en la morbimortalidad del paciente y un empeoramiento en la evolución durante su estancia en la UCI.

Por ello, se hace necesario y obligatorio, incluir en el protocolo establecido en la Unidad, la evaluación nutricional de los pacientes críticos, especialmente en nutrientes antioxidantes como el cobre, para paliar los posibles efectos adversos consecuencia de sus carencias, realizándose la determinación de manera rutinaria, ágil y operativa, con la finalidad de corregir a tiempo una posible deficiencia.

Objetivo

El objetivo del presente trabajo es evaluar el estado nutricional en cobre de pacientes críticos que presentan SRIS, y optimizar el diagnóstico de deficiencia en cobre por el método de QD.

Estructura de la Tesis Doctoral

La estructura de la presente tesis se basa en 3 partes:

1. Un estudio inicial de valoración nutricional general y, concretamente, en el mineral antioxidante cobre. Los resultados muestran valores de aporte insuficiente en un alto porcentaje de la población crítica, encontrando diferencias significativas con el grupo control sano, y presentando deficiencia de cobre a nivel plasmático y eritrocitario en un elevado porcentaje de los pacientes, que evolucionan negativamente durante su

estancia de 7 días en UCI, siendo el cobre en eritrocito el biomarcador más real en caso de deficiencia.

2. A continuación se ha realizado un estudio de estrés oxidativo a partir de la determinación de enzima antioxidante dependiente de cobre, la superóxido dismutasa, y el poder antioxidante total, así como su correlación con el estado nutricional de cobre. Los resultados muestran valores de antioxidantes significativamente menores en los pacientes críticos respecto a los sujetos control, que empeoran durante el periodo de estancia en UCI controlado. También, se ha realizado un estudio de daño en el ADN mediante el ensayo *comet*, y también hemos observado su asociación con el estado antioxidante en el paciente crítico al final del estudio.
3. Finalmente, se ha realizado una puesta a punto del método Quantum Dot aplicado a muestras de sangre de paciente crítico, con la finalidad de optimizar el proceso de determinación de cobre en el ámbito hospitalario, y hacerlo más ágil y operativo, con la finalidad de corregir a tiempo posibles deficiencias en éste mineral. Para ello se ha realizado un estudio comparativo con otros métodos de determinación de cobre. Los resultados ponen de manifiesto que el Quantum Dot es un método útil y eficaz en la determinación de cobre en muestras biológicas en una población que, por su situación crítica, requiere de protocolos efectivos que permitan el diagnóstico de deficiencias que podrán ser corregidas a tiempo de evitar sus consecuencias negativas.

Conclusión final

Dado los resultados obtenidos en el presente estudio, podemos concluir que existe una necesidad de determinar de una manera rápida y eficaz el cobre, como el QD, a nivel hospitalario dado el alto coste que en la actualidad conlleva, tanto económico como en tiempo, lo que contribuirá a la detección de deficiencias nutricionales en cobre en pacientes en los que su situación clínica deriva en alteraciones y sintomatología que generalmente se atribuye a otras causas o se desconocen.

La carencia de estudios recientes de valoración de estado nutricional de cobre, tanto en personas sanas como en pacientes hospitalizados, hace obligatorio el desarrollo de estudios que describan la situación actual de la prevalencia de deficiencia de cobre en la población.

THESIS ABSTRACT

Background

The critically ill patient is in a special situation, with hypercatabolism and a systemic inflammatory process (Systemic Inflammatory Response Syndrome, SIRS), that leads to an extra expense that can lead to deficiency of antioxidant micronutrients such as copper, and so the requirements vary in critical condition. A lack of this type increase oxidative stress, and antioxidant reserves deplete, and if not corrected in time, can trigger an increase in patient morbidity and poorer evolution during their stay in the ICU.

Therefore, it is necessary and mandatory in the protocol established in the Unit, the nutritional assessment of critically ill patients, especially in antioxidant nutrients such as copper, to mitigate the potential adverse effects resulting from its shortcomings, so the determination carried routine, agile and operational, in order to correct a possible deficiency in time.

Objective

The aim of this study is to evaluate copper nutritional status in critically ill patients who have SIRS, and optimizing the diagnosis of copper deficiency by Quantum Dot (QD) method.

Thesis Structure

The structure of this Thesis is based on 3 parts:

1. An initial study of nutritional assessment generally, and specifically in the antioxidant mineral copper. The results show insufficient supply values in a high percentage of the critical care population, finding significant differences with the healthy control group, and having copper deficiency in plasma and erythrocyte in a high percentage of patients, which negatively evolve during their 7 days of stay in ICU, being erythrocyte copper a more real biomarker for diagnosis of deficiency.

2. Then it has made a study of oxidative stress by the determination of copper-dependent antioxidant enzyme, superoxide dismutase, and total antioxidant power and its correlation with copper nutritional status. The results show significantly lower values of antioxidants in critically ill patients compared to control subjects, which worsen during the controlled ICU stay. Also, it has made a study of DNA damage by *comet* assay; we also observed its association with antioxidant status in critically ill patients at the end of the study.

3. Finally, it has been made an overhaul in application of the Quantum Dot method to samples in plasma and erythrocyte of critically ill patient, in order to optimize the process of determination of copper in the hospital, and make it more agile and operational, with the purpose of correcting any copper deficiency. For this we have made a comparative study with other methods for determination of copper. The results show that the Quantum Dot is a useful and efficient method for determination of copper in biological samples in a population, which, for their critical situation requires effective protocols that allow the diagnosis of failures that can be corrected in time avoid negative consequences.

Final Conclusion

Given the results obtained in the present study, we can conclude that there is a need to determine copper by a quick and efficient method, as the QD, in hospitals, because of the high cost that currently involves both economic and in time, that contribute to the detection of copper nutritional deficiencies in patients whose clinical condition results in alterations and symptoms generally attributed to other causes or unknown.

The lack of recent studies assessing copper nutritional status in both healthy individuals and in patients hospitalized mandates the development of studies that describe the current status of the prevalence of copper deficiency in the population.

Justificación, Hipótesis y Objetivos

JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En España, al igual que en la mayoría de los países desarrollados, se ha producido un notable cambio en los hábitos alimentarios como consecuencia del espectacular desarrollo económico y de las profundas transformaciones que se vienen produciendo en el aspecto sociocultural (Sánchez et al, 2010; Varela et al, 1995; MAPA, 2000). Los resultados obtenidos en numerosos estudios ponen de manifiesto una clara relación entre las enfermedades crónicas y los hábitos alimentarios. Es por ello por lo que la alimentación en el hombre constituye uno de los grandes campos de investigación en los países desarrollados (Thomson, 2004).

La Evaluación del Estado Nutricional de un determinado colectivo es, sin duda alguna, una excelente forma de relacionar los hábitos de una población con su estado de salud (Mataix et al, 2009). Además, los resultados obtenidos permitirán diseñar y planificar políticas nutricionales encaminadas a conseguir modelos de consumo alimentario más saludable.

El paciente crítico presenta una situación hipercatabólica y de alto grado de estrés quirúrgico, traumático o shock séptico, que puede derivar en malnutrición y complicarse con otras enfermedades o disfunciones. La lesión o la aparición de complicaciones pueden dar lugar a la generalización del proceso iniciándose el conocido Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SRIS), donde la generación de radicales libres de oxígeno es intensa. Esta reacción metabólica consume la reserva proteica orgánica determinando la disfunción de múltiples órganos que conlleva una altísima mortalidad.

El paciente en estado crítico presenta en general una alteración de los niveles de micronutrientes y entre ellos de algunos minerales indispensables para las funciones metabólicas del organismo, como es el caso del cobre.

El cobre es un ion metálico esencial para el organismo y el mantenimiento de la salud, que se encuentra presente en todos los tejidos del cuerpo humano, generalmente, formando parte de enzimas e interviene en el equilibrio de otros minerales como el cinc. Es esencial como protector frente el estrés oxidativo, en el sistema inmunológico y en la expresión génica en numerosos genes. El mantenimiento

de las concentraciones fisiológicas de cobre es esencial para prevenir enfermedades tales como la artritis reumatoide, la osteoporosis o la enfermedad de Wilson, así como para evitar o corregir una posible deficiencia y las alteraciones que desencadena.

Así, teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, se ha realizado en una población adulta sana y enferma crítica, la evaluación del estado nutricional de cobre y el posible riesgo de sufrir deficiencia, centrándonos en la optimización en la determinación analítica de cobre en sangre por diferentes métodos entre los que se incluyeron los empleados de forma habitual, como la espectroscopía de absorción atómica (FAAS) y espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS), cuyos resultados se comparan con los obtenidos aprovechando las propiedades fluorescentes de nanomateriales semiconductores, como los Quantum Dots (QD), que básicamente se resumen en un ancho espectro de absorción, un estrecho espectro de emisión, el rango de emisión dependiente del tamaño así como un tiempo de vida relativamente largo y un photobleaching inapreciable. A esto habría que añadir la ventaja que supone desde un punto de vista del análisis rutinario el uso de una técnica más sencilla, menos costosa y con un menor consumo de tiempo.

Por otro lado, la asociación del estatus de cobre con otros parámetros bioquímicos, como los biomarcadores de estrés oxidativo, con el daño en ADN y parámetros clínico-nutricionales, nos puede proporcionar información de la importancia de monitorizar y mantener los niveles de cobre tanto en poblaciones en situaciones fisiológicas como patológicas crónicas y agudas.

Hipótesis del estudio:

Los pacientes críticos con SRIS presentan deficiencia de cobre desde el ingreso en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI), y empeoran durante su estancia, tanto debido a su aporte insuficiente como a su situación hipercatabólica y de alto estrés oxidativo, causando daño en ADN y complicando su morbimortalidad y evolución, de ahí la importancia de optimizar la metodología de evaluación del estatus en este mineral.

Según lo anteriormente comentado, los objetivos del presente estudio son:

- Valorar el estado nutricional general de pacientes críticos ingresados en la UCI, comparando con un grupo de personas sanas.
- Valorar el estado nutricional en cobre de pacientes críticos y su evolución durante 7 días en UCI, mediante la determinación por diferentes métodos analíticos: FAAS, QD, ICP.
- Estudiar la asociación con otros parámetros clínico-nutricionales y biomarcadores de estrés oxidativo, así como con el daño de ADN.

Antecedentes Bibliográficos

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

A través del tiempo, la ciencia se ha encargado de demostrar la importancia de la nutrición para el buen funcionamiento del cuerpo humano. La nutrición es una de las áreas más complejas a nivel de la salud, ya que son muchos componentes los que están involucrados, y porque cada persona tiene necesidades individuales.

La **nutrición** suele definirse como la suma total de los procesos implicados en la ingesta y utilización de sustancias alimentarias por parte de los seres vivos, es decir, la ingestión, la digestión, la absorción y el metabolismo de los alimentos.

El objetivo de los alimentos que tomamos es proporcionarnos la diversidad de nutrientes que necesitamos, siendo éstos sustancias específicas que realizan una o más funciones fisiológicas o biomecánicas en nuestro cuerpo.

El **estado nutricional** es la situación en la que se encuentra una persona en relación con la ingesta y adaptaciones fisiológicas que tienen lugar tras el ingreso de nutrientes. La evaluación del estado nutricional será, por tanto, la acción y efecto de estimar, apreciar y calcular la condición en la que se halla un individuo según las modificaciones nutricionales que se hayan podido producir.

La **evaluación nutricional** mide indicadores de la ingesta y de la salud de un individuo o grupo de individuos, relacionados con la nutrición. Es importante, por tanto, porque pretende identificar la presencia, naturaleza y extensión de situaciones nutricionales alteradas, las cuales pueden oscilar desde la deficiencia al exceso. Para ello se utilizan métodos médicos, dietéticos, exploraciones de la composición corporal y exámenes de laboratorio que identifiquen aquellas características que en los seres humanos se asocian con problemas nutricionales. Con ellos es posible detectar a individuos malnutridos o que se encuentren en situación de riesgo nutricional.

De este modo, con una correcta evaluación del estado nutricional podremos corregir a tiempo estas situaciones antes de la aparición de afecciones o empeoramiento de las ya existentes.

1. EVALUACIÓN DEL ESTADO NUTRICIONAL

La evaluación del estado nutricional de un individuo tiene como objetivo poder diagnosticar determinadas situaciones tanto de deficiencias como de excesos, que son los responsables de la aparición de síntomas que normalmente se atribuyen a otras causas o se desconocen.

La situación de deficiencia nutricional que se detecta en un individuo mediante la valoración nutricional, puede aparecer en diferentes grados, que se manifiestan en diferentes signos que complican progresivamente el estado de salud.

1.1. Situación de déficit nutricional

Según el grado de deficiencia nutricional en el que se encuentre el individuo, se emplearán protocolos de tratamiento nutricional o clínico diferentes, siempre que sea posible corregir. En la figura 1 se muestran las diferentes fases en el establecimiento de la deficiencia severa.

1.2. Valoración bioquímica del estado nutricional

La evaluación bioquímica pretende conocer a nivel plasmático o celular las concentraciones o cantidades de los nutrientes y la situación de las funciones metabólicas en las que están implicados (Mataix et al, 2007).

La evaluación puede ser distinta según el estado nutricional del individuo. En la situación de depleción de los depósitos tisulares o celulares hasta límites del agotamiento, no existen niveles disminuidos de nutrientes como para que se vea afectado el metabolismo y la funcionalidad celular.

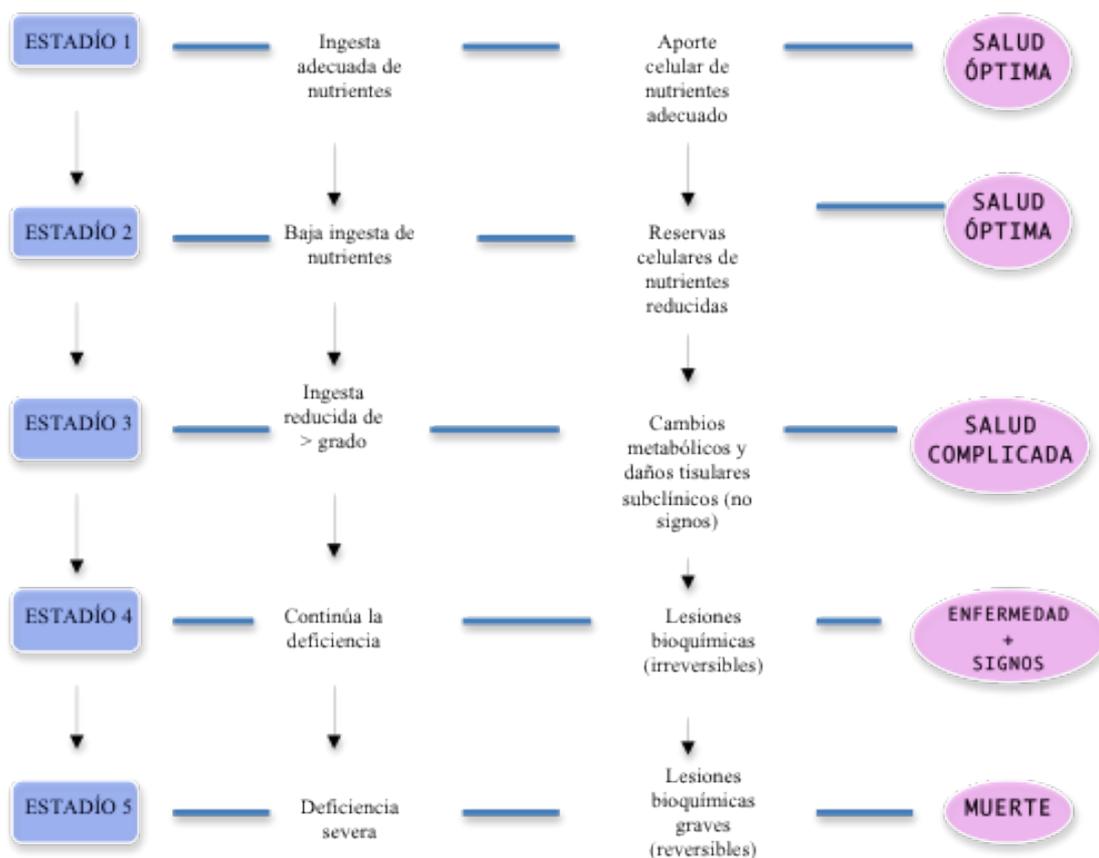


Figura 1. Fases en el establecimiento de una deficiencia

En esta situación, la determinación de los niveles de reserva, se puede realizar tanto en tejidos de depósito como el hígado o el tejido adiposo (lo que exige biopsia, por lo que descartamos este método en algunos casos), como a nivel celular, ya que existen células en distintos tejidos donde pueden medirse las concentraciones de un nutriente, pero elegiremos por accesibilidad las células sanguíneas como hematíes y leucocitos.

Los niveles circulantes (en sangre) del nutriente indican en general una posible deficiencia, ya que disminuyen cuando hay una ingesta reducida y una demanda celular existente que impide que el nivel aumente.

La deficiencia nutricional conduce a una disminución del nivel de un nutriente o algún metabolito en orina, ya que existen menores niveles circulantes en sangre y

puede también aumentar la reabsorción tubular renal del nutriente en cuestión; por ejemplo: tiamina, riboflavina.

Se encuentran en pleno desarrollo las determinaciones de oligoelementos. Las determinaciones de otras vitaminas como biomarcadores del estado nutricional del individuo, ya sea sano o enfermo, mediante métodos más complicados como es el método enzimático mediante el cual se analiza el piridoxal fosfato, hace casi inviable la puesta en práctica de su empleo dentro de los protocolos de actuación rutinarios en la valoración del estatus nutricional.

En situaciones en las que los niveles corporales son inferiores a los requerimientos, la consecuencia de la deficiencia nutricional es una menor eficacia de las rutas metabólicas, lo que puede traducirse en un malfuncionamiento en su totalidad, o durante el tiempo adecuado. Se ponen en funcionamiento vías alternativas.

1.2.1. Determinaciones características (Mataix, 2007)

Determinación de niveles de reserva: Aparece una disminución más acusada de depósitos o niveles celulares del nutriente.

Determinación de niveles de metabolitos: Aumentan los niveles de metabolitos previos al lugar donde el nutriente ejerce su función metabólica y/o se incrementan algunos metabolitos de rutas alternativas a partir de aquéllos previos a la etapa afectada.

Determinación de actividades enzimáticas: Nutrientes como vitaminas actúan como coenzimas, pudiendo diversas enzimas tener la misma vitamina como coenzima, lo que nos permite elegir método de evaluación vitamínico según la enzima más adecuada; la deficiencia del nutriente afecta especialmente a la actividad enzimática en el sentido de disminución, por lo que la medición de actividad enzimática es muy útil en la valoración de algunas deficiencias nutricionales.

Las actividades enzimáticas se miden en células sanguíneas por su relativa fácil accesibilidad.

Determinación de niveles sanguíneos de componentes con significación fisiológica: Método basado en la estimación de sustancias con funciones fisiológicas concretas y cuya síntesis depende directamente de un adecuado aporte de nutrientes; es el caso de la determinación de proteínas plasmáticas como medida de la cantidad de la proteína visceral, creatina respecto a la proteína muscular, etc.

Determinación de lesiones celulares relacionadas directamente con un déficit nutricional: Es el caso del estudio de formas eritrocitarias anormales de la médula ósea en las deficiencias de hierro, vitamina B₁₂ y folatos. Gran parte de estos métodos indican una función alterada y complementan a los anteriores métodos, que detectan ingestas reducidas o depleción celular de un nutriente concreto.

1.2.2. Marcadores específicos en la evaluación bioquímica del estado nutricional (Mataix, 2007)

PROTEÍNAS

- *Proteína corporal:*

Incluye proteína muscular y proteína visceral; ambas se ven influenciadas por la nutrición; en la valoración nutricional se requieren métodos diferentes:

- indicando ingesta reducida → urea urinaria.
- indicando función alterada ó depleción celular → balance de N, creatinina urinaria, albúmina, transferrina, prealbúmina y proteína transportadora de retinol sérico.
- métodos suplementarios → aminoácidos plasmáticos en ayunas.

- *Proteína visceral:*

La medición de su pérdida o recuperación es muy importante especialmente a nivel hospitalario; se acude a la medición de proteínas plasmáticas sintetizadas en hígado. La elección de éstas se hace en función de su vida media (corta) y que la

concentración en sangre no sea muy elevada, así sus niveles se ven afectados sensiblemente tanto en la pérdida de proteína visceral como de repleción.

La **albúmina** es de síntesis exclusivamente hepática. Su vida media es de 20 días, por lo que carece de utilidad como marcador de desnutrición aguda, sin embargo, tiene gran valor en el pronóstico. Para su correcta valoración hay que tener en cuenta situaciones (postoperatorio, quemaduras, enteropatías con pérdida proteica, proteinuria, hepatopatías, hipotiroidismo, hiperhidratación, etc.) que disminuyen sus niveles. Las transfusiones (sangre o plasma) aumentan los niveles séricos de albúmina.

La **transferrina** es de vida media más corta, 7-10 días. La síntesis es fundamentalmente hepática, transporta hierro y sus niveles dependen de la ferritina. Su concentración puede variar por diversas situaciones. Disminuye en procesos agudos, anemia de procesos crónicos, anemia perniciosa, sobrecarga de hierro, hepatopatías, síndrome nefrótico, enteropatía con pérdida de proteínas y tratamiento esteroideo. Puede haber niveles aumentados en anemia ferropénica, tratamiento estrogénico e hipoxemia.

En cuanto a la **prealbúmina**, su vida media es de 2-3 días, es un buen indicador nutricional excepto en situaciones de insuficiencia hepática y estrés agudo (infecciones, traumatismos, etc.). Sus niveles aumentan en la insuficiencia renal.

La **proteína ligada al retinol** (PLR) tiene una vida media muy corta (10-12 horas). Observamos niveles alterados en las mismas situaciones que la prealbúmina. Ambas proteínas son buenos marcadores de las alteraciones nutricionales agudas y de gran utilidad en la valoración de la eficacia a corto plazo del soporte nutricional instaurado.

- *Proteína muscular:*

Índice creatinina-altura

La creatinina es un metabolito de la creatina. Su eliminación urinaria es proporcional a la masa muscular corporal total. El índice creatinina-altura (ICA) valora el compartimento proteico muscular y compara la creatinuria de un paciente en 24

horas con la atribuida teóricamente a un paciente de altura semejante y peso ideal
 $ICA (\%) = (\text{creatinuria en 24 h} / \text{creatinuria ideal}) * 100$.

Debido a las variaciones diarias en la creatinuria y la dificultad que siempre entraña la recogida de orina de 24 horas es recomendable realizar la recogida tres días y determinar la media.

Consideramos desnutrición leve ($ICA < 80\%$), moderada ($ICA = 60\% - 80\%$) y grave ($ICA \leq 60\%$). Es un parámetro que disminuye en la insuficiencia renal y que aumenta con el ejercicio intenso, la ingesta de carne poco cocida y en los tratamientos con esteroides.

Balance nitrogenado

El balance nitrogenado (BN) se utiliza para valorar los requerimientos proteicos y el efecto del soporte nutricional (Mataix et al, 2007). El nitrógeno urinario, sobre todo en forma de urea, representa la mayor parte del nitrógeno eliminado.

$$BN = (IP / 6.25) - (NU + 4)$$

BN= balance de nitrógeno (g/día).

IP= ingesta proteica (g/día).

UN= nitrógeno ureico (g/día).

El valor 4 resulta de la suma de 2 g de pérdidas nitrogenadas por heces y sudor, y 2 g de nitrógeno no proteico (ácido úrico, creatinina). Un balance negativo nos indica depleción proteica, mientras que si es positivo conlleva una repleción proteica.

2. COBRE

Los iones metálicos son componentes fundamentales de aproximadamente un 30-35% de las proteínas (Fraústo da Silva y Williams, 2001) de modo que la presencia de los metales es indispensable en prácticamente la totalidad de los procesos biológicos: metabolismo, transferencia energética, expresión de genes, señales celulares, formación del endo y exoesqueletos y transferencia electrónica (Kaim y Schwederski, 1994; Fraústo da Silva y Williams, 2001).

El cobre es un ion metálico esencial para el organismo y el mantenimiento de la salud, que se encuentra presente en todos los tejidos del cuerpo humano, generalmente, formando parte de enzimas e interviene en el equilibrio de otros minerales como el cinc.

2.1. Participación del cobre en diferentes procesos

El cobre es esencial como protector frente el estrés oxidativo, en el sistema inmunológico y en la expresión génica en numerosos genes (Wachnik, 2006). El mantenimiento de las concentraciones fisiológicas de Cu^{2+} es esencial para prevenir enfermedades tales como la artritis reumatoide, la osteoporosis o la enfermedad de Wilson, así como para evitar o corregir una posible deficiencia y las alteraciones que desencadena.

La alteración de la homeostasis celular en relación con el contenido de cobre parece ligada a enfermedades neurodegenerativas (Halliwell y Gutteridge, 1984; Hu et al, 1990; Barceloux, 1999; Hand book of Metalloproteins, 2001; Tapiero et al, 2003; Buijn et al, 2004; Barnham et al, 2004; Brown y Kozlowski, 2004).

El Cu^{2+} es, desde el punto de vista fisiológico, un importante ion metálico que juega un papel central en la síntesis de la hemoglobina, elastina, colágeno y es, así mismo, fundamental en la defensa frente al exceso de radicales libres en el organismo y de colesterol (Wachnik, 2006). El mantenimiento de las concentraciones fisiológicas de Cu^{2+} es esencial para prevenir enfermedades tales como la artritis reumatoide, la osteoporosis o la enfermedad de Wilson. Esto justifica la necesidad de determinar la

concentración de cobre sobretodo para detectar la aparición de estas patologías lo más tempranamente posible.

2.1.1. Cobre y estrés oxidativo

El cobre presenta un rol antioxidante esencial a través de diferentes enzimas implicadas en el estrés oxidativo, ayudando a neutralizar radicales libres producidos durante los principales procesos metabólicos que se llevan a cabo en el organismo. Las principales enzimas implicadas en la protección del daño oxidativo y que son dependientes de cobre son las siguientes:

- Superóxido dismutasa (SOD): protege del daño causado por la oxidación. Existen elevadas concentraciones en cerebro, tiroides e hígado.
- Lisil-oxidasa: es necesaria para mantener la estabilidad del tejido conectivo. Una menor actividad de esta enzima puede provocar una serie de anomalías estructurales en muchos tejidos.
- Citocromo C oxidasa: cataliza la reducción de oxígeno a peróxido de hidrógeno durante la respiración celular. Presenta una mayor actividad en corazón, cerebro e hígado.

Sin embargo, la potente capacidad óxido-reductora del cobre, esencial para las funciones metabólicas del organismo, puede originar efectos tóxicos (Camakaris et al, 1999; Barnham et al, 2004; Davis y O'Halloran, 2008; Que et al, 2008). Esta posible actividad tóxica hace imprescindible que la célula regule la presencia de cobre de forma que sólo pueda desarrollar sus funciones beneficiosas. Así, controlando la homeostasis del cobre, se evita que intervenga en la producción de un exceso de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (Barnham et al, 2004; Schlieff y Gitlin, 2006; Cobine et al, 2006; Turski y Thiele, 2009).

2.1.2. Cobre y Sistema Nervioso

En el sistema nervioso el cobre es necesario para la formación y mantenimiento de la mielina. A su vez, las enzimas dependientes de este mineral son importantes para la síntesis de neurotransmisores. También está implicado en la síntesis de noradrenalina.

Pickart et al (2012) indican que, además de la incuestionable esencialidad del cobre, la alteración en los niveles iónicos de cobre pueden incrementar el daño oxidativo. Se sabe que la proteína precursora amiloide (APP) implicada en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, puede convertir el Cu (II) en Cu (I), incrementando de manera potencial el daño oxidativo (Prodan et al, 2009; Juhasz-Pocsine et al, 2007).

Además, muchos autores sugieren que la deficiencia de cobre es un factor que contribuye en la enfermedad de Alzheimer y, posiblemente, otros desórdenes neurodegenerativos (Doraiswamy et al, 2004; Akatsu et al, 2012)

2.1.3. Cobre y Sistema cardiovascular

El cobre se considera importante para la mantener la integridad del corazón. Un déficit de éste puede dar lugar a cambios anatómicos relacionados con el colágeno, produciéndose degeneración de arterias, distensión cardíaca, aneurismas ventriculares.

Se ha observado que hombres que consumen una dieta pobre en cobre presentan mayor frecuencia de arritmias cardíacas.

Afecta, además, al metabolismo del colesterol de modo que una baja concentración de cobre en la dieta dará lugar a unos mayores niveles de LDL-colesterol y menores niveles de HDL-colesterol.

Por otro lado interviene en una normal coagulación sanguínea ya que ciertos factores sanguíneos dependen del cobre y permiten un correcto funcionamiento.

Un desequilibrio en el metabolismo del cobre puede derivar en la aparición de hipercolesterolemia (Klevay, 2000). Por otra parte, aunque el mecanismo no es conocido con detalle, hay una clara evidencia de que el ion cobre puede oxidar in vitro a las lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Steinbrecher et al, 1984; Heinecke et al, 1986; Leake y Rankin, 1990; Kritharides et al, 1995; Xing et al, 1998) de forma similar a como ocurre en la oxidación celular (Berliner y Heinecke, 1996). Incluso es conocido que el ion cobre es en ese sentido aún mejor oxidante que el hierro (Esterbauer et al, 1992). Estos datos de la oxidación in vitro unidos a la presencia del ion cobre en las lesiones ateroscleróticas (Smith et al, 1992; Swain y Gutteridge, 1995; Lamb et al, 1995), así como el hecho de que el cobre unido a la proteína transportadora ceruloplasmina, pueda catalizar la oxidación de LDL (Ehrenwald et al, 1994; Lamb y Leake, 1994; Leake, 1997), sugieren la implicación del cobre en procesos ateroscleróticos (Berliner y Heinecke, 1996; Ferns et al, 1997; Steinberg, 1997).

2.1.4. Cobre, hierro y anemia

El cobre ayuda a convertir el hierro férrico en hierro ferroso, forma más fácilmente absorbible en el organismo. Por otro lado ayuda al transporte de hierro desde los tejidos y hacia éstos. Por esto, a veces, la causa de anemia no es el déficit de hierro sino de cobre.

Además, promueve la formación de hemoglobina y glóbulos rojos para el transporte de oxígeno. Tiene una función importante en la hematopoyesis.

2.1.5. Cobre y Salud ósea

A través de la enzima lisil-oxidasa, dependiente de cobre, se consigue un tejido conectivo más flexible y resistente debido a la formación de puentes entrecruzados. También refuerza la masa ósea. De este modo, una deficiencia de cobre puede provocar ciertas anomalías en el esqueleto, osteoporosis y otras deformidades en venas, corazón, etc.

2.1.6. Cobre y Sistema Inmunológico

El sistema inmunológico requiere de la presencia de cobre para llevar a cabo todas sus funciones. Por tanto, un déficit de cobre puede dar lugar a un efecto sobre poblaciones de leucocitos, concretamente de neutrófilos y macrófagos, y por otro lado, provocar neutropenia.

2.1.7. Otros procesos

El cobre interviene en la transformación de melanina para la pigmentación de la piel y además influye sobre la expresión de muchos genes. Presenta también un rol importante en la cicatrización de heridas.

2.2. Metabolismo del cobre

La homeostasis del cobre se produce regulando su excreción y no su absorción. La mayoría del cobre presente en los alimentos se encuentra en estado Cu^{2+} . Su digestión es necesaria para liberar el cobre antes de su absorción.

El cobre se absorbe a nivel del intestino delgado y, en menor grado, en el estómago. La eficiencia de la absorción intestinal es del 55-75% y la fracción de cobre que se absorbe es regulada para mantener la homeostasis. La mayor parte de la excreción se produce por vía biliar, pero pequeñas cantidades se excretan también por orina, sudor y menstruación (Mason, 1979).

La absorción (figura 2) se produce a través de los transportadores ATP7A y ATP7B, expresados en los enterocitos, y es transportado al hígado, principal órgano en la homeostasis del cobre, unido a la albúmina o “transcupreína” en forma de Cu^{2+} , pero debe reducirse a Cu^+ antes de su reabsorción hepática. En el hígado se incorpora a la ceruloplasmina, saliendo al exterior unido a ésta e introduciéndose de este modo en los tejidos periféricos. La ceruloplasmina se une a sus receptores en la superficie de las células, entrando el cobre en su interior una vez haya sido liberado de su proteína de unión.

Existen dos mecanismos implicados: un sistema de transporte activo saturable, y una difusión pasiva que se activa cuando los niveles de ingesta son elevados. Normalmente, la absorción intestinal varía, aumentando cuando la ingesta de cobre disminuye y a la inversa. Por tanto, el porcentaje de cobre absorbido depende de su disponibilidad en la dieta y de la situación en que se encuentren los depósitos endógenos del organismo. La eficiencia de absorción cambia con el fin de regular esos depósitos, en un proceso mediado principalmente por la excreción. Como ya he mencionado anteriormente, esta excreción se lleva a cabo principalmente por la bilis, de manera que la cantidad de cobre excretado es directamente proporcional a la reserva de los hepatocitos.

El transporte es independiente de la energía y está estimulado por el pH ácido a nivel extracelular y por las altas concentraciones de potasio (K^+).

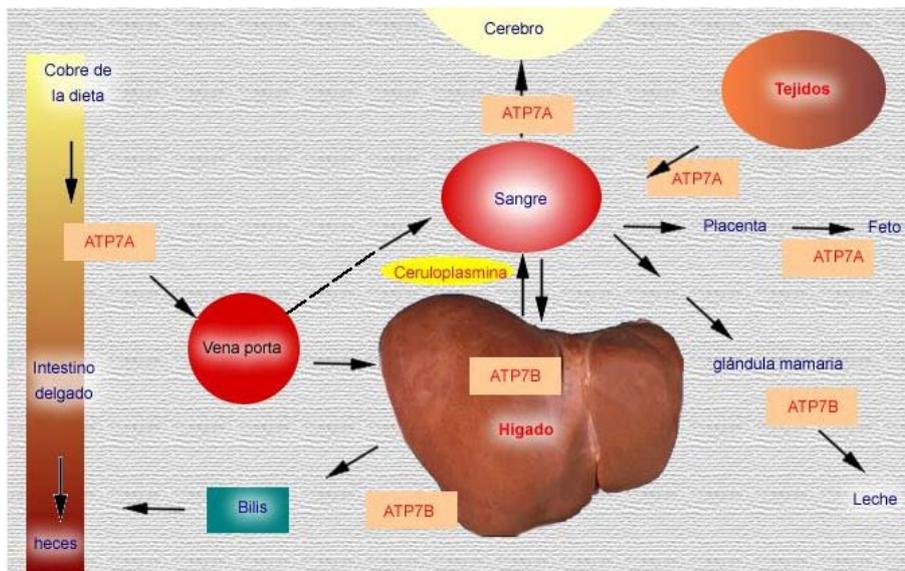


Figura 2. Metabolismo del cobre en el organismo.

Los factores dietéticos que influyen negativamente en la absorción de cobre son la presencia de fitatos, la fibra, las dosis grandes de gluconato cálcico, el molibdeno, y grandes dosis de vitamina C.

Además, existe una serie de condiciones que predisponen a la malabsorción de cobre. Durante décadas se han documentado casos de deficiencia de cobre adquiridas

bajo condiciones clínicas que producen un descenso en la absorción del cobre, secundaria al síndrome de malabsorción. Allen et al (1984) y, posteriormente, Botash et al (1992), demostraron que uno de los factores más importantes que pueden predisponer a una malabsorción de cobre es una ingesta excesiva de cinc. Debido a las propiedades fisicoquímicas tan similares entre cobre y cinc, una elevada ingesta de cinc o una elevada relación Zn/Cu, se reconoce que interfieren en el metabolismo del cobre. Posibles mecanismos incluyen que esta interferencia puede llevarse a cabo a nivel del “borde en cepillo” del enterocito. Por otro lado, Hascke et al (1986) observaron una interacción entre el hierro y el cobre y, más recientemente, Barclay et al (1992) prestaron atención a la importancia de las interacciones entre estos dos minerales.

Por otro lado, en el riñón se filtra a nivel glomerular y se reabsorbe en los túbulos (en casi su totalidad), excretándose sólo un 1%. Existen condiciones que predisponen a la pérdida excesiva de cobre. Esta pérdida puede afectar al estatus de cobre bajo varias circunstancias clínicas. Estudios de Pedraza-Chaverri et al (1994) indicaban que las pérdidas urinarias de cobre unido a ceruloplasmina, probablemente juegan un rol significativo en la predisposición de pacientes con síndrome nefrótico a la deficiencia de cobre.

2.3. Fuentes y biodisponibilidad

Las mayores concentraciones de este mineral las podemos encontrar en cereales integrales, frutos secos, algunos tipos de queso y leguminosas. También existe en menor cantidad en hígado, pescado y marisco, verduras, frutas, cacahuete y chocolate. En la tabla I podemos observar los alimentos con mayor contenido en cobre por 100 g de alimento.

Los suplementos de cobre no deben contener más del 100% de la ingesta diaria recomendada y siempre ha de ser bajo prescripción médica ya que existen algunas patologías asociadas al exceso de cobre en el organismo.

ALIMENTO (100g)	CONTENIDO (mg)	ALIMENTO(100g)	CONTENIDO (mg)
Pan integral	320	Espárragos	100
Pan blanco	170	Hígado	2822
Pasta	120	Setas	11
Sémola	189	Foie-gras	390
Queso Emmental	1170	Almejas, ostras	343
Cacao en polvo	1100	Anchoas	210
Chocolate leche	400	Atún	130
Galletas María	120	Higos secos	312
Acelgas	250	Almendras	1107
Peras	113	Avellanas	1530
Berenjenas	112	Cacahuete	670
Espinacas	128	Nueces	2250

Tabla I. Contenido de cobre en μg por 100 g de alimento.

2.4. Requerimientos

A través de los alimentos y mediante el consumo de una dieta equilibrada, se pueden aportar unos 2 mg/día. La ingesta media según el Institute of Medicine (2002), está estimada en 1-1.6 mg/día.

Las recomendaciones, según Food and Nutrition Center of the Institute of Medicine, varían dependiendo de la edad fisiológica de los individuos. De este modo se propuso la siguiente tabla (Tabla II):

GRUPO DE EDAD	RECOMENDACION (mg/día)	LIMITE SUPERIOR (mg/día)
0-6 meses	0.20	-
7-12 meses	0.22	-
1-3 años	0.34	1.0
4-8 años	0.44	3.0
9-13 años	0.70	5.0
14-18 años	0.89	8.0
≥ 19 años	0.90	10.0
Embarazo	1.00	10.0
Lactancia	1.30	10.0

Tabla II. Recomendaciones de cobre (Food and Nutrition Center of Institute of Medicine).

Por otro lado, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la recomendación correspondería a 1-1.4 mg/día en adulto sano.

En cuanto a las Recommended Dietary Allowances o Ingestas Diarias Recomendadas (RDA), podemos diferenciar tres grupos diferentes de población. La RDA para adulto sano es de 0.9 mg/día, 1 mg/día en embarazadas y 1.3 mg/día en lactantes.

De este modo, la ingesta máxima tolerable (UL) asciende a 10 mg/día en el caso de la mujer y a 12 mg/día en el caso del hombre.

2.5. Deficiencia de cobre

El contenido corporal de cobre en el adulto es de aproximadamente 50-120 mg (Turnlund et al, 2005). El cobre se encuentra en altas concentraciones en hígado, y cerebro, y, en menor cantidad, en riñón, corazón y páncreas (Mason, 1979), órganos de gran actividad metabólica. En el músculo lo encontramos en menor cantidad pero constituye una buena reserva ya que supone una masa considerable, aproximadamente un 40%. También podemos encontrarlo en bazo, huesos, sistema nervioso central y algunas proteínas plasmáticas. Más del 90% de cobre de la sangre se encuentra unido a la ceruloplasmina. El resto está unido a la albúmina y a aminoácidos.

El cobre se encuentra en menor cantidad que otros minerales, como el hierro o el cinc, pero es de gran importancia y biodisponibilidad ya que el organismo tiene mucha capacidad para absorber este mineral.

Un adulto sano presenta un contenido corporal de, aproximadamente, 1.4-2.1 mg/kg de peso. En cuanto a los niveles sanguíneos de cobre, podemos encontrar en plasma entre 0.70-1.40 mg/L en hombres y 0.85-1.55 mg/L en mujeres. En eritrocitos la cantidad varía, 10-20 mmol/L. Por otro lado, en órganos se encuentran cantidades de, aproximadamente, 6.4 mg/kg.

Teniendo en cuenta la biodisponibilidad del cobre, su absorción, distribución y eliminación, podemos definir una serie de afecciones o patologías debidas al déficit de este mineral, que se detecta principalmente en hígado.

La deficiencia de cobre normalmente es consecuencia de la disminución de los depósitos de cobre en el nacimiento, una inadecuada ingesta dietética de cobre, una pobre absorción, elevados requerimientos inducidos por un rápido crecimiento o unas pérdidas incrementadas.

También existen condiciones que pueden requerir un aumento de las necesidades de este mineral, como por ejemplo, quemaduras, diarreas, enfermedad intestinal, enfermedad renal, enfermedad del páncreas, extirpación del estómago, estrés a largo plazo, etc.

Las enfermedades relacionadas con el cobre están asociadas fundamentalmente a su deficiencia. Actúa como cofactor crítico cuando se incorpora a cuproenzimas específicas que catalizan reacciones de transferencia de electrones necesarias para la respiración celular, oxidación del hierro, formación de pigmentos, biosíntesis de neurotransmisores, defensa antioxidante y formación de tejido conectivo. La deficiencia de cobre está asociada a manifestaciones clínicas específicas (Madsen et al, 1998) como anemia, neutropenia y anormalidades óseas.

Dentro de las enfermedades ligadas a deficiencia de cobre debemos mencionar la Enfermedad de Menkes, enfermedad genética de carácter autosómico recesivo ligada al cromosoma X, que se traduce en una mala absorción de cobre, aumento de las pérdidas urinarias y transporte defectuoso hacia los distintos órganos, tejidos y células. Los principales signos de esta patología son un retraso en el crecimiento, defectos en la pigmentación y queratinización del cabello, degeneración de la elastina y deterioro mental progresivo. Se caracteriza además por la falta de enzimas que permiten la absorción y el transporte de cobre al interior de las células. Se produce una acumulación de este metal a nivel intestinal pero los niveles de ceruloplasmina son bajos.

La deficiencia de cobre adquirida produce un conjunto de manifestaciones hematológicas que incluyen la anemia, granulocitopenia y desplazamientos hacia la

izquierda de las curvas de maduración granulocíticas y eritrocitarias con precursores vacuolados y sideroblastos anillados en la médula ósea (Dunlap et al, 1974; Summerfield et al, 1992; Fiske et al, 1994; Willis et al, 2005).

Las manifestaciones neurológicas en humanos producidas por la deficiencia de cobre adquirida han sido objeto de estudio desde hace relativamente poco tiempo. La patología más común es una mielopatía que se presenta con movimientos espásmicos y ataxia sensorial (Schleper y Stuerenburg, 2001; Kumar et al, 2003a, 2003b, 2004a, 2004b, 2004c, 2004d, 2005, 2006; Hedera et al, 2003; Greenberg y Briemberg, 2004; Prodan et al, 2004; Rowin y Lewis, 2005). Así mismo, se han descrito otras manifestaciones tales como neuropatía periférica aislada (Gregg et al, 2002), desmielinización del sistema nervioso central (Prodan y Holland, 2000; Prodan et al, 2004), miopatía (Kumar et al, 2004b) y neuritis óptica (Gregg et al, 2002). La asociación de estas patologías a la deficiencia adquirida de cobre, no está establecida de una forma inequívoca.

En resumen, la deficiencia de este mineral puede originar:

- Anemia.
- Hipercolesterolemia, potenciando así una patología cardiovascular.
- Alteraciones óseas.
- Reducción de glóbulos rojos.
- Pérdida de color del cabello.
- Piel pálida por falta de pigmentación.
- Calvicie.
- Mala cicatrización de las heridas.
- Fibrosis miocárdica.
- Cirrosis hepática.
- Raquitismo.
- Disminución de la enzima citocromo C oxidasa en hígado, músculo y tejido nervioso, ya que esta enzima desempeña una función en la mielogénesis por fosforilación oxidativa.
- Disminución de la catalasa, aumentando de este modo la producción de peróxido de hidrógeno, potencial cancerígeno.

En casos extraordinarios, algunos individuos pueden estar genéticamente predispuestos a un trastorno relacionado con el cobre. Sin embargo, existe una preocupación por una deficiencia marginal de cobre, es decir, niveles que no son tan severos como para causar manifestaciones clínicas, ya que ésta podría impedir una salud normal en formas tan sutiles como menor resistencia a las infecciones, problemas en el sistema reproductor, fatiga general o debilitamiento o impedimento de la función cerebral.

La deficiencia de cobre provoca una acumulación de peróxidos lipídicos arteriales, debido posiblemente al descenso de la actividad de la Cu/Zn-SOD (Magalova et al, 1994). Muchos de los efectos patológicos de la sobrecarga de cobre, sin embargo, son un daño oxidativo de las membranas o macromoléculas (Fernset al, 1997). La ingesta de cobre ha demostrado efectos tanto pro-oxidantes como antioxidantes; la ceruloplasmina, principal proteína que contiene el cobre plasmático, puede actuar a su vez como antioxidante (AO) o pro-oxidante, dependiendo de las condiciones ambientales (Ferns et al, 1997). Por tanto, el rol definitivo del cobre en los procesos oxidativos es todavía un tema de debate.

La hipótesis del Zn/Cu propuso un aumento del riesgo aterosclerótico en situación de deficiencia de cobre debido a hipercolesterolemia (Klevay, 2000).

Por otro lado, existen una serie de situaciones que provocan un déficit de este mineral, como son:

- Pacientes alimentados a través de nutrición parenteral.
- Pacientes con diálisis renal.
- Niños prematuros.
- Problemas genéticos.
- Consumo excesivo de cinc, hierro o antiácidos.
- Diarrea crónica, lo que disminuye la actividad de la ceruloplasmina en el suero paralelo a una disminución de cobre (sobre todo en lactantes).
- Enfermedad de Menkes, caracterizada por una disminución en la absorción de cobre.
- Kwashiorkor o marasmo, produciendo deficiencia en hígado y sangre.

- Infantes alimentados con leche de vaca (ingesta menor a 48 mg/día/kg peso de cobre).
- Nefrosis, con exceso de pérdida urinaria de ceruloplasmina.
- Síndrome de malabsorción intestinal.

3. PACIENTE CRÍTICO

“Se denomina paciente crítico aquel enfermo cuya condición patológica afecta a uno o más sistemas, que pone en serio riesgo actual o potencial su vida y que presenta condiciones de reversibilidad, que hacen necesaria la aplicación de técnicas de monitorización, vigilancia, manejo y soporte avanzado”.

Hace más de 2.300 años los médicos egipcios percibieron que algunos de sus enfermos sufrían deficiencias nutricionales. Estos curadores administraban a sus pacientes enemas e irrigaciones nutritivas. Los médicos griegos adoptaron las mismas costumbres y administraron de irrigaciones rectales compuestas por vino, suero, leche, tisana y caldo de escanda.

Aquapendente (1617) describió la alimentación forzada y dibujó una sonda nasogástrica.

En 1879, Bliss expuso los beneficios de la alimentación por vía rectal a través de una sonda rectal y una jeringa.

En 1770, Hunter sin embargo defendía la vía gástrica o colónica.

En 1939, Elman y Weiner describieron la nutrición parenteral con una solución de hidrolizado de caseína administrada a través de una punción venosa.

Wilmon et al en 1968 y Daily et al en 1970 diseñaron los procedimientos para la administración de nutrientes con ayuda de sistemas venosos de alto flujo. Esta estrategia evitaba las trombosis y esclerosis que impedía a los clínicos administrar soluciones de hidrolizado de caseína a través de las venas periféricas (Klein, 1997).

Aunque ninguna de las vías parecía adecuada para satisfacer las necesidades nutricionales de forma completa, la idea de combinar distintos métodos anticipaba los progresos a los que asistimos en la actualidad. Por el contrario, los esfuerzos de Bistran et al produjeron cambios más rápidos. Estos autores demostraron la necesidad de evaluar el estado nutricional de los pacientes hospitalizados y su trabajo despertó la conciencia de que la nutrición influía beneficiosamente en la recuperación de los pacientes (Casanova et al, 1997; Monterrey et al, 2001; García, 1997).

La combinación de las técnicas de identificación de los pacientes que necesitan soporte nutricional con las herramientas que permiten una intervención satisfactoria permitió el diseño de una estructura sobre la cual establecer una investigación clínica en nutrición. De los beneficios de la vía parenteral para la administración de nutrientes, las investigaciones evolucionaron hacia una apreciación de las ventajas fisiológicas y nutricionales de la alimentación enteral. Las soluciones de proteínas hidrolizadas administradas por vía endovenosa fueron sustituidas por soluciones formadas casi exclusivamente por aminoácidos purificados. Esto sucedió en un momento en el que se defendía el uso de soluciones enterales complejas o de oligopéptidos, con preferencia a las preparaciones enterales elementales (Bernstein, 1994; Woodcock et al, 2001; Gómez, 2001).

En la actualidad las normas y el 42% de las recomendaciones para la nutrición parenteral y enteral en adultos y niños se basan en estudios clínicos controlados y aleatorizados. Otro 26% de las normas se apoyan en estudios no controlados y las prácticas restantes proceden del consenso o de la opinión de expertos (Blesa, 2001).

3.1. Situación clínica y nutricional del paciente

El paciente crítico es un individuo que presenta unos requerimientos metabólicos aumentados. Una nutrición adecuada se torna un factor indispensable en todo proceso terapéutico. En la UCI de los hospitales, los pacientes presentan estados hipermetabólicos y catabólicos intensos, y un grado elevado de estrés quirúrgico, térmico, traumático o séptico. Sus padecimientos de base pueden estar complicados con otras enfermedades o disfunciones y fallo de múltiples órganos, lo que obliga al empleo de diversas formas de apoyo para mantener la vida. La provisión correcta y

oportuna de energía y nutrientes es fundamental para estos individuos ya que pueden salvarles la vida. La mayoría de las indicaciones dietéticas expresan sólo conceptos generales, pues se diseñan mediante estandarización, sin tener en cuenta aspectos individuales del paciente.

Centrándonos más en los micronutrientes, su deficiencia está presente a menudo en pacientes hospitalizados. La deficiencia se produce debido a una administración inadecuada o inapropiada, unos requerimientos alterados o incrementados, un aumento de las pérdidas, afectando a diversos procesos bioquímicos, provocando la disfunción de órganos, mala cicatrización y un estado inmunológico alterado, con secuelas perjudiciales.

El diseño de un apoyo nutricional apropiado pone a prueba el conocimiento y el real ingenio del médico y el equipo de profesionales de la salud responsables de la atención de estos pacientes.

Existen una serie de valoraciones que se llevan a cabo en el paciente crítico con el objetivo de conocer el estado clínico y nutricional en el que se encuentra. Estas valoraciones corresponden a SRIS/SEPSIS, Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) y Score Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II (APACHE II). Éstos, posteriormente, habrán sido utilizados como criterios de inclusión de los pacientes en nuestro estudio.

3.1.1. Tipos de valoraciones del estado clínico y nutricional del paciente

SRIS/Sepsis

El SRIS se caracteriza por ser una reacción proinflamatoria anormal y generalizada que se presenta en órganos a distancia de la agresión inicial. Una vez iniciada la respuesta inflamatoria, se ponen en marcha mecanismos compensatorios, siendo la evolución dependiente del balance entre SRIS y los mecanismos compensatorios de la respuesta inflamatoria, pudiendo desencadenar en un síndrome de Disfunción/Fracaso Multiorgánico (DMO/FMO) o incluso la muerte.

Las causas del SRIS son muy variadas, desde infecciones (en cuyo caso se denomina sepsis) hasta traumatismos, procesos inflamatorios, etc.

Este síndrome es reconocido clínicamente por la presencia de 2 ó más de los siguientes síntomas:

- Temperatura $>38^{\circ}\text{C}$ o $<36^{\circ}\text{C}$.
- Frecuencia cardíaca >90 latidos/min.
- Frecuencia respiratoria >20 respiraciones/min.
- Recuento de glóbulos blancos >12.000 células/ mm^3 , <4.000 células/ mm^3 o $>10\%$ de formas inmaduras.

SOFA

Éste es uno de los métodos de evaluación más utilizado a la hora de determinar la existencia de DMO ya que éste evalúa la morbilidad de los pacientes, teniendo una finalidad descriptiva. Es fácil de calcular, de manera individualizada, el grado de disfunción orgánica de forma cuantitativa y obtenida periódicamente, por medio del estudio de seis órganos (tabla III).

PUNTUACIÓN SOFA	0	1	2	3	4
Respiratorio: PaO ₂ / FiO ₂	> 400	≤400	≤ 300	≤ 200 con soporte respiratorio	≤ 100 con soporte respiratorio
Coagulación: Plaquetas x 1000	>150	≤ 150	≤ 100	≤ 50	≤ 20
Hepático: Bilirrubina (μmol/L)	< 1.2 (< 20)	1.2 – 1.9 (20 – 32)	2.0 – 5.9 (33 – 101)	6.0 – 11.9 (102 – 204)	≥ 12 (≥ 205)
Cardiovascular	No hipotensión	TAm < 70 mm Hg	*Dopa ≤ 5 Dobuta (cualquier dosis)	*Dopa > 5 ó A ≤ 0.1 ó NA ≤ 0.1	*Dopa > 15 ó A > 0.1 ó NA > 0.1
Neurológico: Glasgow	15	13 – 14	10 – 12	6 – 9	< 6
Renal: Creatinina mg/dl (μmol/L) o diuresis / 24h	< 1,2 (< 110)	1.2 – 1.9 (110 – 170)	2.0 – 3.4 (171 – 299)	3.5 – 4.9 (300 – 440) ó < 500 mL/día	≥ 5,0 (> 440) ó < 200 mL/día

Tabla III. Puntuación SOFA

APACHE II

El APACHE II es un sistema de valoración pronóstica de mortalidad que consiste en detectar los trastornos fisiológicos agudos que atentan contra la vida del paciente, y se fundamenta en la determinación de las alteraciones de variables fisiológicas y de parámetros de laboratorio cuya puntuación es un factor predictivo de mortalidad, siendo este índice válido para un amplio rango de diagnósticos, fácil de usar y que puede sustentarse en datos disponibles en la mayor parte de las UCI (Tabla IV).

4	3	2	1	0	Puntuación	1	2	3	4
>41.0	39 – 40.9		38.5– 38.9	36 – 38.4	Temperatura Central (°C)	34 – 35.9	32 – 33.9	30 – 31.9	< 29.9
> 160	130 – 159	110 – 129		70 – 109	Presión arterial media (mmHg)		50 – 69		< 49
> 180	140 – 179	110 – 139		70 – 109	Ritmo cardíaco (latidos/min)		55 - 69	40 – 54	< 39
> 50	35 – 49		25 – 34	12 – 24	Frecuencia respiratoria	10 – 11	6 – 9		< 5
					Oxigenación (mmHg)				
> 500	350 – 499	200 – 349		< 200 > 70	Si FiO₂ > 0.5, considerar la AsDO₂	61 – 70		55 - 60	< 55
					Si FiO₂ < 0.5, considerar la PaO₂				
> 7.70	7,60 – 7.69		7,50 - 7,59	7,33 - 7,49	pH arterial		7.25 – 7.32	7.15 – 7.24	< 7,15
> 180	160 – 179	155 – 159	150 – 154	130 - 149	Sodio (mMol/L)		120 – 129	111 – 119	< 110
> 7.0	6.0 – 6.9		5.5 – 5.9	3.5 – 5.4	Potasio (mMol/L)	3 – 3.4	2.5 – 2.9		< 2.5
> 3.5	2 – 3.4	1.5 – 1.9		0.6 – 1.4	Creatinina (mg/100mL) (doble puntuación en fallo renal crónico)		< 0.6		
> 60		50 – 59.9	46 – 49.9	30 – 45.9	Hematocrito (%)		20 – 29.9		< 20
> 40		20 – 39.9	15 – 19.9	3 – 14.9	Leucocitos (x10⁹/L)		1 – 2.9		< 1

Tabla IV. Puntuación APACHE II.

El índice APACHE II calculado en el momento del ingreso o al final del día de intervención del paciente, nos proporciona información relativa al paciente correspondiente al momento de la determinación.

Además, en este sistema de valoración, se puntúan aspectos como la edad del paciente (Tabla V) y el *estado de salud previo* del paciente, es decir, el motivo de ingreso en UCI.

Edad (años)	Puntuación
≤ 44	0 puntos
45 – 54	2 puntos
55 – 64	3 puntos
65 – 74	5 puntos
≥ 75	6 puntos

Tabla V. Puntuación APACHE II según edad.

Estado de salud previo: si el paciente antes de ingresar en el hospital, tiene historia de insuficiencia severa de órganos o de compromiso inmunitario, se asignará una puntuación de la siguiente manera:

- Pacientes no quirúrgicos o postoperatorios de cirugía urgente: 5 puntos.
- Pacientes con postoperatorios de cirugía programados: 2 puntos.

3.2. Valoración clínica del estatus nutricional

Bristrian et al (2006) utilizó técnicas de valoración sencilla para demostrar la epidemia de malnutrición que afectaba a los pacientes hospitalizados. Estas técnicas sirvieron para alertar a los médicos sobre la posibilidad de complicaciones evitables. Entre los métodos utilizados para identificar grados de malnutrición se encuentran los antropométricos, los bioquímicos y los inmunológicos.

3.2.1. Valoración bioquímica

Pretende estimar, a nivel plasmático o celular, las concentraciones o cantidades de nutrientes, y las situaciones de las funciones metabólicas o corporales en las que están directamente implicados. La determinación bioquímica puede ser distinta según el estadio de nutrientes de los pacientes.

La fase donde la ingesta de nutrientes es reducida, conduce a una depleción de los depósitos corporales o márgenes celulares de reserva pero no existen aún niveles disminuidos de nutrientes como para que se vean alterados el metabolismo y las funciones celulares.

Los métodos están conducidos a determinar:

- Niveles de reserva.
- Niveles circulantes.
- Niveles de excreción urinaria.
- Niveles de actividades enzimáticas.
- Niveles de sustancias con significado fisiológico.
- Lesiones relacionadas con deficiencia nutricional.

Existen una serie de limitaciones en esta evaluación bioquímica:

- Algunos métodos de determinación de vitaminas y minerales son imprecisos.
- No existen niveles de referencia para algunos analitos.
- Una evaluación o disminución en los niveles plasmáticos o celulares de muchos nutrientes e incluso de funciones específicas, puede deberse a situaciones no nutricionales.
- Muchos parámetros se pueden enmascarar en caso de deficiencia o exceso.

Generalmente, las determinaciones bioquímicas en sangre se realizan en suero pero, para una evaluación completa, las determinaciones pueden realizarse por separado en plasma y eritrocitos.

Los parámetros más comúnmente utilizados son:

- Hemograma.
- Parámetros bioquímicos en sangre: glucemia, perfil lipídico, urea, creatinina, proteínas totales.
- Metabolismo del hierro.
- Vitaminas.
- Minerales.
- Iones.
- Parámetros bioquímicos en orina.

Las herramientas bioquímicas hoy existentes para la valoración de la nutrición, se basan en la capacidad del organismo para sintetizar proteínas lo que, a su vez, depende de una nutrición adecuada.

- Variables bioquímicas indicativas del estado de las proteínas musculares:
 - Índice creatinina/altura: Mide el catabolismo muscular. Sus valores están influenciados por la cantidad y contenido proteico de la dieta y por la edad. En el paciente crítico el índice creatinina/altura **detecta la malnutrición al ingreso**, pero carece de valor pronóstico o de seguimiento de forma aislada.
 - 3-Metil-histidina: Es un aminoácido derivado del metabolismo muscular proteico. Sus valores aumentan en situaciones de hipercatabolismo y disminuyen en ancianos y en pacientes desnutridos. En el paciente crítico es un **parámetro de seguimiento nutricional, renutrición y catabolismo muscular**.
 - Excreción de urea: Es un método habitual de medición del catabolismo proteico. También estima la pérdida de creatinina y ácido úrico. Sus valores presentan variaciones en relación con el volumen intravascular, el aporte nitrogenado y la función renal. En el paciente crítico es un **índice de la intensidad de la respuesta metabólica al estrés**.

- Balance nitrogenado: Es un buen parámetro de renutrición en pacientes postoperados con estrés o desnutrición moderada. En el paciente crítico, no es válido como parámetro de desnutrición y seguimiento nutricional, pero sí como **índice de pronóstico nutricional**.

- Variables bioquímicas indicativas del estado de las proteínas viscerales:
 - Albúmina: Es el parámetro bioquímico más frecuentemente utilizado en la valoración nutricional. Una reducción significativa de los valores de albúmina se asocia con un incremento en la aparición de complicaciones y en la mortalidad. Los valores de albúmina al ingreso de los pacientes críticos tienen valor pronóstico. No obstante, dichos valores son **poco sensibles a los cambios agudos del estado nutricional** (por la elevada vida media de la albúmina: 20 días). La albúmina sérica tampoco es un buen parámetro de seguimiento nutricional, aunque sus valores pueden relacionarse con la extensión de la lesión.

 - Prealbúmina: Su vida media corta (2 días), la convierte en un parámetro de evolución y seguimiento en el paciente crítico, habiéndose apreciado que la prealbúmina es el **parámetro más sensible a los cambios en el estado nutricional**. No obstante, sus valores están interferidos por factores no relacionados con el estado nutricional: disminuyen en la infección y en la insuficiencia hepática y aumentan en el fracaso renal.

 - Transferrina: Presenta una baja sensibilidad y especificidad cuando se analiza de forma individual. Sus niveles plasmáticos están aumentados en la anemia ferropénica y disminuidos en la enfermedad hepática, sepsis, síndrome de malabsorción y alteraciones inespecíficas inflamatorias. El déficit crónico de hierro, la politransfusión y las alteraciones en la absorción intestinal, lo invalidan como parámetro nutricional en el paciente crítico. Su vida media es de (8-10 días).

- Somatomedina: Se trata de un péptido de bajo peso molecular, cuya síntesis está regulada por la hormona de crecimiento y el factor I de la insulina. Mide la intensidad de la respuesta metabólica de la agresión y es un buen parámetro de seguimiento nutricional. La complejidad en su determinación y su elevado coste limitan su uso.

- Otras proteínas:

La *proteína C*, *alfa-1-antritripsina*, *alfa-1-glicoproteína*, *alfa-2-macroglobulina*, la *fibronectina*, el *fibrinógeno* y la *haptoglobina*, son proteínas inespecíficas cuyo valor puede encontrarse relacionado con la intensidad de la respuesta metabólica. No obstante, pueden alterarse también por un gran número de situaciones no relacionadas con el estado nutricional.

3.2.2. Valoración inmunológica:

De la desnutrición se sabe que deprime la producción de anticuerpos, la función de las células fagocíticas y los niveles de complemento. El recuento total de linfocitos es uno de los parámetros útiles para evaluar la malnutrición y sus efectos en el paciente (Cristobal, 1999).

En todo caso, como no existe una prueba perfecta, el juicio clínico debe basarse en las medidas antropométricas y en la valoración clínica subjetiva para determinar la probabilidad de malnutrición. Esta determinación se hace antes de proceder a estudios bioquímicos e inmunológicos, que permiten confirmar posteriormente la evaluación clínica.

3.2.3. Contenido corporal de cobre:

La medida del estatus nutricional de elementos traza u oligoelementos en plasma se invalida con la presencia de respuesta inflamatoria sistémica. En la práctica diaria, el estatus de micronutrientes se determina normalmente midiendo los

elementos traza y las vitaminas en el plasma. Sin embargo, las concentraciones plasmáticas de elementos esenciales pueden fluctuar independientemente del estatus nutricional (Galloway et al, 2000). El incremento de las concentraciones de cobre por la ceruloplasmina, proteína principal que contiene cobre en plasma, es un marcador positivo de la fase aguda (Di Silvestro, 1989).

Eleanor et al manifestaron la inadecuación de la medición de cobre en plasma para evaluar el estado nutricional durante una respuesta inflamatoria aguda, y en cambio apoya el potencial de los eritrocitos como medio para medir dicho estatus.

- Evaluación del estatus de cobre:

En la deficiencia severa de cobre, el cobre sérico y los niveles de ceruloplasmina se encuentran bajos y reflejan el estatus de cobre del cuerpo. Sin embargo, en una deficiencia marginal, estos parámetros son normales y no reflejan el estatus real de cobre del organismo. Además, la ceruloplasmina es un reactivo de fase aguda; en presencia de procesos antiinflamatorios, sus niveles, así como los de cobre pueden estar elevados, incluso con deficiencia marginal de cobre (Turnland, 2005; Mason, 1979). Los niveles de cobre en pelo, uñas y saliva han sido propuestos como índices del estatus de cobre pero se consideraron poco fiables. La citocromo oxidasa y la superóxido dismutasa en eritrocitos se consideran medidas potenciales de la adecuación de cobre, pero no han sido estudiados con detalle (Turnland, 2005).

3.3. Requerimientos nutricionales específicos en el paciente crítico

El aporte de los requerimientos energéticos y proteicos a los pacientes críticos es complejo, ya que hay que tener en cuenta tanto las circunstancias clínicas del paciente como su momento evolutivo. Es importante considerar no sólo el aspecto cuantitativo del aporte de estos macronutrientes, sino la calidad de los mismos, seleccionando entre las diversas posibilidades disponibles.

El papel de los micronutrientes, hasta hace poco considerado de segundo orden, se muestra cada día más importante en los pacientes críticos.

3.3.1. Energía

A partir de numerosos estudios sobre el gasto energético se ha estimado un aumento sobre el gasto energético basal del 20% al 60% (Planket al, 1998).

Las estimaciones de las necesidades energéticas en los enfermos críticos con sepsis han ido evolucionando desde el concepto de “infra-alimentación permisiva” en los primeros días de ingreso en UCI (Heyland et al, 2003).

Varios estudios (Frankenfield et al, 1997) sobre pacientes con politraumatismo y buen estado nutricional previo, encuentran que aportes isonitrogenados y con aporte calórico superior, igual o inferior al gasto energético en reposo no previenen el catabolismo proteico, sugiriendo, de acuerdo con otros estudios (Muller et al, 1995; Streat et al, 1987), que no parece necesario aportar todo el gasto energético medido, al menos durante las primeras fases del estrés, ya que no se consigue disminuir las pérdidas nitrogenadas con aportes calóricos por encima del mismo, produciéndose depósitos de grasas y apareciendo complicaciones metabólicas secundarias a la sobrealimentación.

En pacientes en los que se determina el gasto energético mediante calorimetría indirecta, se recomienda comenzar con un aporte energético alrededor del 80% durante los primeros 7-10 días tras la fase de estabilización, dado lo próximos que están el gasto energético en reposo y el gasto energético total durante esta primera fase (Weissman et al, 1995; Frankenfield et al, 1997). Posteriormente se debería aumentar el aporte energético pero sin sobrepasar en las primeras semanas el 120-130% del gasto energético, dado el aumento del mismo durante la segunda semana y la fase de convalecencia (Uehara et al, 1999).

En pacientes con desnutrición previa importante y sin altos niveles de agresión se pueden utilizar aportes en el rango más alto. En pacientes donde no se pueda medir el gasto energético son aplicables las recomendaciones de la American College of Chest Physicians (ACCP) (Cerra et al, 1997) y de la American Society for Enteral and Parenteral Nutrition (ASPEN, 2002).

Estas recomendaciones abarcan todo tipo de paciente crítico, estando contempladas diferentes situaciones clínicas y metabólicas, por lo que no son muy ajustadas.

Una recomendación válida sería la de aportar una cantidad de 25-30 kcal/kg de peso. El peso a utilizar debería ser el previo a la agresión o el peso ajustado en caso de obesidad. La American Gastroenterological Association (AGA, 2001) recomienda que el aporte energético se haga en relación al Índice de Masa Corporal (IMC) según la Tabla VI.

Recomendaciones para el aporte energético en función del IMC (según la AGA)	
Índice de Masa Corporal (Kg/m ²)	Necesidades Energéticas (Kcal/Kg/día)
< 15	35 - 40
15 - 19	30-35
20 - 29	20-25
≥ 30	15 - 20 (sin exceder >2000Kcal /día en pacientes críticos)

Tabla VI. Recomendaciones de aporte energético en función del IMC
 Recogido de: Ortiz et al, 2005

El aporte energético puede hacerse también en relación al aporte nitrogenado. La proporción Kcal NP/gN₂ media es de 110-130 Kcal/gN₂. No obstante, si el paciente se encuentra en grados de estrés avanzados, con presencia de disfunción multiorgánica, esta relación puede descender hasta 80 cal/gN₂.

3.3.2. Proteínas

El paciente crítico es un paciente hipercatabólico que presenta intensa destrucción proteica. Por tanto el aporte proteico es absolutamente necesario. Aunque las pérdidas nitrogenadas puedan ser muy altas, especialmente en pacientes traumatizados y quemados, no se recomiendan aportes muy elevados dado que ello podría conducir a un aumento de la degradación proteica neta. Un aporte de 1.5 g/kg/día reduce el catabolismo proteico en un 70%, pero si se incrementa a 2.2 g/kg/día, la degradación proteica neta se ve incrementada. Por tanto, parece que la elevación del aporte proteico por encima de un determinado nivel crítico incrementaría la tasa de catabolismo (Campbell, 1997).

En situación de estrés metabólico se incrementan la pérdida de nitrógeno, y los aminoácidos liberados del músculo esquelético se emplean para la gluconeogénesis y síntesis de otras proteínas necesarias para el sistema inmunológico y reparación de otros tejidos afectados.

Los requerimientos de proteínas para pacientes en situación de estrés metabólico pueden oscilar entre 0.8-2 g/kg/día, y en pacientes con sepsis se estima que las proteínas a administrar se encuentran entre 1.5-2 g/kg/día (Martindale et al, 2009; Shaw et al, 1987). Sin embargo los requerimientos pueden ser más altos en los pacientes con pérdidas de nitrógeno excesivas, en los pacientes con quemaduras graves o con heridas grandes abiertas, y además la cantidad y calidad de las proteínas pueden ser alteradas en los pacientes con insuficiencia renal aguda o hepática (Gottschlich, 2009). Además en situaciones de estrés, las necesidades proteicas son proporcionalmente mayores a las de energía, es decir, que el porcentaje de la energía procedente de las proteínas, es mayor en personas con estrés metabólico que en las personas sanas.

El 15-20% de las calorías totales diarias deben ser dadas en forma de proteínas. Debe iniciarse con aportes de 1.2-1.5 g/kg/día, ajustándose de acuerdo con controles periódicos de balance nitrogenado y cambios en la urea plasmática.

Existen diferentes soluciones de aminoácidos que pueden ser utilizadas en la nutrición parenteral del paciente crítico: soluciones estándar, soluciones enriquecidas en aminoácidos de cadena ramificada, fórmulas hepáticas. Respecto a la nutrición enteral, el aporte puede llevarse a cabo mediante proteínas intactas, hidrolizados proteicos, aminoácidos libres o mezclas de todos ellos en diferentes proporciones.

Recomendaciones proteicas en nutrición parenteral en función de la situación clínica (según la AGA)	
Situación clínica	Necesidades proteicas diarias (g/kg de peso ideal/día)
Normal	0.8
Estrés metabólico	1.0-1.5
Fracaso renal agudo sin diálisis	0.8-1.0
Hemodiálisis	1.2 – 1.4

Tabla VII. Recomendaciones de proteínas en nutrición parenteral según la situación clínica. Ortiz et al, 2005

En la Tabla VII se recogen las recomendaciones para el aporte proteico en función de la situación clínica (según la AGA).

3.3.3. Carbohidratos

La oxidación de la glucosa aumenta en los pacientes con sepsis y hasta cierto punto puede proporcionar la ruta adecuada para la administración exógena de glucosa. Wolfe (1997), en una serie de estudios realizados, concluyó que el aporte de calorías no proteicas a los pacientes con sepsis debería ser en gran parte a través de proteico (Wolfe, 1997).

La administración de hidratos de carbono debería de suministrar el 50-60% de la energía total, para evitar la oxidación excesiva de glucosa y contribuir la litogénesis. En términos absolutos, no debe realizarse un aporte superior a 7 g/kg/día de hidratos de carbono, ya que un aporte excesivo de hidratos de carbono eleva las concentraciones de glucosa en sangre (200mg/dL) (Gottschilch, 2009).

La glucosa continúa siendo el principal substrato calórico en el paciente crítico en general, aun cuando en algunas situaciones de agresión la fuente energética sea mixta (hidratos de carbono y grasa). Los hidratos de carbono constituyen entre el 50-70% de las calorías no proteicas en el metabolismo. Una perfusión de glucosa a 4 mg/kg/min sólo suprime la gluconeogénesis al 50% y además suprime el catabolismo proteico en un 10-15%; por lo tanto se recomienda que el aporte de glucosa no sobrepase el valor de 5 g/kg/día.

El aporte de glucosa debe ajustarse para intentar que los niveles de glucemia sean inferiores a 140 mg/dL, recurriendo a la administración de la cantidad necesaria de insulina. Esta recomendación estaría basada en los resultados de algunas publicaciones que indican una mayor morbimortalidad en los pacientes que tienen niveles de glucemia elevados (Van den Berghe et al, 2007), aunque es cierto que el valor óptimo de glucemia en pacientes críticos está aún por definir.

En un estudio realizado en pacientes críticos sometidos a ventilación mecánica (Van Den Berghe et al, 2007) analizó la influencia del mantenimiento de las

concentraciones de glucosa en sangre entre 80-110 mg/dl, sobre más de 1500 pacientes poniendo de manifiesto que un control de la glucemia durante la estancia en UCI disminuyó los niveles de mortalidad, y además, se produjo un 46% menos de episodios de septicemia en comparación con los pacientes que tuvieron concentraciones de glucosa en sangre superiores.

3.3.4. Lípidos

Los lípidos exógenos pueden utilizarse con eficacia como fuente de energía durante la sepsis, aunque la composición óptima de varias fuentes de lípidos sigue siendo polémica. Hay dos características de los lípidos que los hacen una fuente de energía valiosa para los pacientes con sepsis (Gottschilch, 2009):

- Son muy energéticos, aportando 9 kcal/g, lo que permite administrar más calorías en poco volumen, siendo esto una gran ventaja en los pacientes con restricción de volumen.
- Poseen un coeficiente respiratorio inferior al de los hidratos de carbono, por lo que la oxidación de los lípidos puede reducir las concentraciones sanguíneas de dióxido de carbono.

Otras funciones importantes de los lípidos para el soporte nutricional son:

- Transporte de vitaminas liposolubles.
- Formación de estructuras en las membranas celulares.
- Precursores de eicosanoides.
- Producción de citosinas.
- Interacción con la expresión génica.

Dado que en el hombre no existe la desaturasa hepática, que produce las series de ácidos grasos n-3 y n-6, tanto el ácido linoleico como el linolénico son ácidos grasos esenciales. El aporte de lípidos es, por tanto, imprescindible para evitar el déficit de ácidos grasos esenciales (debe aportarse al menos un 2% de las calorías en

forma de ácido linoleico y un 0.5% como ácido linolénico) y para mantener la estructura de las membranas celulares y la función de éstas en la modulación de las señales intracelulares (Ortiz et al, 2005).

En el soporte nutricional se emplean actualmente triglicéridos de cadena larga pertenecientes a las series n-3, n-6 y n-9, bien de manera individual o en combinación con triglicéridos de cadena media en una proporción 50:50, o como lípidos estructurados.

Se deben aportar lípidos alcanzando hasta el 40% del aporte calórico no proteico. La cantidad mínima sería la de 1 g/kg/día, con el fin de evitar déficit de ácidos grasos esenciales. El aporte de grasas no debe exceder la cantidad de 1.5 g/kg/día. El aporte de lípidos debe suspenderse si los niveles plasmáticos de triglicéridos son superiores a 400 mg/dL.

3.3.4. Vitaminas y minerales

Se desconoce, por el momento, cuáles y en qué cantidad exacta son necesarios en paciente crítico.

Se considera que el Zn es necesario para el proceso reparador de las heridas y que su déficit acarrea diferentes aspectos de inmunocompetencia. En situaciones de agresión, es necesario añadirlo en cantidades elevadas en la nutrición artificial. Puede administrarse hasta 13 mg/día, aunque un aporte de 4.5-6.0 mg/día, más un suplemento de 12.2 mg/día si el paciente presenta pérdidas intestinales importantes, debe ser suficiente. Un exceso de aporte de Zn puede producir interferencias en el metabolismo del Cu.

Respecto al Cu, se considera que aportes de 2-3 mg/día podrían ser suficientes en los pacientes que reciben nutrición enteral. No obstante, hay que tener en cuenta que existen situaciones, como la sepsis y el trauma, donde los valores plasmáticos de Cu se encuentran elevados en las fases iniciales.

Otros elementos traza que deberían incorporarse al soporte nutricional son el manganeso (0.8 mg/día), el cromo (0.1 mg/día) y el selenio (hasta 120 mg/día).

Respecto a las vitaminas, se consideran imprescindibles los aportes de vitamina A, complejo B, C y E. No obstante, los requerimientos de vitaminas no están establecidos para la nutrición artificial del paciente crítico. Las diferentes recomendaciones publicadas (RDA, ASPEN) podrían infravalorar las necesidades de vitaminas para estos pacientes (Ortiz et al, 2005).

3.4. Soporte nutricional y cobre en paciente crítico

A pesar de que la severidad de la enfermedad es el único predictor más importante de la supervivencia en pacientes críticos, existen muchas preguntas acerca de la contribución de otros factores a los resultados de los pacientes. Dos factores son el papel del estado nutricional y el papel de los suplementos nutricionales, y la relación de la suplementación con los resultados clínicos ha producido resultados diversos.

Consecuentemente, aunque los investigadores generalmente coinciden en que el estatus nutricional es importante en los pacientes críticos, las guías actuales son bastante amplias, y el momento, tipo, y cantidad de suplementos puede variar considerablemente debido a la amplia gama de procesos metabólicos durante la enfermedad, y la amplia variación en las respuestas de los pacientes a una misma enfermedad.

La relación entre el estatus nutricional y los resultados de los pacientes es de particular interés en pacientes críticos crónicos, es decir, pacientes que sobreviven a la fase de tratamiento de la enfermedad crítica pero que tienen hospitalizaciones prolongadas, debido a su dependencia de los soportes de cuidados intensivos. Incluso después de que las condiciones clínicas y hemodinámicas de estos pacientes llegan a ser estables, el pobre estatus funcional, fundamentalmente manifestado por la dependencia de ventilación mecánica, sugiere que los pacientes pueden también experimentar un fracaso orgánico, que se define como un nivel de funcionamiento menor al esperado, asociado con déficits nutricionales.

Así, los factores tales como los suplementos nutricionales, tienen el potencial para influir en la recuperación y evolución, pero se sabe relativamente poco sobre el estado nutricional de pacientes crónicos en estado crítico.

Una nutrición pobre compromete la función de la respuesta inmune y de muchos sistemas, y deteriora la curación de la herida. En el postoperatorio, la nutrición insuficiente o tardía se ha asociado con mayores tasas de complicación y mortalidad (Howard y Ashley, 2003). Estos efectos perjudiciales de una nutrición deficiente sugieren que el apoyo nutricional del perioperatorio puede influir positivamente en los resultados de estos pacientes.

El soporte nutricional mejora los resultados clínicos en el paciente crítico y la comprensión de sus efectos ha avanzado significativamente en los últimos años. Los beneficios de la nutrición en los pacientes críticos han sido demostrados en varios estudios y revisiones (Heyland et al, 1998; Braunschweig et al, 2001; Lewis et al, 2001). En la literatura, se atribuyen una variedad de beneficios potenciales a la nutrición asociada a la cirugía y la enfermedad crítica. Las mejoras fisiológicas asociadas a la terapia nutricional conducen a una mejora de la cicatrización de heridas, como se ha demostrado en una variedad de estudios (Heyland et al, 2001; Schroeder et al, 1986).

El resultado de un paciente mejorado se ha atribuido también a la nutrición enteral durante el postoperatorio. Esto incluye la disminución de las complicaciones, una reducción de los costos del hospital y una menor estancia hospitalaria, además de una mayor seguridad en comparación con la nutrición parenteral (Heyland, 1998; Bozzetti et al, 2011; Huckleberry ,2004; Howard et al, 2003).

Los pacientes críticos son especialmente susceptibles a desarrollar una deficiencia de micronutrientes, a pesar de lo que se percibe como un reemplazamiento adecuado. También es importante tener en cuenta estas deficiencias como un componente del síndrome de realimentación, que se produce en individuos con desnutrición severa con terapia de nutrición parenteral o enteral sin una suplementación adecuada de micronutrientes.

Si un paciente ha agotado sus depósitos debido a caquexia, sufre pérdidas severas como resultado de una quemadura, o simplemente presenta una enfermedad crítica que debilita sus reservas en los días siguientes, los niveles de micronutrientes deberán ser restaurados y preservado cualquier resto de reservas. Cualquier paciente que presente una deficiencia de micronutrientes mientras está siendo atendido en una unidad de cuidados intensivos, no ha recibido una buena atención (Berger et al, 2006). La suplementación con micronutrientes debe comenzar el primer día de aporte nutricional y continuar diariamente. Una suplementación adicional es necesaria cuando existe una deficiencia identificada.

Hay un consenso general sobre la preferencia de la NE frente a la NP cuando el intestino se considera con un funcionamiento adecuado y que la NE debe iniciarse dentro de las 24-48 h desde la admisión en UCI (Heyland et al, 2003; Doig et al, 2005; Kreymann et al, 2006). La NE, por lo tanto, debe iniciarse tan pronto como sea posible.

La NE se administra típicamente a través de una sonda nasogástrica y en la mayoría de los casos, coinciden los objetivos nutricionales (Doig et al, 2005); sin embargo, la alimentación nasogástrica puede llevar a problemas relacionados con la motilidad gastroduodenal y una pobre absorción que se desarrolla en la enfermedad crítica (Dive et al, 1994; Heyland et al, 1996; Ritz et al, 2001).

Cuando se produce una intolerancia a la NE, las opciones incluyen fármacos procinéticos, alimentación del intestino delgado o NP suplementaria.

Los médicos deben considerar cuidadosamente la composición del soporte nutricional con respecto al contenido de lípidos, antioxidantes, micronutrientes y otros, dependiendo de la condición del paciente y si se utiliza la NE o NP.

3.4.1. Soportes nutricionales que pueden aportar cobre al paciente crítico

Los requerimientos de micronutrientes en pacientes críticos son desconocidos (Elia et al, 1995). Un descenso en los niveles séricos puede no indicar una actual deficiencia, sino una redistribución. El descenso de los niveles séricos puede ser actualmente una respuesta adaptativa y beneficiosa (Solomons y Ruz, 1998). La ASPEN ha establecido guías para la administración de aditivos de elementos trazas

vía parenteral (ASPEN, 2002). Sin embargo, la composición de las preparaciones comerciales de elementos traza disponibles se encuentra lejos de la ideal, especialmente para uso a largo tiempo. En el estudio se observó que los niveles tisulares de cobre, manganeso y cromo están elevados, lo que sugiere que podrían ser aprobados y estar disponibles otros preparados de estos elementos (Lyon et al, 1989).

La suplementación de micronutrientes, como los elementos traza y los antioxidantes, está basada en el conocimiento de que los pacientes críticos presentan balances de micronutrientes negativos y una producción de radicales libres de oxígeno incrementada (Berger et al, 2007). Mientras que los pacientes críticos han sido considerados para justificar los suplementos de los oligoelementos, ahora parece ser una razón para suplementar a la mayoría de los pacientes de la UCI con un conjunto de micronutrientes, incluyendo selenio, cinc y cobre para disminuir las complicaciones infecciosas y la mortalidad (Heyland y Dhaliwall, 2005; Berger y Shenkin, 2006).

3.4.2. Suplementación de cobre en Nutrición Parenteral (NP)

La ruta más fiable de administración de micronutrientes es la intravenosa o parenteral. La suplementación de cobre es esencial en nutrición parenteral para evitar los efectos adversos de la deficiencia. La recomendación para el cobre (RDA) es de 1100 µg, mientras que la dosis diaria en nutrición parenteral es de 300-1500 µg (Menéndez AM, 2012)

Las primeras guías de suplementación de cobre en NP fueron formuladas por el comité experto de la Asociación Médica Americana (Expert Panel for Nutrition Advisory Group, 1979). Las recomendaciones estaban basadas en la ingesta oral, la absorción gastrointestinal y las consideraciones fisiológicas generales, porque en aquel momento no existían datos específicos sobre dosis apropiadas de cobre para pacientes que recibieran NP. Se sugirió un amplio rango de suplementación entre 0.5 y 1.5 mg/día para adultos (Expert Panel for Nutrition Advisory Group, 1979). Posteriormente, estudios basados en adultos que recibían NP y mantenían la ausencia de nutrición oral, indicaban que la suplementación media óptima de cobre en soluciones de NP ascendió a 300µg/día (Shike et al, 1981).

Un exceso de cobre en la suplementación de las soluciones de NP puede acumularse en el hígado y en otros tejidos, y puede causar daños.

Guías posteriores sobre la suplementación de cobre en soluciones de NP para adultos, adoptan los resultados del balance de estudios mencionados anteriormente (Shike et al, 1981). El comité experto de la ASPEN recomendaba una dosis diaria de 300-500 $\mu\text{g}/\text{día}$ para adultos (ASPEN, 2002).

Basándose en la literatura disponible, la suplementación con cobre debería ser prescrita para pacientes que reciben NP en una dosificación de 300 $\mu\text{g}/\text{día}$, con una dosis menor en pacientes con enfermedad hepática (aproximadamente 150 $\mu\text{g}/\text{día}$), y una dosis mayor en aquéllos con prolongadas y excesivas pérdidas de fluidos gastrointestinales (400-500 $\mu\text{g}/\text{día}$).

3.5. Estrés oxidativo en paciente crítico

El estrés oxidativo se reconoce cada vez más como un elemento central en la fisiopatología subyacente de la enfermedad crítica, especialmente, del fallo orgánico. Este estrés oxidativo está causado por especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS). Aunque estas especies se producen constantemente en circunstancias normales, los pacientes críticos pueden incrementar drásticamente su producción. Algunas fuentes de estrés oxidativo durante la enfermedad crítica incluyen la activación de células fagocíticas del sistema inmune, producción de óxido nítrico por el endotelio vascular, liberación de iones Fe (III) y Cu (II), y metaloproteínas, e isquemia/reperfusión inducidos por daños en los tejidos. Las ROS han desempeñado claramente papeles en la señalización, la modulación, la proliferación, la apoptosis y la protección celular. Sin embargo, las ROS, también son capaces de atacar a las proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos y ácidos grasos poliinsaturados, que resulta en un daño celular y disfunción de los tejidos (Lovat y Preiser, 2003). En la enfermedad crítica, las ROS pueden ser producidos a partir de una disfunción mitocondrial, como se observa claramente en el shock séptico (Brealey et al, 2002). Además, las ROS pueden desencadenar la liberación de citoquinas de las células inmunes, activar cascadas inflamatorias, y aumentar la expresión de moléculas de adhesión, probablemente mediadas a través de la inducción de la expresión del

factor nuclear $\kappa\beta$ (Grimble, 1994). La inflamación y la lesión tisular resultan en una acumulación de granulocitos en los órganos, lo que perpetúa y aumenta la respuesta inflamatoria y el consiguiente daño tisular.

Los pacientes críticos tienen niveles reducidos de antioxidantes, eliminadores de electrones libres o cofactores en plasma, y una actividad disminuida de sistemas enzimáticos involucrados en la detoxificación de ROS (Therond et al, 2000). El balance pro-oxidante/antioxidante presenta una relevancia funcional durante la enfermedad crítica ya que está involucrado en la patogénesis del fallo multiorgánico (Alonso de la Vega et al, 2000; Motoyama et al, 2003; Goode et al, 1995; Metnitz et al, 1999). Además, la capacidad antioxidante de los pacientes con sepsis puede estar comprometida por un aumento de la utilización de las proteínas de unión plasmáticas como parte de una respuesta inflamatoria aguda y por una inadecuada nutrición (Goode et al, 1995).

Recientes estudios clínicos han informado sobre los efectos de la administración profiláctica de antioxidantes, como un componente de apoyo nutricional, o como intervención individualizada, a los pacientes en riesgo de complicaciones relacionadas con la oxidación (Bulger y Maier, 2001). La generación incrementada de radicales libres y el daño en pacientes críticos están asociados con una mayor morbilidad y mortalidad (Roth et al, 2004).

En humanos existe un sistema complejo de defensa endógeno diseñado para proteger los tejidos de la lesión celular inducida por las ROS. Enzimas especiales como la SOD, catalasa, ceruloplasmina y glutathionperoxidasa (GPx) (incluyendo sus cofactores Zn, Cu, Mn, Se y Fe), y vitaminas, como la vitamina E, C y β -carotenos, forman una red de mecanismos de defensa. En pacientes críticos, donde las reservas de antioxidantes están reducidas, existen unas concentraciones bajas de captadores intracelulares de electrones libres, y presentan una actividad reducida de los sistemas enzimáticos implicados en la detoxificación de ROS (Therond et al, 2000). Los niveles circulantes de antioxidantes disminuyen rápidamente después de la cirugía o trauma y permanecen por debajo de los niveles normales durante varios días, o incluso semanas (Metcnitz et al, 1999). Cuanto más grave sea el trauma, el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) o sepsis, parece ser que el agotamiento de antioxidantes es mayor (Alonso de Vega et al, 2002; Motoyama et al, 2003). Estas

observaciones descritas no son más que un fenómeno, así como bajas reservas endógenas de los antioxidantes se asocian con un aumento en la generación de radicales libres, un aumento de la respuesta inflamatoria sistémica, lesión celular posterior, y un aumento de la morbimortalidad aún mayor en el estado crítico (Metnitz et al, 1999; Goode et al, 1995).

Las ROS tienen una vida media muy corta, sin embargo, se puede medir en aumento del estrés oxidativo por la presencia de subproductos lipídicos, ADN o la oxidación de proteínas. Se han revisado recientemente marcadores químicos del estado antioxidante y estrés oxidativo (Crimi et al, 2006; Mishra et al, 2005; Roth et al, 2004). Existen limitaciones para cada uno de los ensayos utilizados para la determinación in vivo de las defensas antioxidantes, el estrés oxidativo y el daño relacionado, como ensayos sobre la capacidad antioxidante total, resonancia de *spin* electrónico y ensayo *Comet*. Además, muchos ensayos son costosos y no están disponibles para fines clínicos. Recientemente, la relación entre el ADN mitocondrial y el ADN nuclear, se ha propuesto como marcador indirecto de la función mitocondrial y el estrés oxidativo (Hammond et al, 2003). Por el momento, el enfoque más realista es la determinación de una combinación de biomoléculas oxidadas y antioxidantes endógenos.

Debido a que el estado antioxidante se agota en la sepsis, mientras el paciente se enfrenta a un estrés oxidativo elevado, la justificación de la intervención parece sólida. Consiste en restaurar el estado antioxidante endógeno con la suplementación enteral o parenteral con dosis farmacológicas de nutrientes con propiedades antioxidantes, o proporcionar componentes exógenos con propiedades antioxidantes si se producen de manera natural o por la industria farmacéutica. La evidencia de que los suplementos antioxidantes contribuyen a limitar el daño de órganos y tejidos causado por mediadores de sepsis, es cada vez mayor. De hecho, la mejor manera de combatir la sepsis parece ser evitar el fracaso (Baue, 2006).

Centrándonos en el cobre, este mineral participa en reacciones de oxidorreducción en las que está implicado el oxígeno. Existen tres enzimas principales dependientes del cobre que desempeñan un papel en la defensa antioxidante: la catalasa, la SOD y la ceruloplasmina. A parte podemos encontrar otras como la lisil oxidasa y la citocromo C oxidasa.

3.5.1. Ceruloplasmina

La ceruloplasmina, también conocida como ferroxidasa, es la principal proteína transportadora de cobre en la sangre. Es una enzima sintetizada en el hígado que contiene seis átomos de cobre en su estructura. La ceruloplasmina transporta el 90% del cobre en plasma. Presenta una actividad oxidasa dependiente de cobre, la cual está asociada con la posible oxidación de Fe^{2+} (ferroso) a Fe^{3+} (férrico), por lo que ayuda a su transporte en el plasma, estando asociada a la transferrina.



Tras la incorporación al hepatocito, el cobre puede pasar a formar parte de la ceruloplasmina, la cual se secreta en la sangre para el transporte de cobre a los tejidos o para ser excretado en la bilis. Además actúa como un desactivador de radicales libres.

La mayoría de los cambios en las concentraciones plasmáticas de cobre se asocia con cambios en la cuproenzima ceruloplasmina. A menudo se afirma que esta proteína representa más del 80% del cobre en plasma. Sin embargo, estudios más recientes sugieren que aproximadamente el 60-72% del cobre en plasma está ligado a la ceruloplasmina (Wirth y Under, 1985). Tanto la actividad de la enzima como la cantidad de proteína inmunorreactiva son mayores en las mujeres. Ya que la ceruloplasmina es una proteína de fase aguda, también se incrementa en casos de infección aguda o crónica (Barber y Cousins, 1988), haciéndolo de manera proporcional a la gravedad de la reacción de fase aguda. La función de la ceruloplasmina durante la infección, puede ser transportar cobre con el fin de estimular

la síntesis de enzimas dependientes de éste, y/o inactivar los radicales libres generados durante la inflamación. Se observa también un incremento en su actividad durante estrés inflamatorio (Denko, 1979). La ceruloplasmina está disminuida en la desnutrición, nefrosis, síndrome de Menkes (Danks et al, 1972) y hepatitis crónica (Spechler y Koff, 1980). La actividad enzimática de la ceruloplasmina se ha encontrado que está disminuida en algunos hombres y mujeres alimentadas con dietas pobres en cobre (Milne et al, 1990; Milne et al, 1988). En estados postprandiales, el 60-95% del cobre circulante se encuentra incorporado a la ceruloplasmina.

Es probable que una apoceruloplasmina libre de cobre o una forma inactiva de la ceruloplasmina con un número reducido de átomos de cobre esté presente durante la privación de cobre (Milne et al, 1988; Matsuda et al, 1974).

3.5.2. Superóxido Dismutasa

La SOD pertenece a la familia de las metaloenzimas que catalizan procesos de dismutación. Está relacionada con la protección frente al daño oxidativo y tóxico de las células y sus membranas.

De todas las lesiones oxidativas que se producen, la más importante es la que se da en el material genético o ADN, ya que abarca fenómenos letales y mutagénicos. Normalmente, los daños que sufren se reparan de manera eficiente, pero si éstos se acumulan en una cantidad superior a la capacidad de reparación aumentarán las patologías y los problemas que las acompañan. Una forma de esta enzima es la encargada de solucionar estos problemas. Requiere Zn y Cu para que se encuentre en forma activa (Cu/Zn-SOD).

La Cu/Zn-SOD está localizada en el citosol de la mayoría de los tejidos y es una parte integral del mecanismo de defensa del organismo contra las consecuencias del metabolismo del oxígeno (figura 3).

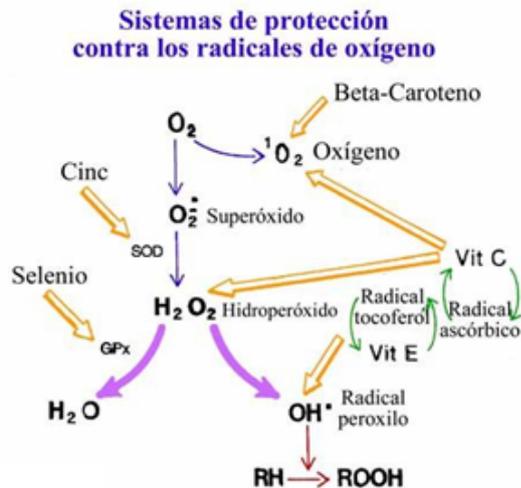


Figura 3. Intervención de la SOD en el metabolismo del oxígeno.

Esta enzima se encuentra en todas las células y es la que permitió conocer la intervención de los radicales libres en la biología humana. Los radicales libres no son los únicos responsables de los problemas orgánicos; también se debe a la acumulación de diversas toxinas en el organismo.

En cuanto a la estructura, decir que se trata de una enzima dimérica y cada subunidad contiene un átomo de Cu y otro de Zn, para posibilitar la eliminación celular de aniones superóxidos muy tóxicos para el organismo (Zbronska et al, 1995). La encontramos en el citoplasma de las células.

La SOD actúa como antioxidante y cataliza la reacción de dismutación, reacción por la que dos moléculas de sustrato idéntico tienen destinos diferentes. En este caso, una molécula se oxida y otra se reduce.

Existen otras dos formas para esta enzima; una que contiene manganeso y se encuentra en bacterias y otra que contiene hierro y se encuentra en plantas.

La enzima SOD actúa neutralizando el radical aniónsuperóxido, convirtiéndolos en peróxido de hidrógeno, en concentraciones inferiores a 10 unidades, y siempre en presencia de cobre.

Estas enzimas, al actuar como antioxidantes, retrasan o evitan el proceso de oxidación celular. El antioxidante, al interaccionar con el radical libre le cede un electrón, y a su vez, se oxida, transformándose en un mineral más débil, no tóxico, produciéndose una reacción en cascada.

El radical anión superóxido roba un electrón a un elemento antioxidante y éste, a su vez, se transforma en un radical libre más débil, que roba un electrón a otro antioxidante, y así sucesivamente hasta neutralizar la acción tóxica del radical.

La energía que se produce durante estas reacciones se almacena en forma de ATP, a nivel de las uniones trifosfato, hidrolizando estas uniones cuando el organismo precisa de energía. El ejercicio físico, por ejemplo, origina una mayor producción de ATP y radicales libres, y es por esto que se aconseja una carga suplementaria de antioxidantes después del ejercicio.

- Papel de la superóxido dismutasa:

La SOD es una superóxido dismutasa Cu/Zn dependiente. Es una enzima que normalmente se encuentra en el interior de la célula y su función biológica, en condiciones normales, es la de proteger a la célula frente a la agresión de los radicales libres generados durante los procesos de respiración celular. La SOD, por tanto, es capaz de unir dos radicales oxígeno para formar oxígeno y peróxido de hidrógeno.

- Mecanismo de acción de la superóxido dismutasa:

Su mecanismo consiste en dismutar los radicales superóxido que se forman durante los procesos celulares y que son altamente tóxicos para la célula, convirtiéndolos en oxígeno y peróxido de hidrógeno. En el organismo existe SOD en el citoplasma de todas las células eucariotas, encargándose de eliminar estas ROS formadas en el funcionamiento normal de la célula; por el contrario, no existe SOD extracelular, por lo que las roturas celulares que provocan la liberación al medio extracelular de ROS, origina lesiones sin que el organismo pueda defenderse.

Por otro lado, la SOD presenta otros mecanismos de acción, como la intervención en procesos de envejecimiento celular, por lo que puede estar relacionada con procesos de apoptosis y de replicación viral.

En contraste con las concentraciones séricas de cobre o ceruloplasmina, la actividad de la Cu/Zn-SOD no parece estar afectada por la edad, el género o el uso de hormonas (Milne y Nielsen, 1993; Fisher et al 1990; Saik et al, 1982). Estudios recientes, sin embargo, han sugerido que algunas condiciones que producen un estrés oxidativo tienden a aumentar la actividad de la Cu/Zn-SOD, incluso durante los períodos de baja ingesta de cobre (Nielsen et al, 1990; Nielsen y Milne, 1992).

La mayoría de los ensayos disponibles para la actividad de la Cu/Zn-SOD se basa en la medición indirecta de la actividad (Milne, 1994). Este tipo de ensayo consiste en un sistema de generación de la SOD y un indicador que se mide espectrofotométricamente. La adición de Cu/Zn-SOD inhibe el cambio de absorción del indicador en un grado proporcional a la cantidad de enzima presente. Flohé y Otting (Flohé y Otting, 1984), y Beyer y Fridovich (Beyer y Fridovich, 1987) mostraron varios ensayos indirectos de actividad de Cu/Zn-SOD; ningún método parece estar favorecido, pero son métodos basados en la reducción del citocromo C. Muchos de estos ensayos son propensos a interferencias (Spitz et al, 1989) y se indica la precaución en la selección del procedimiento apropiado. Muchos de estos procedimientos se han prestado a la automatización (Wheeler et al, 1990). Recientemente, los métodos de análisis de SOD están basados en su detección por quimioluminiscencia (Corbisier et al 1987), la medición directa de sus cambios (Bolann y Ulvik, 1991), o a la formación de H₂O₂ (producto de conversión del radical anión superóxido por la SOD) (Segura-Aguilar, 1993).

3.5.3. Daño oxidativo en el ADN

Los radicales libres juegan un papel importante en un gran número de enfermedades humanas. La generación excesiva de radicales libres in vivo, por fuentes endógenas o exógenas, pueden dañar biomoléculas, incluyendo el ADN.

Los radicales libres pueden reaccionar con el ADN, tanto a nivel del esqueleto azúcar-fosfato, como con las bases.

En las células humanas se producen, por célula y día, un gran número de daños oxidativos en el ADN debido al metabolismo celular oxidativo.

- Ensayo *Comet*.

La electroforesis en gel de células individuales, o ensayo *Comet*, es frecuentemente utilizado para medir el daño en el de ADN. Este ensayo fue desarrollado por primera vez por Östling y Johansson en 1984, como una metodología que permitía estimar el daño en el material genético de las células. En la mayoría de estudios se emplean linfocitos de sangre como modelo celular.

El ensayo *comet* es un método simple para medir roturas del ácido desoxirribonucleico en células eucariotas. El concepto subyacente de este ensayo es que el ADN intacto conserva una asociación altamente organizada con las proteínas del núcleo. Cuando se dañan, esta organización se interrumpe. Las cadenas de ADN pierden su estructura compacta y se expanden hacia fuera del núcleo. Cuando se aplica un campo eléctrico al ADN, que tiene carga neta negativa, es atraído hacia el ánodo cargado positivamente. Los fragmentos no dañados son demasiado grandes y no abandonan el núcleo, mientras que los fragmentos más pequeños están más libres para moverse en un período dado de tiempo. Por lo tanto, la cantidad de ADN que sale del núcleo es una medida de la cantidad de daño en el ADN de la célula. Tal medida se puede llevar a cabo utilizando un marcador fluorescente como es el bromuro de etidio que se intercala en las cadenas de ADN.

En el análisis de imágenes se realiza la medida global de la intensidad de fluorescencia del ADN nuclear y del ADN que ha migrado, y compara ambas señales. Cuanto mayor es la intensidad de fluorescencia del ADN que ha migrado, mayor es el daño. La estructura general se asemeja a un cometa (de ahí el nombre del ensayo) con una cabeza circular correspondiente al ADN intacto que permanece en el núcleo y una cola de ADN dañado. Cuanto más larga y brillante sea la cola, mayor es el nivel de daño.

El ensayo *comet* es una técnica versátil para la detección de daños y, con los ajustes del protocolo, se puede utilizar para cuantificar la presencia de una amplia variedad de lesiones que alteran el ADN. Se trata de una técnica extremadamente sensible. Esta sensibilidad debe ser manejada con cuidado, ya que es también vulnerable a los cambios físicos que pueden afectar a la reproducibilidad de los resultados. La forma más común de este ensayo es la versión alcalina.

4. DETERMINACIÓN DEL ION COBRE EN PERSONAS SANAS Y PACIENTES CRÍTICOS

Las variaciones en la composición y situación del cobre celular ha sido objeto de atención dada sus posibles consecuencias fisiológicas y patológicas. Así han surgido métodos para monitorizar cobre en células vivas para dilucidar los complejos mecanismos en los que el cobre interviene tanto en personas sanas como enfermas (Bertini y Rosato, 2008; Domaille et al, 2008; Haas y Franz, 2009). En relación con este aspecto, un avance significativo lo constituyen los indicadores de cobre (Dujols et al, 1997; Yang et al, 2005; Zeng et al, 2006; Viguier y Hulme, 2006; Liu y Lu, 2007; Zhou et al, 2009; Lin et al, 2009; Khatua et al, 2009; Ballesteros et al, 2009; Huang et al, 2009) que permiten obtener imagen de los flujos y contenidos de este ion en células vivas aunque hay poco indicadores de cobre que se empleen satisfactoriamente en la investigación biológica (Yang et al, 2005; Zeng et al, 2006; Yu et al, 2008; Swamy et al, 2008; Jung et al, 2009; Zhao et al, 2009).

Varios métodos son los empleados para la determinación de Cu(II) incluyendo análisis mediante fluoróforo orgánico (Viguier y Hulme, 2006; Xiang et al, 2006), espectroscopía de absorción atómica (AAS) (Gonzales et al, 2009), espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) (Becker et al, 2005), espectroscopía de emisión atómica (ICP-AES) (Liu et al, 2005) y métodos electroquímicos (Ensafi et al, 2006; Karimi et al, 2006). En general, la sensibilidad de estos métodos es alta aunque la mayor parte de ellos son caros y requiere aparataje y una metodología con un cierto grado de sofisticación, lo que constituye una clara limitación para su uso como técnicas rutinarias, especialmente en clínica.

4.1. Semiconductores

El estudio del estado sólido admite varias aproximaciones. La teoría de orbitales moleculares puede resultar adecuada para entender la conductividad eléctrica en los sólidos. La aplicación de los supuestos mecanocuánticos propios de la teoría de orbitales moleculares permiten describir a los metales de los grupos I y II, que forman estructuras de alta coordinación con un alto solapamiento de orbitales moleculares, como una sucesión de bandas ns y np que forman un continuo energético de tal manera que no habría diferencia entre ellas pudiéndose resumir en una banda ns/np de modo que si contiene N átomos, pueden albergar un total de $4N$ niveles de energía con capacidad para admitir hasta $8N$ electrones. Sin embargo, al pasar a elementos del grupo IV, la situación cambia. El silicio y el germanio presentan estructuras sólidas con una coordinación tetraédrica. La disminución de la coordinación asegura que todos los electrones se sitúen en orbitales enlazantes pero provoca una separación de las bandas ns y np . Dado que en este caso para N átomos el número de electrones es $4N$ y que la configuración para estos elementos sería ns^2np^2 , los $4N$ electrones pueden distribuirse en la banda de menor energía que quedaría totalmente llena, mientras que la otra banda quedará vacía. La primera de estas bandas sería la banda de valencia y es la que sería responsable de la estabilidad de los enlaces entre los átomos, mientras que la otra banda quedaría vacía y sería la banda de conducción. Entre ellas quedará un intervalo de energías que no estaría disponible para los electrones y que sería una banda prohibida o “band gap”. Elementos como el Si o el Ge no deberían conducir la corriente eléctrica ya que carecen de electrones libres que sirvan de transportadores de carga. Sin embargo, no actúan como aislantes ya que al aumentar la temperatura se produce la promoción de electrones a la banda de conducción lo que le convierten en conductores de la electricidad. Este comportamiento justifica el nombre de semiconductores que se les aplica. Otros semiconductores son el resultado de la combinación de dos elementos generalmente de los grupos III/V o II/IV (Smart, y Moore, 2005).

4.2. Quantum Dots

En la literatura científica se recoge (consultar por ejemplo Drummen, 2010) como principales referencias en la cronología de los QD, la tecnología de cristales semiconductores desarrollada a principio de los 80 por Louis Brus en los laboratorios

Bell (Rossetti et al 1983) y por Alexei I. Ekimov (Ekimov et al, 1985) del Instituto de Física Técnica A.F. Ioffe en San Petersburgo. Con posterioridad (1988) se acuña el término “quantum dot” que se aplica a nanomateriales semiconductores fluorescentes cuyos excitones (pares electrón excitados-hueco) están confinados espacialmente en un ámbito de radio inferior al radio de Bohr excitónico lo que implica tamaños típicos comprendidos entre 2 y 10 nm. El término “quantum dots” se puede traducir como “punto cuántico” aunque en la presente Memoria se ha preferido preservar la denominación original así como su abreviatura (QD).

El tratamiento clásico de Bohr del átomo de hidrógeno conduce a la conclusión de que el electrón más próximo al núcleo se mueve en una órbita de radio 0,52 Å que se conoce como radio de Bohr (a_0). Una aproximación basada en considerar al par electrón-hueco de forma semejante al átomo de hidrógeno, permite igualmente definir en el caso de los semiconductores, un radio de Bohr para el excitón (a_b) que resulta ser algo mayor que a_0 y que matemáticamente se expresa como (Brus, 1986).

$$a_b = \frac{\varepsilon a_0}{m^*/m_e}$$

Donde

$$m^* = \frac{m_e^* m_h^*}{m_e^* + m_h^*}$$

siendo ε la permitividad del medio, m^* la masa reducida del excitón y m_e la masa del electrón en reposo. La masa reducida está determinada por las masas efectivas del electrón (m_e^*) y del hueco (m_h^*). Valores de típicos a_b son CdS (2.7 nm); ZnSe (4.5 nm); CdSe (5.4 nm); ZnTe (5.5 nm); CdTe (6.7 nm); GaAs (13 nm) (Pelant y Valenta, 2012).

Cuando las dimensiones del semiconductor superan el valor del radio de Bohr para el excitón, la interacción de un fotón con el semiconductor puede aportar la energía suficiente para superar el “band gap” de modo que se produce la promoción de un electrón desde la banda de conducción a la banda de valencia. El lugar que deja libre el electrón es un hueco que presenta carga positiva. Los electrones promocionados por efecto de la luz no tienen, en principio, ninguna restricción por lo

que pueden moverse bajo un gradiente de potencial eléctrico dando origen a una corriente fotoinducida. De la misma forma en la banda de valencia, los electrones pueden moverse para ocupar los huecos existentes. Por tanto, electrones y huecos se convierten en transportadores de carga.

Sin embargo, si las dimensiones del semiconductor llegan a ser iguales o menores que el radio de Bohr del excitón, la situación cambia. El confinamiento que supone estas limitaciones para los átomos presentes en el nanocrystal supone la transformación de las bandas desde un continuo energético a una serie discretas de niveles electrónicos de excitación caracterizados por diferentes energías y por funciones de onda limitadas espacialmente, de un modo semejante a lo que ocurre a una partícula confinada entre límites de energía potencial infinita (partícula en una caja). Así aparece representado en el siguiente diagrama (Figura 5), en donde se observa como las bandas en el semiconductor se resuelven en niveles de energía debido a la cuantización al pasar de las dimensiones finitas del semiconductor a las dimensiones típicas del QD (por debajo del valor de a_b).

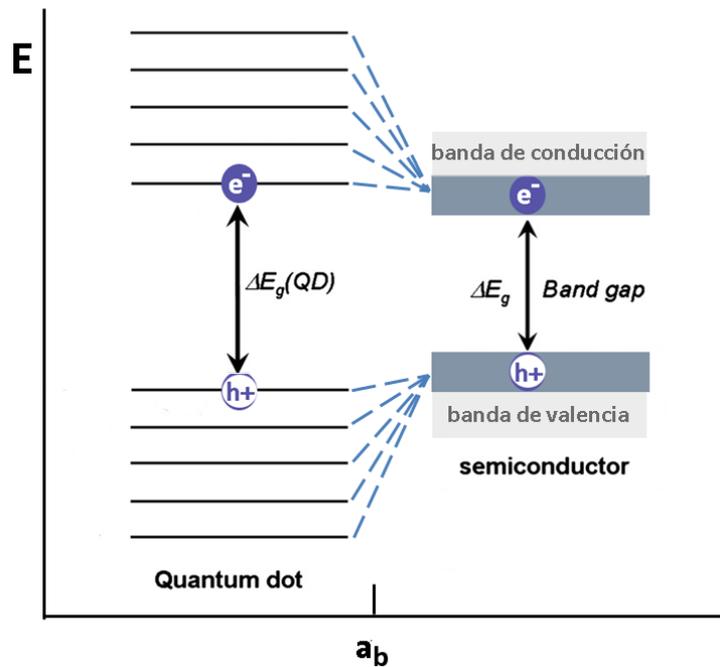


Figura 5. Partícula confinada entre límites de energía potencial infinita.

La diferencia de energía entre el nivel de energía más alto de la banda de valencia y el más bajo de la banda de conducción determina el valor del “band gap” y puede ser calculado en una primera aproximación a partir de la ecuación teórica propuesta por Brus (Brus, 1984).

$$\Delta E_{g,QD} = \Delta E_{g,s} + \left(\frac{h^2}{8R^2} \right) \left(\frac{1}{m_e^*} + \frac{1}{m_h^*} \right) - \frac{1.8e^2}{4\pi\epsilon_0\epsilon R} - 0.248E_{Ry}^*$$

en donde $\Delta E_{g,QD}$ es la energía del “band gap” del QD, $\Delta E_{g,s}$ la correspondiente al semiconductor, R es el radio del QD, m_e^* y m_h^* las respectivas masas efectivas del electron y del hueco; ϵ la permitividad del semiconductor y Ry^* la constante de Rydberg.

La anterior ecuación da como resultado un valor mayor para la energía en la separación de bandas en el caso del QD en relación con el semiconductor de la misma composición ($\Delta E_{g,QD} > \Delta E_{g,s}$). Los términos incluidos en el segundo miembro de la ecuación determinan esa diferencia, especialmente el término $(h^2/8R^2) [(1/m_e^*) - (1/m_h^*)]$ que se deriva de considerar la separación de carga en el excitón de forma similar al problema de una partícula confinada entre paredes de energía potencial infinita.

La anterior ecuación establece una relación inversa entre el tamaño del QD y el “band gap”. Así, por ejemplo, al aumentar el tamaño del QD (aumento de R) disminuye la diferencia entre las energías para ($\Delta E_{g,QD} > \Delta E_{g,s}$). Esto significa un desplazamiento de la banda de absorción hacia el rojo. El efecto contrario se obtendrá si se disminuye el tamaño del QD lo que se traduce en un aumento de la diferencia entre las energías del “band gap” del QD y del semiconductor, de modo que la banda de absorción se desplazará hacia el azul. Este efecto se superpone al término de interacción columbimétrica en el que la diferencia energética del “band gap” se relaciona con R^{-1} . Es evidente que la combinación de los efectos de confinamiento cuántico originan cambios en las propiedades de los QDs haciéndolos dependientes del tamaño.

Las condiciones impuestas a la aproximación de Brus no siempre han resultado suficientes para justificar los datos experimentales. Esto ha motivado que se hayan realizado otros intentos para conseguir una mejor coincidencia entre las energías teóricas y los datos experimentales encontrados para los QD de más pequeño tamaño (Alivisatos, 1996; Zhang, 1997; Empedocles y Bawendi, 1999; Sapra y Sarma, 2004; Meulenberg et al, 2009)

Aunque, en general, los aspectos esenciales de los procesos de absorción en QDs son conocidos, no sucede otro tanto con los procesos emisivos de los que quedan importantes cuestiones por dilucidar. Básicamente, la fluorescencia en los QDs está originada por la existencia del excitón que, en sí mismo, representa una separación de cargas. Así pues, la recombinación del electrón en la banda de conducción con un hueco en la banda de valencia puede producirse con liberación de energía en forma de emisión fotónica.

El diagrama que se muestra a continuación (Figura 6), muestra una interpretación de los eventos que acompaña a la absorción en los QDs (Juzenas et al, 2008). Es un esquema simplificado similar al de Jablonski que ofrece una interpretación sencilla de los procesos que pueden acompañar la emisión en un QD.

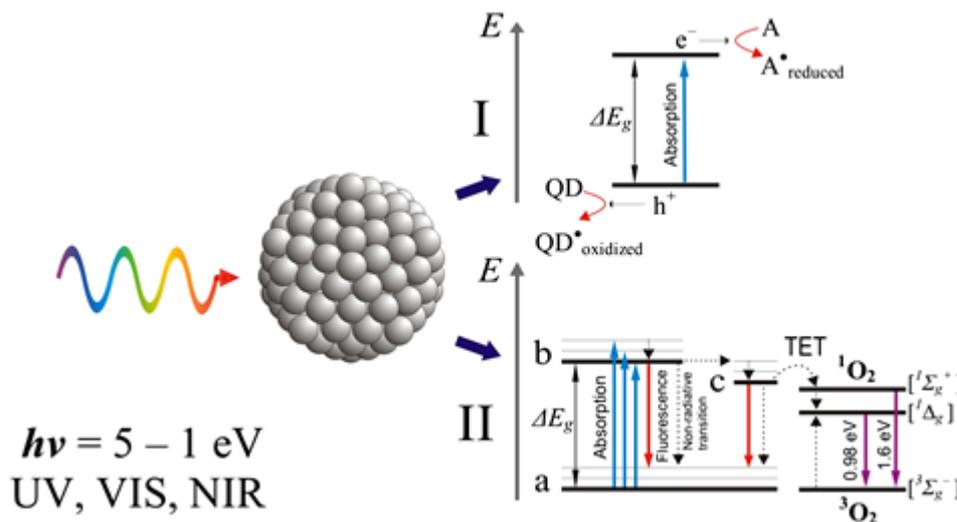


Figura 6. Reprinted from Advanced Drug Delivery Reviews, 60 (15), Petras Juzenas et al., Quantum dots and nanoparticles for photodynamic and radiation therapies of cancer, 1600-1614, Copyright (2008), with permission from Elsevier

De un modo similar a como se describen en el diagrama de Jablonski los estados electrónicos en las moléculas orgánicas, en este caso se consideran tres niveles que representan estados energéticos de los QDs. Siguiendo el esquema mostrado en la parte inferior del diagrama (parte II) se observa que los tres niveles incorpora un nivel nuevo “c” que es conocido como estado excitónico “oscuro” (dark) o “trampa” (trap) que puede ser poblado a partir de una transición no radiativa desde el estado excitado “b” (Bawendi et al, 1992). De este modo, la absorción de un fotón de energía adecuado puede provocar un excitón que constituye un estado excitado del QD que puede dispersar energía por emisión de un fotón o sin emisión produciéndose en ambos casos la recombinación del par electrón-hueco. Pero puede igualmente disipar energía en una transición no radiativa al estado “c” que es un estado de vida media larga comparable al estado triplete en algunas moléculas orgánicas pudiendo incluso si la energía implicada así lo permite, provocar la transferencia energética al oxígeno molecular y provocar la aparición de oxígeno singlete.

Dependiendo de las dimensiones del QD, la emisión fluorescente puede abarcar desde el ultravioleta hasta el infrarrojo cercano (200-1350 nm) en una relación inversa (Wilson et al,1993) de modo que los QD de tamaño relativamente grande, a los que le corresponden un ‘band gaps’ pequeño, tendrán una emisión a longitudes de onda larga (rojo) mientras que al disminuir el tamaño del QD, e incrementarse el ‘band gaps’, las emisiones se desplazan a longitudes de onda más pequeñas (azul). El tamaño de la nanopartícula puede ser controlado durante el proceso de síntesis (Zhong, 2009).

Como ya se ha indicado, se pueden preparar QD a partir de elementos semiconductores de los grupos III-V (In, Ga), pero un número importante de los QD se obtienen empleando elementos correspondientes a los grupos II-IV (CdTe, CdSe, CdS, ZnSe, ZnS, PbS, PbSe, PbTe, SnTe). Sin embargo, para los diversos usos de los QD, tan importante como el núcleo semiconductor es la combinación núcleo/recubrimiento. Para la mayor parte de las aplicaciones de los QD, se emplean en disoluciones coloidales, por ello en la obtención de QD es la producción de nanocristales semiconductores además de los objetivos generales como son fluorescencia alta, se busca igualmente que sean fáciles de sintetizar, preferiblemente que sean solubles y estables en medio acuoso y, en aquellos casos que así se requiera, que sean biológicamente compatibles.

En general, las propiedades ópticas de los QD están determinadas por sus elementos que lo constituyen, el tamaño de la partícula, su distribución y su química superficial, concretamente los enlaces en superficie que permiten el recubrimiento de la nanopartícula (Dabbousi et al, 1997). El pequeño tamaño condiciona su comportamiento como nanopartículas cuyos átomos se excitan y emiten de una forma simultánea incrementando el flujo fotónico, de ahí 1) su relativamente alto rendimiento cuántico de fluorescencia al que unen 2) una reducida destrucción fotoquímica (fotoblanqueo, photobleaching) (Bruchez et al, 1998; Chan and Nie, 1998) debida a su composición inorgánica y 3) , en general, una alta fotoestabilidad (Dabbousi et al, 1997; Wu et al, 2003), además de 4) un tiempo de vida relativamente largo, que permite discriminar la señal fluorescente del QD de la de otros fluoróforos presentes en las estructuras biológicas, asociado a un coeficiente de absorción molar alto (Leatherdale et al, 2002). Por otra parte, 5) los QDs presentan anchas banda de absorción a la vez que estrechas y simétricas bandas de emisión. Ambas circunstancias puede aprovecharse para la excitación simultáneas de varios QD que emiten a diferentes longitudes de onda lo que facilita el análisis por multiplexación con interesantes aplicaciones en biología y biotecnología (Daham et al, 2001). Estas propiedades ópticas son en su conjunto muy superiores a las que poseen los fluoróforos orgánicos utilizados como sondas (Resch-Genger et al, 2008, para una revisión detallada).

Tal como ha sido señalado reiteradamente en la literatura científica (Medintz et al, 2005; Li et al, 2007; Zhong, 2009) las propiedades de los QDs han significado un revulsivo en muchos aspectos de la investigación biológica. Los QD han probado su utilidad en biomedicina tanto en la obtención de imágenes de estructuras celulares ('in vitro' y 'in vivo') (Biju et al, 2008; Bentolila et al, 2009) como en el análisis de reacciones bioquímicas fundamentalmente en relación con la dinámica de los procesos celulares. Dentro de las aplicaciones en biomedicina podría citarse igualmente el uso de QD en análisis inmunohistoquímico mediante multiplexación (Mattoussi et al, 2000; Sutherland, 2002) o hibridación 'in situ', técnicas que combinadas con el análisis multiespectral permiten la localización y cuantificación de la expresión génica en tejidos (Byers y Hitchman, 2011). Así mismo, la funcionalización de QD para producir bioconjugados permite caracterizar dianas específicas y combinadas con técnicas histoquímicas resultan una herramienta adecuada para la

detección e identificación de los perfiles moleculares asociados a la infección con algunos organismos patógenos (Agrawal et al, 2005; Bentzen et al, 2005; McVeigh, 2006). Estas metodologías han sido aplicadas al diseño de sensores en diversas áreas que incluyen hibridación de ADN (Goldman et al, 2002; Kim et al, 2007; Cui et al, 2008; Marin, S. y Merkoçi, 2009) proteínas y antígenos (Gao et al., 2004; Choi et al., 2006; Genin et al, 2008), células cancerosas (Cai et al, 2006; Hu et al, 2006; Yong, 2009) y virus (Deng et al, 2007; Zhang et al, 2007). A lo anterior podría sumarse el uso de QD en analítica clínica (Zrazhevskiy y Gao, 2009; Smith y Nie, 2009). Algunas de estas aplicaciones como biosensores se han adaptado a nuevas estrategias tecnológicas como es el uso de sistemas con microflujos (microfluidic system) (Vannoy et al, 2011).

Uno de los campos relacionados con los sensores es la determinación de iones. Un nanosensor fluorescente con capacidad para interaccionar con iones de interés fisiológico, debe poseer una alta sensibilidad y selectividad incluso en presencia de concentraciones altas de otros iones. Algunos QD han sido estudiados con esta finalidad (Zhang et al, 2011; Chen y Rosenzweig, 2002; Liang et al, 2004; Li et al, 2005; Ghosh et al, 2009).

Recientemente, las nanopartículas formadas con el núcleo semiconductor de CdTe se han propuesto para la detección y análisis de diversos compuestos. Así, CdTe quantum dots estabilizados con ácido tioglicólico, cisteína y L-cisteína han sido usados para la detección de protoporfirina IX (Zhang et al, 2011) mientras que CdTe-QD estabilizados con ácido tioglicólico se han utilizado para detectar la actividad enzimática de la lactatodehidrogenasa y para determinar la concentración de glucosa (Yang et al, 2011). Así mismo, varios trabajos se han centrado en el uso de CdTe-QD para la cuantificación de metales biológicamente relevantes (Chen y Rosenzweig, 2002; Liang et al, 2004; Li et al, 2005; Ghosh et al, 2009; Priyam et al, 2009; Koneswaran y Narayanaswamy, 2009).

Los QD son, en general un muy buen material para la determinación de Cu(II) a muy baja concentración. Pero no son los únicos.

En el campo de la detección de iones metálicos de interés fisiológico, se han conseguido resultados excelentes con el uso de nanopartículas poliméricas o de sílice como material de soporte para incorporar covalentemente combinaciones de agentes

quelantes de iones con fluoróforos (Méallet-Renault et al, 2006) o diferentes tipos de fluoróforos (Frigoli et al, 2009) que permiten llegar a niveles de detección de 20 nM. Un límite incluso inferior (10nM) se llega a alcanzar mediante un método espectrofotométrico empleando con nanopartículas de oro estabilizadas con citrato (Lu et al, 2012).

Sujetos y Metodología

SUJETOS Y METODOLOGÍA

El estudio general se basó en un modelo de **estudio multicéntrico observacional prospectivo analítico**, con seguimiento, en los pacientes críticos, durante su estancia en UCI a lo largo de una semana de estancia, comparando con un grupo control de individuos sanos de características similares.

En el organigrama siguiente (figura 7), se muestran los pasos llevados a cabo desde la selección de los sujetos tanto controles como pacientes críticos, hasta la obtención de los resultados.

1. SUJETOS DEL ESTUDIO Y CRITERIOS DE INCLUSIÓN

1.1. Grupo control

La selección de la muestra del grupo control se realizó en base a dos criterios fundamentales: personas adultas mayores de 18 años, sanas, y que no tomaran ningún tipo de suplemento nutricional.

La población de referencia seleccionada para el grupo control, estuvo constituida por un colectivo de personas sanas adultas, con edades comprendidas entre los 21 y 76 años, de los cuales 43 fueron hombres y 58 mujeres, todos pertenecientes a la provincia de Granada.

El criterio de inclusión se basó en la aceptación de los sujetos a participar en el estudio (*Anexo 1*), además de la ausencia de cualquier tipo de patología que pudiera afectar su situación nutricional.

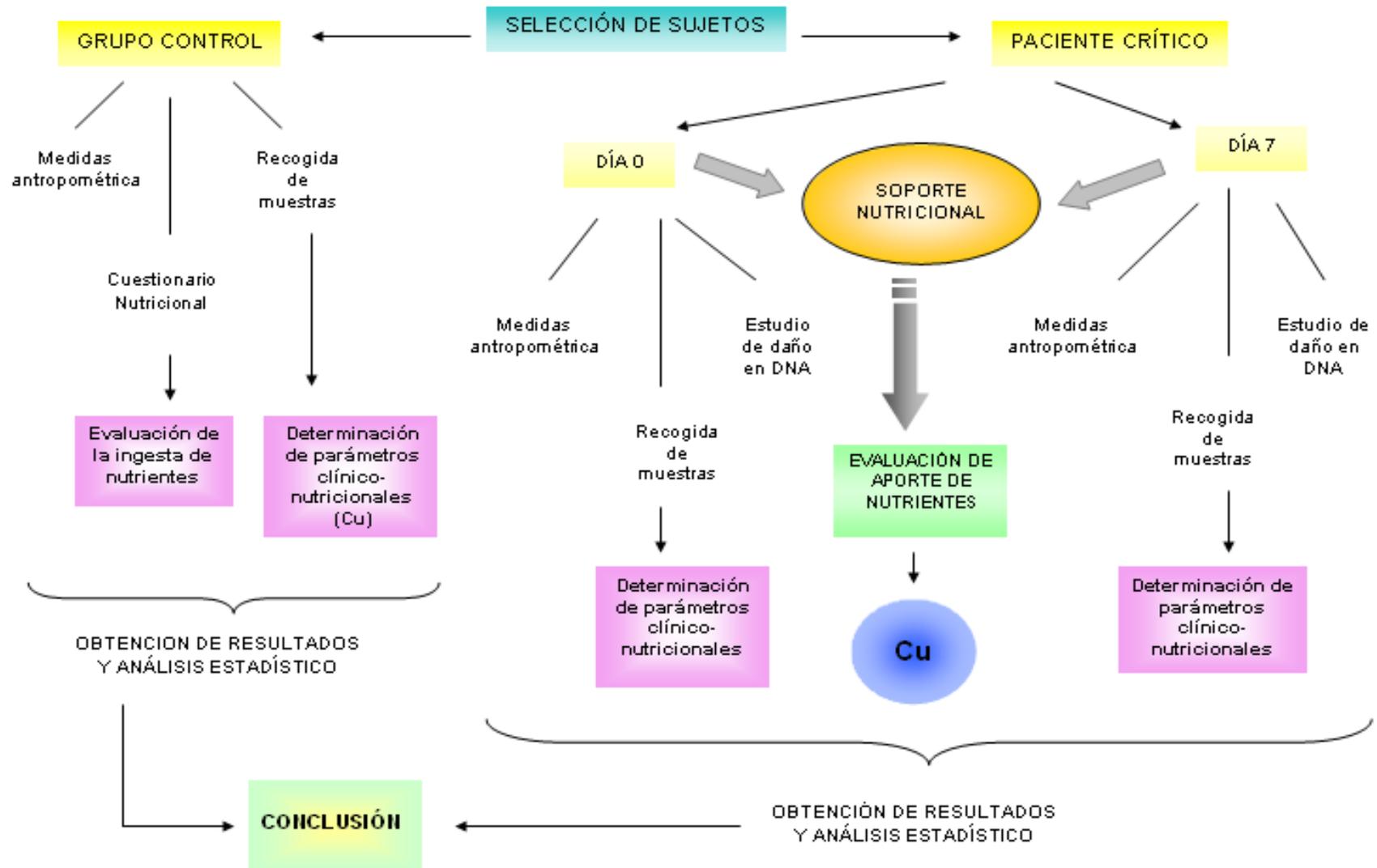


Figura 7. Diseño del estudio

1.2. Grupo críticos

Los sujetos incluidos en el grupo de pacientes críticos pertenecían a las Unidades de Cuidados Intensivos de los Hospitales del área de Granada: De Granada Capital, el Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Hospital Universitario San Cecilio y Hospital Traumatológico. Hospital General de Baza y Hospital Santa Ana de Motril.

Para la recogida de muestras de los pacientes ingresados en el Hospital en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) los pacientes debían cumplir los siguientes criterios mínimos de inclusión:

- Ser pacientes mayores de 18 años.
- Cumplir un APACHE* con puntuación mínima de 15.
- Estar en presencia de SIRS*.
- Ser alimentado mediante nutrición artificial, ya sea Nutrición Enteral o Nutrición Parenteral.
- Los pacientes se debían encontrar en situaciones clínicas que les impidieran alimentarse por vía oral, como es el caso de la presencia de alteraciones neurológicas (accidentes cerebrovasculares, lesiones degenerativas neurológicas, tumores del sistema nervioso central, infecciones...) lesiones musculares o esqueléticas (distrofia muscular, miastenia grave...).
- Estar en situaciones que afectan a la boca o el tracto digestivo alto que impidan parcial o totalmente, o contraindiquen el paso de nutrientes por esta vía a las demás porciones del sistema digestivo (neoplasias, traumas, obstrucciones benignas, cirugía, fístulas del tracto digestivo alto, trastorno funcional en el esófago y duodeno).
- La permanencia en la Unidad de Cuidados Intensivos debía de ser al menos de 7 días para el estudio de la evolución nutricional a lo largo de la estancia en la unidad.

* Tanto SIRS como APACHE II se calcularon utilizando la información del hospital. Se evaluaron las constantes vitales y se analizó la situación crítica del paciente.

Únicamente se incluyeron en el estudio aquellos pacientes de los que se obtuvo el consentimiento informado para la *“Evaluación del estado nutricional y Estrés oxidativo”* por parte del paciente o del familiar, teniendo en cuenta que este estudio

posee aprobación del *Comité Ético y del Comité de Investigación del Centro de ejecución* del mismo (Anexos 2 y 3).

Los pacientes no se podían encontrar en situación de aislamiento (por enfermedades altamente contagiosas), ni presentar alergias, cáncer, SIDA... al ser situaciones patológicas que alteran gravemente los parámetros bioquímicos.

1.3. Tipo de muestreo

Para la obtención de las muestras, se utilizó un muestreo no probabilístico consecutivo, ya que se incluyeron todos los sujetos y pacientes que cumplieron los criterios de aceptación para entrar en el estudio.

Una vez concluida la fase de estabilización hemodinámica, se realizó a todos los pacientes la extracción total de 20 mL de sangre a primera hora de la mañana, repitiendo este proceso a los 7 días del ingreso.

1.4. Recogida de datos

Tal y como se muestra en el diagrama, a todos los sujetos controles participantes en el estudio se les realizó la recogida de sus datos personales, estilo de vida, etc. Además, en el momento de la cita, se les realizó una encuesta nutricional para valorar la ingesta de alimentos y nutrientes.

La valoración del estado nutricional se realizó con el empleo de tres herramientas:

- 1) Análisis y valoración de la ingesta dietética
- 2) Estudio y valoración antropométrica
- 3) Valoración de los parámetros bioquímicos

En el caso de los pacientes críticos, a todos, tanto en el momento de inclusión en el estudio (previo a la intervención nutricional), como al séptimo día de seguimiento, se les recogió toda la información correspondiente a:

- Parámetros bioquímicos, valorados a partir de muestras de sangre.
- Medidas antropométricas.

La evaluación de ingesta de nutrientes se realizó de manera continuada a lo largo de la estancia en UCI, durante el tiempo que el paciente se encontraba dentro del periodo de estudio (7 días).

2. METODOLOGÍA

2.1. Análisis y valoración de la ingesta dietética

Tal y como se ha comentado en el apartado correspondiente a los antecedentes bibliográficos, en la valoración del estado nutricional a través de la ingesta cuando se trata de grupos de población, una de las herramientas más útiles son la encuesta de frecuencia y consumo de alimentos junto con un recordatorio de 24, 48 ó 72 horas.

En este estudio se realizó una encuesta de frecuencia de consumo junto con un recordatorio de 24 horas. Ambas técnicas fueron aplicadas con el fin de conocer con la mayor exactitud posible los hábitos alimentarios de los sujetos, empleando para ello álbumes fotográficos para estimar el tamaño de las raciones e ingredientes de los platos utilizados habitualmente en nuestro país.

En este punto de la entrevista, además de recoger toda la información correspondiente a los hábitos nutricionales, se recogió información relativa al estilo de vida de los individuos y los hábitos de consumo, como son la práctica o no de ejercicio físico, si el sujeto es fumador, si consume alcohol, si toma algún tipo de medicamento, etc.

El *software* empleado para la transformación de los distintos alimentos e ingredientes en nutrientes, fue el programa *Nutriber*® (Mataix et al, 2009), obteniendo así toda la información correspondiente al consumo calórico, de macronutrientes y de micronutrientes.

En el caso de los pacientes, uno de los requisitos fundamentales para su inclusión en el estudio, fue el de ser alimentados mediante un soporte de nutrición artificial. Desde el momento de la inclusión de los pacientes en el estudio y durante un periodo de tiempo de 7 días, realizamos un seguimiento y registro diario de la cantidad y tipo de soporte nutricional administrado al paciente, de modo que se realizó una evaluación del aporte de nutrientes.

La elección del soporte nutricional en los pacientes ingresados se realizó siguiendo el protocolo utilizado en la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital Virgen de la Nieves (Granada) diseñado por la Unidad de Nutrición del mismo hospital (Tabla VIII).

Nutrición Parenteral	Nutrición Enteral
Kabiben periférico	Glucerna Select
Structokabiben	Pulmocare
Formula III*	NEPRO
Formula IV*	Oxepa
Formula V*	Peptisorb
Formula VII*	Diason
Complemento polimineral Addamel	Osmolite
Complemento polivitamínico Cernevit	Novasource Diabet
Volumen	
Suero Glucosado 5%	
Suero Fisiológico	
Suero Glucosalino	

Tabla VIII .Fórmulas y suplementos administrados a los pacientes durante su estancia en UCI. *Realizada en la farmacia del hospital Virgen de las Nieves.

Desde el momento en el que se realizó la inclusión de un paciente en el estudio, se realizó a cada uno de ellos un seguimiento observacional hasta el séptimo día de estancia. Durante todo este tiempo se recogió a diario toda la información referente al aporte nutricional, de modo que no solo se registraba el tipo de nutrición (enteral o parenteral) si no también, el volumen, la velocidad de administración, el uso

o no de suplementos nutricionales, el tipo o tipos y cantidad de los sueros administrados (suero fisiológico, glucosado...) o cualquier otro complemento o medicamento que pudiera influir en la valoración del aporte de nutrientes.

La selección del soporte nutricional, se realizó de acuerdo a un gran número de variables, ya que existen fórmulas especiales comercialmente diseñadas en función de:

- Los distintos grados de estrés.
- La presencia de estados patológicos específicos previos al ingreso (diabetes, hipertensión...).
- La patología general.
- Estado del tracto digestivo.
- Otros.

Tanto los soportes nutricionales como cualquier tipo de complemento (medicamento o nutricional) poseen una composición detallada de todos los nutrientes, de modo que con esta información y conociendo el volumen de fórmula administrada, se calculó a cada paciente la ingesta real diaria de cada uno de los nutrientes, así como de la energía.

La nutrición artificial (enteral o parenteral) es un método adecuado de alimentación cuando los enfermos no pueden, no quieren o no deben alimentarse por vía oral.

De tal modo que una vez realizada la valoración del paciente, y elección del tipo de nutrición (enteral, parenteral o mixta), la selección de una fórmula u otra se realizó principalmente en función de las siguientes variables:

- 1) Los requerimientos energéticos.
- 2) El grado de hipermetabolismo (nivel de estrés).
- 3) Estado nutricional previo.

1. Cálculo de los requerimientos energéticos: Para su determinación se podían seguir dos vías distintas, una mediante la realización del cálculo del

gasto energético, o bien empleando como referencia los límites establecidos en las recomendaciones de la ESPEN:

- Durante la fase aguda de la enfermedad crítica, no se deben exceder de las 20-25 Kcal/Kg/día.
- Durante la fase de recuperación anabólica, el objetivo se estableció entre 25-30 Kcal/Kg/día.
- En el caso de pacientes con desnutrición severa el objetivo nutricional será el de un aporte >30 Kcal/Kg/día.

2. El grado de hipermetabolismo (nivel de estrés): El grado de estrés metabólico se determinó en función de cinco parámetros, dentro de los cuales se establecieron distintos niveles de gravedad, tal y como se indica en la Tabla IX.

Grado de Estrés	Grado 0	Grado 1	Grado 2	Grado 3
Situación Clínica	Ayuno	Cirugía mayor	Politraumatismo	Sepsis
Nitrógeno uréico (gr/día)	< 5	5 – 10	10 – 15	15 - 20
Glucemia (mg/día)	100 ± 20	150 ± 25	200 ± 25	250 ± 50
Resistencia a la insulina	NO	NO	NO/SÍ	SÍ
Índice de consumo de O ₂ (ml/mn.m ²)	90 ± 10	130 ± 10	140 ± 10	160 ± 10

Tabla IX. Valoración y clasificación del grado de estrés.
Recogido del Protocolo para Nutrición Parenteral, Hospital Virgen de la Nieves, 2006

3. Estado nutricional previo: Esta valoración se debe realizar en el momento del ingreso del paciente en la unidad de cuidados intensivos; en la medida de lo posible es preferible que cada persona sea comparada con sus propios valores y no con unos valores estándar de referencia; por este motivo, los métodos empleados más representativos fueron los siguientes:

- a. Peso real comparado con el peso ideal
- b. Porcentaje de pérdida de peso
- c. Peso actual, habitual e ideal
- d. Circunferencia de la muñeca
- e. Determinación de la complexión
- f. Circunferencia muscular del brazo
- g. Determinación del pliegue tricípital
- h. Índice de Masa Corporal (IMC)

En el caso de la **nutrición enteral**, la elección de la fórmula se realiza principalmente en base a dos aspectos:

- Realización de una revisión de las distintas fórmulas de nutrición enteral, estudiando de cada una de ellas, tanto la composición y proporción tanto de los macronutrientes como de los micronutrientes, seleccionando la fórmula más adecuada según la patología del paciente (poliméricas, oligoméricas, especiales...).
- Estudiar la existencia de incompatibilidades entre la administración de la alimentación por vía enteral con la vía de administración de medicamentos.

En el caso de la **nutrición parenteral**, la selección de la dieta, se realizó en función del grado de estrés y el peso del paciente, tal y como se refleja en la Tabla X (en el caso de las fórmulas elaboradas por el servicio de farmacia del hospital).

PESO (kg)	GRADO DE ESTRÉS			
	1	2	3	4
40 – 50	I	I	III	III
51 – 60	I	IV	IV	V
61 – 70	IV	IV	V	V - VI
71 - 80	IV	V	VI	VI

Tabla X. Selección de la dieta en función del peso del paciente y el grado de estrés. Recogido de: Protocolo para Nutrición Parenteral, Hospital Virgen de la Nieves, 2006.

Asimismo, en el caso de la Nutrición Parenteral, la selección de la vía de administración (periférica o central) se realizó en función de la osmolaridad de la fórmula, de tal modo que:

- Vía central:** subclavia, yugular interna o femoral para pacientes con necesidades nutricionales que requieren concentraciones superiores a 800 mOsm/L.
- Vía periférica:** brazo (cubital o radial) o antebrazo (basílica o cefálica) para pacientes con necesidades nutricionales que requieren concentraciones superiores a 800 mOsm/L,

En base a los puntos anteriores, las fórmulas y suplementos que se administraron a los pacientes, y de los que se ha realizado la valoración del aporte nutricional se describen en la Tabla XI.

NUTRICIÓN PARENTERAL	NUTRICIÓN ENTERAL
Kabiben periférico	Glucerna Select
Structokabiben	Pulmocare
Formula III*	NEPRO
Formula IV*	Oxepa
Formula V*	Peptisorb
Formula VII*	Diason
Complemento polimineral Addamel	Osmolite
Complemento polivitamínico Cernevit	Novasource Diabet
Volumen	
Suero Glucosado 5%	
Suero Fisiológico	
Suero Glucosalino	

Tabla XI. Fórmulas y suplementos administrados a pacientes durante su estancia en UCI.

2.2. Determinaciones antropométricas

Además de la valoración nutricional, se determinaron medidas antropométricas básicas a todos los sujetos pertenecientes al grupo control. Dichas determinaciones antropométricas fueron:

Talla: mediante el empleo de un tallímetro y expresado en cm.

Peso: con una balanza de contrapeso y expresado en Kg.

Pliegues cutáneos: se realizó mediante el uso de un lipocalibre capaz de apreciar variaciones de 0.2 mm.

A partir de las determinaciones de la talla y el peso, se determinó el IMC de los sujetos, que combinado con otros datos antropométricos como la medida de los pliegues, nos proporcionará la información necesaria para la evaluación del estado nutricional, recogiendo una información más precisa en cuanto al contenido de grasa corporal.

2.3. Tratamiento de la muestra

Tanto en el grupo control como en el de pacientes críticos, la extracción de sangre se realizó a primera hora de la mañana en ayunas mediante tubos de vacío (*Venohject®*) con anticoagulante para facilitar la separación del plasma de la muestra.

En el caso de los pacientes críticos, la muestra se recogió según el protocolo del hospital, preservando en todo momento al paciente de cualquier tipo de invasión extraordinaria a la indicada por el médico intensivista y previo consentimiento informado. En todos los casos, la muestra de sangre se extrajo por personal cualificado y autorizado.

La sangre, una vez recogida, se llevó a los laboratorios de INyTA y se procedió a la separación tanto de plasma como de eritrocitos, dividido en alícuotas que se emplearon para su análisis posterior.

La separación de alícuotas de plasma y eritrocito se realizó mediante la siguiente técnica:

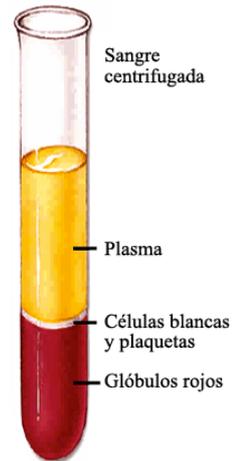
1. Centrifugamos el lote de tubos en centrífugas de refrigeración durante 15 minutos a 3000 rpm.

2. Extraemos el **plasma** con una pipeta *Pasteur*, separando alícuotas con un volumen de 250 mL de plasma en cada tubo *Eppendorff*.

3. Una vez que tenemos las alícuotas de plasma, lavamos con solución salina la sangre restante y volvemos a centrifugar en las mismas condiciones.

4. Eliminamos la solución salina sobrenadante y extraemos **eritrocitos** también en forma de alícuotas de 250 mL en tubos *Eppendorff*.

5. Almacenamos a -80°C las diferentes alícuotas para su posterior análisis.



Todo el proceso se realizó en condiciones de oscuridad y en frío, con la máxima rapidez para evitar la oxidación de las muestras.

2.4. Análisis bioquímico

En ambos grupos, se realizaron determinaciones bioquímicas de los niveles plasmáticos de:

- Proteínas totales
- Albúmina
- Prealbúmina
- Transferrina
- Ferritina
- Colesterol total
- Colesterol HDL
- Colesterol LDL
- Glucosa

- Homocisteína

En cuanto al análisis bioquímico de los pacientes críticos, no sólo se determinaron los parámetros relacionados con el estado nutricional, si no que además se determinaron numerosas variables asociadas tanto a la situación antioxidante de los pacientes, como al estado inflamatorio de los mismos.

2.5. Mineralización por vía húmeda

Para la realización de una mineralización por este método, se introdujo en un vaso de precipitado 0.5 mL de muestra (eritrocitos o plasma) tapándolo con vidrio de reloj invertido. Una vez situados los vasos en el baño de arena, se añadió ácido nítrico hasta el cese de emisión de vapores nitrosos (rojos).

Posteriormente se añadieron entre 1-2 mL de ácido perclórico hasta que se produjo una emisión de vapores blancos, momento en el cual se finaliza el proceso de mineralización.

Una vez frías las disoluciones se les añadieron 1 mL de ácido clorhídrico 5 N, llevando la solución de cada una de las muestras a un matraz de cristal. A continuación, se enrasó con agua bidestilada hasta obtener un volumen final de 25 mL, sin filtrar.

Finalmente se envasaron y codificaron las disoluciones, almacenándolas a temperatura ambiente hasta el momento de determinación del mineral (cobre).

2.6. Determinación de cobre

Una vez hecha la mineralización se procede a medir el cobre con Espectrofotómetro de Absorción Atómica (PERKIN ELMER AANALYST 300, NORWALK, CT, USA) (Figura 8), con llama de aire-acetileno. Se empleó una lámpara de cobre de cátodo hueco con un slit de 1,9 mm y longitud de onda de 324.8 nm. Todo el material fue previamente lavado con ácido nítrico al 20% y enjuagado con agua bidestilada. Se realizó un control de calidad del método empleando un control de referencia (BCR, liver bovine, Germany), obteniendo una fiabilidad del 96%.

La solución mineralizada se mide, en el caso del cobre, directamente, sin diluir, utilizando el espectrofotómetro que está conectado a un ordenador, y que leerá toda la información procedente de la muestra.



Figura 8. Espectrofotómetro de Absorción Atómica

2.7. Determinación de la actividad de la SOD

Para medir la enzima Superóxido dismutasa (SOD) se utilizó el kit BIOXYTECH SOD-525 (Spectofotometric Assay for Superoxide Dismutase for Research).

La técnica SOD-525 se basa en medir SOD mediante un incremento de auto-oxidación a 5, 6, 6^a, 11B-tetrahydro-3,9,10-tri-hidroxi venzo[c]fluorene en una solución alcalina con un máximo de absorbancia de 525 nm.

La lectura se hace con lector de placas (BIO-TEK INSTRUMENTS, INC., VERMONT, USA) (Figura 9).



Figura 9. Lector de placas.

2.8. Poder Antioxidante Total

La determinación del Poder Antioxidante Total (PAO) se realizó mediante una medida indirecta colorimétrica, en la que se evaluó la capacidad de los antioxidantes como sustrato en la reacción de reducción del Cu^{2+} a Cu^+ .

En esta reacción se pusieron en contacto todas las muestras con una solución de Cu^{2+} , de tal modo que ante la presencia de antioxidantes, éstos realizarán una reducción de Cu^{2+} a Cu^+ ; dicha reducción producirá una reacción colorimétrica que será posteriormente evaluada mediante la medición de la absorbancia a 490 nm, determinando así la capacidad antioxidante de la muestra, midiendo no sólo moléculas antioxidantes hidrófilas como la Vitamina C o glutatión, si no también, moléculas hidrófobas como la Vitamina E, entre otras.

Para el análisis realizamos dos pasos previos para la preparación de la muestra y reactivos de la siguiente manera:

- Por un lado, antes de comenzar el procedimiento, se realizó una dilución previa de la muestra.
- Paralelamente se procede a la preparación de la mezcla para el análisis tanto de la muestra como del estándar necesario para la posterior elaboración de la curva patrón.
- Una vez preparados, tanto las muestras como los reactivos, el procedimiento de análisis comprendió cuatro puntos:
 1. Se montó la placa de 96 pocillos con las muestras por duplicado, el blanco y los estándares para la confección de la curva patrón con 200 μL de mezcla en cada pocillo y posterior lectura a 490 nm.
 2. Una vez realizada esa primera lectura, se añadieron 50 μL de solución de Cu^{2+} a cada pocillo e incubamos durante 3 minutos.
 3. Transcurridos esos 3 minutos, se procedió a una segunda lectura de la placa a 490 nm.

4. Por último, una vez realizada esa segunda lectura, se añadieron en este punto 50 μL de Solución de Parada (Stop Solution) realizando una nueva lectura a 490 nm lo más rápidamente posible.

2.9. Ensayo Comet

Para determinar el daño de ADN por estrés oxidativo, se realizó el ensayo comet para lo cual incluyó el previo aislamiento de leucocitos y la electroforesis alcalina que a continuación se describen. Para realizar este ensayo se seleccionaron al azar 12 individuos de la población crítica y se determinó tanto al inicio como a los 7 días de estancia en UCI. Para realizar el análisis de los datos se emplearon los valores de *Tail Moment* obtenidos. El *Tail Moment* se define como el producto de la longitud de la cola y la fracción de ADN total en dicha cola. A mayor *Tail Moment*, mayor será el daño del ADN.

2.9.1. Aislamiento de leucocitos

Consiste en una centrifugación en gradiente de densidad. Mezclamos la misma cantidad de sangre total y tampón fosfato (PBS) libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} . Ponemos 4 mL de *lymphoprep* en tubos de ensayo y añadimos 2 mL de la mezcla anterior, dejándola caer suavemente por las paredes del tubo de modo que ésta quede suspendida encima del *lymphoprep*. A continuación centrifugamos a 2500 rpm durante 15 minutos. Tras esta centrifugación observamos claramente el gradiente de densidad formado, encontrando, por orden, en el fondo los eritrocitos, el *lymphoprep*, una nube de leucocitos y el plasma. Retiraremos dicha nube y la almacenaremos con una disolución de PBS y dimetil sulfóxido (DMSO) al 10% en tubos *Eppendorf* a -80°C .

2.9.2. Electroforesis alcalina

El *ensayo comet* se empleó para analizar el daño en el ADN de linfocitos aislados con *lymphoprep*. Las células fueron mezcladas con 65mL de PBS libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} con un 0.7% de agarosa de baja fusión (LMA), y se esparció rápidamente sobre una placa previamente condicionada con un 1% de agarosa de fusión media (NMA) disuelta en PBS libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} . Después de la solidificación de la LMA

tras 15 minutos sometida a 4°C, se añadió 75 mL más de LMA a la placa. Después de mantener otro 15 minutos las placas a 4°C, para romper las células embebidas y para permitir que el ADN se separe, se introdujeron las placas durante 2 horas en una solución de lisis muy fría, previamente preparada con 1% de N-lauril sarcosinato de, 2.5 M de NaCl, 100 mM de Na₂EDTA, 10mM de Tris-Hcl, pH 10 con Triton X-100 y 10% de DMSO. Después de la lisis, las placas se introdujeron en un baño de electroforesis. Ésta se llevó a cabo bajo unas condiciones de 20 V y 300 mA durante 20 minutos y a 4°C. Después de la electroforesis, las placas fueron generosamente lavadas con tampón de neutralización (Tris-Hcl 0.4M, pH 7.5) para neutralizar el exceso alcalino y eliminar los detergentes.

Para su lectura en el microscopio de fluorescencia, las placas fueron tintadas con bromuro de etidio, añadiendo 10 mL de éste antes de su lectura.

2.10. Determinación de cobre por QD

2.10.1 Síntesis de QD

El procedimiento que se ha seguido para la obtención de CdTeQD-Lcys se encuentra descrito en la literatura (Zhang et al, 2003; Priyam et al, 2007; Ghosh et al, 2009). Se pesaron 134.5 mg de H₂TeO₄.2H₂O (0,6 mmol) (>99% Alpha Aesar, USA) a los que se añadieron 0.7 mL de agua bidestilada. La mezcla se mantuvo 2 minutos en ultrasonido y, posteriormente, se le hizo pasar nitrógeno durante 10 minutos. Tras el barboteo con nitrógeno se añadieron 90.2 mg (2.4 mmol) de borohidruro de sodio (NaBH₄, Sigma, Spain). A continuación calentó la mezcla de reacción a una temperatura 69-70 °C produciéndose un cambio de color a blanco-transparente. En ese momento se dejó el recipiente conteniendo la mezcla de reacción en hielo y se mantuvo así durante dos horas.

Por otra parte, se pesaron 0.3619 g de nitrato de Cd [Cd(NO₃)₂.4H₂O] (1.19 mmol) (Sigma, Spain) y 0.4615 g (2.94 mmol) de clorhidrato de cisteína (Sigma, Spain) y se disolvieron en aproximadamente 30 mL de agua bidestilada. Se añadió NaOH hasta un pH próximo a 11.62 y se enrasó con agua bidestilada a 50 mL (pH final 11.55). Para las medidas de pH se utilizó un potenciómetro Crison calibrado con los tres tampones habituales. Esta disolución se mantuvo una hora bajo paso de argón (ver figura siguiente).



Por otro lado, se barboteó nitrógeno a través de 450 mL de agua bidestilada durante 1 hora. Cinco minutos antes de que se cumplieran las dos horas, se retiró el compuesto obtenido en la primera fase de la síntesis y se atemperó a temperatura ambiente. El contenido presenta un aspecto de sólido de color blanco-amarillento. Cuando se aprecia que se ha producido la fusión del sólido, se extraen 0.5 mL y se adicionan rápidamente a la disolución de Cd y cisteína para evitar la oxidación de NaHTe (Zheng et al, 2004). A continuación el matraz conteniendo la mezcla de reacción se sumergió en el baño de glicerina a 108 °C.



La mezcla de reacción se mantuvo a reflujo durante 25 minutos al cabo de los cuales se extrajo el matraz del baño de glicerina y se dejó enfriar el contenido a temperatura ambiente (ver figura adjunta). Luego, la mezcla se diluyó con los 450 mL de agua que se había barboteado con N₂.

Al día siguiente se hace una filtración a través de filtros Millipore 0.45 μ y el filtrado se reparte en vacutainers y se conservan a 4°C en la cámara fría. Las muestras de los vacutainer se centrifugaron rutinariamente a 2500 rpm durante 20 minutos antes de su uso.

2.10.2 Obtención de las muestras biológicas y pretratamiento

Las muestras biológicas proceden de extracciones de sangre realizadas a individuos sanos y a ingresados en Unidades de Cuidados Intensivos. El volumen de la extracción fue de 10 mL y se realizaron en vacutainers (Venoject®, Terumo Ltd., UK) conteniendo 170 I.U. de heparinato de litio liofilizado. Estas muestras se trataron para separar plasma de eritrocitos para lo que se procedió mediante centrifugación a 3000 rpm durante 15 minutos. Se separa el plasma y la fracción de eritrocito se suspende en una disolución salina 0,9%, se agita y se vuelve a centrifugar en las mismas condiciones. Se separa el sobrenadante y los eritrocitos se reparten en eppendorf conteniendo volúmenes de 0.5 mL cada uno. De la misma forma se hizo con las muestras de plasma.

Para el análisis fluorimétrico se llevó a cabo un tratamiento diferenciado de las muestras de plasma y eritrocito. En el primer caso se diluyeron al 50% y se disolvió urea hasta alcanzar una concentración 8 M. Luego se mantuvieron en agitación durante 90 min. Se conservaron a 6°C. Las muestras de eritrocitos se diluyeron también al 50% con HCl $4 \cdot 10^{-3}$ M y se mantuvieron a 0°C durante 15 minutos. Luego a 1 mL de la disolución diluida de eritrocito se le añadió 0.180 mL de etanol y 0.090 mL de cloroformo y se centrifugó a 13400 rpm durante 30 minutos (Nahita 2507/100, Auxilab, Spain). Todo esto se realizó en el interior de la cámara fría con una temperatura de 6°C. En los casos en que el sobrenadante permaneciera de color rojo, se separó y se mantuvo a 80°C durante 2 minutos. Luego se dejó enfriar y se centrifugó a 13400 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se sometió de nuevo al tratamiento a 6°C con alcohol/cloroformo y se centrifugó de nuevo a 13400 rpm durante 30 minutos. El sobrenadante sin coloración se guardó a 6°C para ser utilizado en los próximos 30 minutos.

2.10.3. Medidas de absorción

Los espectros de absorción y las curvas de calibrados para las medidas de absorción se realizaron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer (Perkin Elmer, Spain) provisto de un sistema de termostatación Peltier.

2.10.4. Análisis por microscopía electrónica de barrido

Las disoluciones de QD fueron analizadas por microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM) y HAADF FEI TITAN G2. El aparato pertenece a los Servicios Técnicos de la Universidad de Granada. :

2.10.5. Medidas por ICP-MS

Se realizaron medidas para la determinación de cobre por espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo y filtro de iones por cuadrupolo ICP_MS NEXION 300D. Este aparato está localizado en los Servicios Técnicos de la Universidad de Granada.

2.10.6. Medidas de fluorescencia

Las medidas de fluorescencia se realizaron en estado estacionario en un fluorímetro Cary Eclipse (Varian-Agilent) utilizando cubetas de 1x1 cm y muestras termostatadas con un sistema Peltier. Las muestras fueron excitadas a 325 nm usando rendijas de excitación y de emisión de 10 nm. Para la calibración de la posición de la microplaca se utilizó sulfato de quinina (90%, Aldrich Chem.) $2 \cdot 10^{-6}$ M en HSO_4 0.015 M. Tras la calibración se registraron los espectros de emisión de la disolución de quinina en 12 pocillos. Cuando la dispersión, expresada como desviación estándar, en el máximo de emisión de la quinina fue superior al 0.01% se procedió a la recalibración o al cambio de microplaca. La determinación del contenido en Cu (II) se realizó utilizando disoluciones de CuCl_2 de concentraciones comprendidas entre $1 \cdot 10^{-7}$ M y $4 \cdot 10^{-7}$ M todas ellas obtenidas por dilución de una disolución estándar 0.3 M (Fluka, USA). El procedimiento típico en la preparación de muestras conteniendo CdTeQD-Lcys, comienza por la dilución del quantum dots en tampón MOPS $6 \cdot 10^{-3}$ M pH 7.4, de modo que la disolución resultante tenga una absorbancia de 0.15 a 325 nm. La dilución necesaria para obtener esta absorbancia es conocida a partir de los resultados obtenidos en el registro de los espectros de absorción con diferentes diluciones de CdTeQD-Lcys. De la disolución de CdTeQD-Lcys resultante se toman 2.9 mL y se completan hasta 3 mL añadiendo 0.1 mL de la disolución conteniendo cobre (muestras biológicas o disoluciones estándar de cobre).

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Para la expresión de los datos se ha utilizado el procedimiento de *estadística descriptiva*, indicándose los resultados de las variables numéricas como media aritmética, desviación estándar ($X \pm SD$), y los resultados de las variables categóricas en frecuencias (%). Como paso previo a la ejecución de un modelo paramétrico o no, se aceptó la hipótesis de distribución normal mediante el test de *Kolmogorov-Smirnov*.

En el estudio de los datos o variables numéricas, se ha utilizado *el test de muestras independientes* para las comparaciones entre los grupos y *el test para muestras relacionadas*, para evaluar la significación estadística del cambio producido en las distintas variables numéricas durante el estudio.

Para todo ello, se ha utilizado el análisis estadístico de la varianza (ANOVA), habiéndose empleado el test de la *t de Student* para los métodos paramétricos, tanto en el caso de muestras independientes, como de muestras relacionadas; el test de *Kruskal-Wallis* para los no paramétricos de muestras independientes; y el *test de Willcoxon*, como test no paramétrico para muestras relacionadas.

Para estudiar los datos o variables categóricas y establecer comparaciones entre los grupos, se ha empleado el test de *Mann-Whitney*, ya que debido al carácter cualitativo de dichas variables no podemos asumir normalidad.

El análisis de regresión lineal se utilizó para la búsqueda de correlaciones bivariadas, utilizando el coeficiente de correlación de *Pearson*.

La estimación del grado de asociación entre cada uno de los parámetros plasmáticos analizados y los resultados clínicos se realizó mediante un análisis de regresión logística.

4. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

La inadecuación del soporte nutricional suministrado por la casa comercial, el retraso por diferentes motivos en su instauración, las pérdidas extras de nutrientes por complicaciones del tratamiento o por la propia enfermedad de base, la administración

de fármacos que interfieren en el proceso de nutrición, las deficiencias organizativas, son causas que derivan en una mala asistencia nutricional en el paciente crítico que ingresa en la UCI (Arias, 2006).

Casi toda la metodología empleada para determinar la composición corporal tiene valor limitado en el paciente crítico, ya que muchos de los pacientes graves están sometidos a ventilación mecánica, hemodiálisis o han necesitado de la infusión de gran cantidad de líquidos para su reanimación, que lleva a la obtención de resultados erróneos, por ejemplo de valores de bioimpedancia por retención de líquidos, inflamación o edemas, o valores de masa magra por degradación proteica muscular durante la situación de estrés metabólico e inmovilidad a la que está sometido el paciente crítico.

Por otro lado, los pacientes que ingresan en la UCI, en su mayoría, no alcanzan el día 7 de estancia o dejan de tener soporte nutricional artificial, debido a diferentes causas, como, principalmente, la mortalidad, o también la ingesta de alimentos o la intolerancia en la administración del soporte enteral o parenteral, el traslado a planta, etc. Todos son factores que no permiten el estudio de la evolución del paciente durante su estancia en la unidad.

Así mismo, la selección del paciente según criterios de inclusión se hace ardua y la aceptación a participaren el estudio resulta complicada al ser los familiares los que deben ser informados y tomar la decisión.

Resultados del Estudio

RESULTADOS DEL ESTUDIO

1. ESTUDIO EN LA MUESTRA TOTAL

1.1. Características generales de la muestra

Las características generales de la muestra finalmente empleada para el estudio se reflejan en la Tabla XII.

En general, las variables estudiadas guardan valores de normalidad y, por tanto, son comparables entre grupos, tanto caso-control, como en el estudio de evolución del paciente en la UCI. No existen diferencias significativas en la edad y el IMC entre el grupo control y el grupo de paciente crítico. Por otro lado, dentro de los parámetros clínicos, observamos diferencias estadísticamente significativas en los niveles de albúmina, prealbúmina, ferritina, transferrina, colesterol total, colesterol HDL y colesterol LDL.

PARÁMETRO	CONTROLES	CRÍTICOS		VALOR DE REFERENCIA
		Punto 0	Punto 7	
Muestra (N)	Hombres: 43 Mujeres: 58	Hombres: 44 Mujeres: 31	49	---
Edad (años)	54 ± 14	61.3 ± 11.03	58 ± 10	---
IMC	24.8 ± 3.4	27.2±8	NR	18 – 24
APACHE	---	17.1 ± 6.53	9.1 ± 3.6**	---
SOFA	---	8.31 ± 3.52	5.8 ± 3	---
Albúmina (g/dL)	4.55 ± 22.6*	2.74 ± 0.59	2.70 ± 0.75	3.5 – 5
Prealbúmina (mg/dL)	26.8 ± 9.59 *	12.7 ± 6.8	17.3 ± 10.7	19.5 – 35.8
Hierro (µg/dL)	83.3 ± 30.1 *	34.5 ± 35.0	41.1 ± 30.9	60-180
Ferritina (ng/dL)	146.9 ± 63.5*	697.9 ± 972.1	529.3 ± 450.2	20 – 250
Transferrina (mg/dL)	249.8 ± 22.1*	141.5 ± 59.4	148.1 ± 51.3	170 - 370
Colesterol Total (mg/dL)	206.2 ± 42*	108.2 ± 38.5	136.5 ± 45.9 **	110 - 200
Colesterol HDL(mg/dL)	47.2 ± 12.1*	24.5 ± 17.9	20.7 ± 10.4	40 – 60
Colesterol LDL(mg/dL)	125.6 ± 33.7*	41.9 ± 28.7	69.1 ± 44.6 **	70 – 150
Tríacilglicéridos (TAG) (mg/dL)	141.6 ± 59.9	198.4 ± 148.2	196.5 ± 100.6	50 - 200

Tabla XII. Características generales de la muestra;*Críticos vs Control p < 0.05 ;**Críticos-0 con Críticos-7, p<0.05
NR= No realizado por causas intrínsecas al pacien

Respecto a la evolución del paciente crítico durante los 7 días de estancia en UCI, también observamos diferencias significativas en el valor de SOFA y APACHE, y entre los niveles de colesterol total y colesterol LDL obtenidos en el día 0 respecto a los obtenidos el día final de estudio.

1.2. Ingesta de energía, nutrientes y cobre

Nuestros resultados de ingesta de nutrientes y energía se describen en la Tabla XIII, tanto en la población control como en la población de pacientes críticos.

INGESTA/ APOORTE	CONTROLES			CRÍTICOS			
	M ± SD	RDA	% RDA	M ± SD	RDA	% RDA	%RDA TOTAL
Energía (Kcal/día)	♂= 1913 ± 564.0 ♀= 1684 ± 448.6 Total=1781± 608.8	♂= 2350 ♀= 1982	♂= 85.0 ♀= 85.0 Total= 82.2	♂=1470 ± 775.5 ♀=1096 ± 500.0 Total=1283 ± 668.9*	♂=1820 ♀=1680	♂=80.7 ♀=65.2 Total=73.3	
Proteínas (g/día)	♂=77.3 ± 30.7 ♀= 65.2 ± 21.3 Total= 69.4 ± 25.9	♂= 56 ♀= 47	♂= 138.0 ♀= 138.6 Total=134.5	♂=42.0 ± 39.3 ♀=39.1 ± 14.6 Total =40.6 ± 29.0	♂= 91 ♀= 84	♂=46.2 ♀=46.6 Total=46.6	
Aa (g/día)	---	---	---	♂=25.0 ± 16.3 ♀=35.5 ± 4.56 Total= 26.6 ± 15.4	♂=91 ♀= 84	♂=27.5 ♀=42.3 Total=30.4	♂=100.6 ♀=189.2 Total=112.9
Nitrógeno (g/día)	---	---	---	♂=24.5 ± 63.2 ♀=46.1 ± 70.9 Total= 31.4 ± 64.1	♂= 91 ♀= 84	♂=26.9 ♀=54.9 Total=35.9	
Lípidos (g/día)	♂= 97.0 ± 28.8 ♀= 79.1 ± 29.9 Total= 84.3 ± 38.6	♂= 50 - 75 ♀= 42 - 63	♂= 155.1 ♀= 150.7 Total=146.6	♂=61.6 ± 30.3 ♀=43.3± 17.0 Total= 52.4 ± 15.7*	♂= 50 ♀= 47	♂=123 ♀=92.0 Total=92.5	
HC (g/día)	♂= 221.4 ± 63.1 ♀= 190.9 ± 52.9 Total= 200.6 ± 65.6	♂= 309 - 365 ♀= 261 - 309	♂= 65.6 ♀= 67.0 Total= 64.5	♂=65.6 ± 41.0 ♀=77.3± 50.7 Total=87.9 ± 72.8	♂= 250 ♀= 231	♂=26.2 ♀=33.4 Total=30.8	♂= 77.0 ♀= 68.1 Total= 67.2
Glucosa (g/día)	---	---	---	♂=126.8 ± 117 ♀=80.1 ± 70.2ju Total=104.4 ± 98.2	♂= 250 ♀= 231	♂=50.7 ♀=34.7 Total=36.4	

Tabla XIII. Aporte de energía y macronutrientes en sujetos controles y pacientes críticos.

Al realizar el test de comparación de medias, se observan valores significativamente superiores en los niveles de energía y lípidos en los sujetos controles con respecto a los pacientes críticos. Igualmente, los sujetos controles muestran mayor adecuación de ingesta que los sujetos críticos, en los que se observa un aporte insuficiente de energía y carbohidratos. Es de mencionar que, en el

aporte proteico se ha incluido el de proteínas, aminoácidos y nitrógeno, y en el glucídico, el de hidratos de carbono y glucosa.

	CONTOLES		CRÍTICOS	
	M ± SD	% sujetos < 2/3 RDA	M ± SD	% sujetos < 2/3 RDA
Total (µg/día)	1229± 1736	52.6	937.5 ± 948.3	46.9
Hombres (µg/día)	1662 ± 2453	46.2	916.1 ± 725.5	41.2
Mujeres (µg/día)	928 ± 875*	57.1	699.4± 734.7*	53.3

Tabla XIV. Aporte de cobre (M ± SD) y sujetos (%) con aporte insuficiente de cobre.

* Hombres vs Mujeres p<0.05

En la Tabla XIV se muestran los valores de aporte de cobre tanto en la población control como en la población de pacientes críticos. Se observa que el 52.2% de la población control presenta una ingesta insuficiente en este mineral (menor a 2/3 de la RDA, 1100 µg/día).

Al hacer el estudio comparativo por sexo, se observan diferencias estadísticamente significativas (p<0.05) entre hombres y mujeres tanto en el grupo control como en la población crítica, presentado las mujeres valores inferiores.

En cuanto al aporte de minerales antioxidantes, se observa una asociación significativa entre el aporte de cobre y el aporte de otros minerales en paciente crítico como cinc, hierro, magnesio, manganeso y selenio, según aparece en la Tabla XV.

	Zn (mg/día)	Fe (µg/día)	Mg(mg/día)	Se (µg/día)	Mn (mg/día)
Cu (µg/día)	r=0.957 p<0.001	r=989 p<0.001	r=0.716 p<0.001	r =972 p<0.001	r=0.973 p<0.001

Tabla XV. Correlación entre el aporte de Cu y la ingesta de otros minerales antioxidantes.

1.3. Valores de cobre en plasma y eritrocito

Nuestros resultados referentes a los niveles de cobre en plasma y eritrocito, tanto en paciente crítico como en los sujetos control, tanto al inicio como al final del estudio vienen reflejados en la Tabla XVI, haciendo referencia también a los biomarcadores del estatus antioxidante SOD y PAO.

1.4. Estudio comparativo control-crítico

Podemos observar valores significativamente inferiores ($p < 0.05$) de Cu plasmático y eritrocitario en paciente crítico respecto a los del grupo control. Con respecto al estatus antioxidante, observamos igualmente valores significativamente menores ($p < 0.05$) en la actividad de la enzima SOD y niveles de PAO en paciente crítico respecto a la que se observa en el grupo control.

	Cu plasma (μM)		Cu eritro (μM)		SOD (USOD/mL)		PAO (nM)	
	DÍA 0	DÍA 7	DÍA 0	DÍA 7	DÍA 0	DÍA 7	DÍA 0	DÍA 7
Control (n=100)	12.8 \pm 3.40	11.2 \pm 3.60	6.70 \pm 3.30	7.10 \pm 2.80	1.53 \pm 0.30	1.65 \pm 0.32	830.8 \pm 336.7	843.1 \pm 320.4
Pac.Crítico (n=75)	3.83 \pm 1.54**	3.83 \pm 1.46**	3.89 \pm 1.59 ^o	3.49 \pm 1.41*	1.35 \pm 0.62 ^o	1.15 \pm 0.40	597.1 \pm 224.1 ^o	530.5 \pm 207.6*

Tabla XVI. Resultados de Cu, SOD y PAO en sujetos control y paciente crítico. Control vs Paciente Crítico día 7 * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$
Paciente Crítico Día 0 vs Día 7 ^o $p < 0.001$

1.5. Estudio de individuos deficientes en Cu

En la tabla XVII se muestra el porcentaje de individuos deficientes en Cu, tanto a nivel plasmático como eritrocitario.

Los individuos controles deficientes en Cu encontrados en nuestro estudio son el 10.8% a nivel plasmático y el 15.4% a nivel eritrocitario.

Estableciendo como valores normales de cobre en plasma 45-157 $\mu\text{g/dL}$, al analizar el porcentaje de individuos críticos deficientes en cobre, se observa que al inicio de la estancia en UCI, el 11.1% de los pacientes es deficiente en cobre, incrementando al séptimo día de estancia al 17.3%.

Al estudiar el cobre intraeritrocitario y estableciendo los niveles de referencia en 0,0030-0.0110 mg/L, encontramos que el 32.3% al inicio, y el 35.4% al final, de los pacientes presenta deficiencia de cobre.

1.6. Evolución en la UCI

Al aplicar el test de la T de student para comparación de medias, se observan diferencias significativas en los niveles de cobre en eritrocito al inicio respecto al final de la estancia en UCI en el paciente crítico ($p < 0.001$).

Así mismo, al estudiar los biomarcadores de estatus antioxidante, se observan diferencias significativamente menores al final frente al inicio de la estancia en UCI, tanto en la actividad de la enzima SOD como en los niveles de PAO ($p < 0.001$, en ambos casos).

	Cu plasma (% individuos)		Cu eritrocito (% individuos)	
	DÍA 0	DÍA 7	DÍA 0	DÍA 7
Controles (n=100)	10.8	9.5	15.4	14.3
Pac. Crítico (n=75)	11.1	17.3	32.3	35.4

Tabla XVII. Porcentaje de individuos deficientes en cobre plasmático y eritrocitario.

1.7. Estudio de correlación entre parámetros en Críticos

Al realizar el análisis de correlación bivalente de Pearson (Tabla XVIII) encontramos correlaciones significativas negativas entre los niveles de cobre plasmático con el SOFA ($r = -0.380$, $p = 0.014$), y entre el cobre eritrocitario y los valores en la escala APACHE ($r = -0.328$, $p = 0.037$) y el SOFA ($r = -0.323$, $p = 0.017$).

	SOFA	APACHE	PAO	SOD	Fe	Vit B12	Ác. Fólico	Zn eritro 0
Cu plasma 0	-	-	$r = 0.504$ $p = 0.001$	-	-	-	-	-
Cu eritro 0	$r = -0.380$ $p = 0.014$	-	-	-	-	-	-	$r = -0.354$ $p = 0.001$
Cu plasma 7	-	-	-	$r = 0.341$ $p = 0.005$	-	$r = -0.417$ $p = 0.016$	$r = -0.352$ $p = 0.045$	-
Cu eritro7	$r = -0.323$ $p = 0.017$	$r = -0.328$ $p = 0.037$	-	-	$r = -0.287$ $p = 0.034$	$r = -0.320$ $p = 0.041$	-	-

Tabla XVIII. Correlaciones entre los niveles bioquímicos de Cu y otros parámetros nutricionales.

Por otro lado, se observa una significación estadística significativa al correlacionar los niveles de PAO con los niveles plasmáticos de cobre en el paciente crítico al inicio de la estancia en UCI ($r=0.504$, $p=0.001$). Dicha correlación no existe al final de la estancia en UCI.

También observamos una asociación significativa entre los niveles de cobre en eritrocito con la actividad de la enzima antioxidante SOD ($r=0.341$, $p=0.005$) al final de la estancia.

Con respecto a los parámetros involucrados en el metabolismo del hierro, se observa asociación significativa negativa del cobre eritrocitario con el hierro ($r=-0.287$, $p=0.034$) y con la vitamina B₁₂ ($r=-0.320$, $p=0.041$). Igualmente, se observa asociación significativa negativa entre los niveles plasmáticos de cobre y los niveles de vitamina B₁₂ ($r=-0.417$, $p=0.016$), así como con los niveles de ácido fólico ($r=-0.352$, $p=0.045$).

Igualmente, se observa asociación significativa negativa entre los niveles de cobre eritrocitario y cinc eritrocitario al inicio de la estancia del paciente en la UCI ($r=-0.354$, $p=0.001$).

2. ESTUDIO EN SUBGRUPO

Como se describió en el apartado de metodología se realizó un estudio de daño en DNA en un subgrupo homogéneo constituido por 12 pacientes elegidos aleatoriamente, mediante el método COMET para evaluar la posible influencia del estrés oxidativo sobre la alteración del material genético.

2.1. Resultados de *comet* y estrés oxidativo

En la siguiente tabla (Tabla XIX) se representan los valores medios y la desviación estándar (SD) de los parámetros *Tail Moment*, cobre en eritrocito y PAO, tanto al inicio de la estancia en UCI del paciente crítico, como al final (7 días) de la misma. Al hacer el análisis comparativo de medias mediante el test de ANOVA de un factor, no se observaron diferencias significativas en dichos parámetros al evaluar la evolución del paciente durante su estancia.

	DÍA 0	DÍA 7
<i>Tail Moment</i>	10.2 ± 5.11	8.65 ± 0.31
Cu eritrocito (μM)	3.00 ± 2.00	4.00 ± 2.00
PAO (nM)	2076 ± 1212.7	2443 ± 1027.7

Tabla XIX. Subgrupo pacientes críticos día 0 vs día 7.

Al realizar el estudio de asociaciones, el análisis bivariante de Pearson mostró altas significaciones negativas al asociar el tail moment tanto con el cobre eritrocitario ($r=-0.839$, $p=0.001$), como con el PAO ($r=-0.884$, $p<0.001$). Así mismo, también se observaron correlaciones significativas entre cobre eritrocitario y PAO ($r=0.857$, $p<0.01$).

Como se observa en los resultados, existe una asociación altamente significativa negativa entre el tamaño de la cola y el contenido de cobre en eritrocito ($p<0.001$; $r=-0.837$). Así mismo, también observamos una asociación altamente significativa negativa entre el tamaño de la cola y el PAO ($p<0,001$; $r=-0,884$). Por otro lado, existe una asociación altamente significativa positiva entre el contenido de cobre eritrocitario y el PAO ($p<0.001$; $r=0.857$).

3. RESULTADOS DE QD

3.1. Síntesis y caracterización de los CdTe QD-Lcys

En la Figura 19 se muestran los espectros de absorción y fluorescencia de CdTeQD-Lcys en medio acuoso tamponado con MOPS (pH 7.4). Debe destacarse la presencia de un máximo de absorción hacia 497 nm. Por otra parte, la emisión se caracteriza por una estrecha banda de fluorescencia con un máximo a 530 nm.

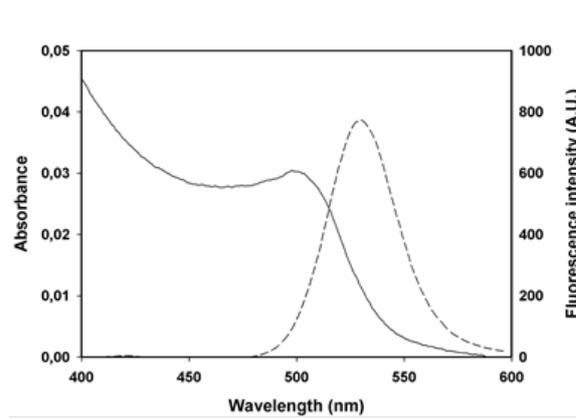


Figura 19. Espectros de absorción y emisión de disoluciones tamponadas (MOPS, pH 7.4) de CdTeQD-Lcys

De acuerdo con el procedimiento detallado en el apartado de “Sujetos y Metodología”, el proceso de síntesis se efectúa empleando una proporción de los precursores Cd^{2+} :L-cisteína: Te^{2-} 1:2:0.5; la temperatura de la reacción 108°C y el tiempo de reacción 25 minutos. La muestra obtenida se ha analizado por HRTEM obteniéndose una imagen de los QD cuyo tamaño promedio está comprendido entre 2 y 4 nm (Figura 20a). Un análisis de los componentes de la disolución se presenta en la Figura 20b.

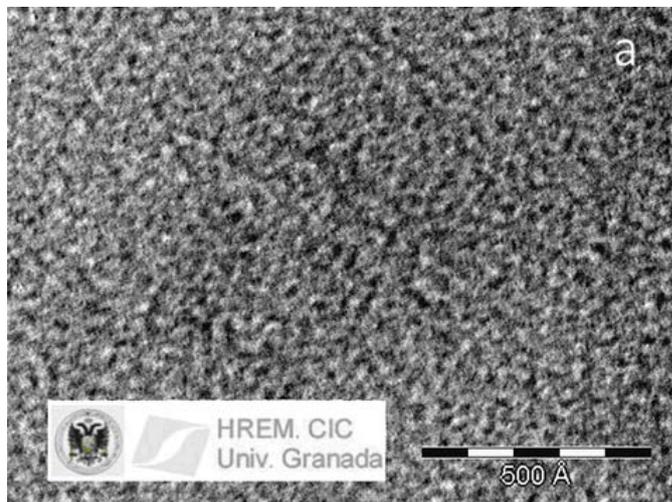


Figura 20a. Imagen obtenida en el análisis de HRTEM de la disolución acuosa de CdTeQD-Lcys.

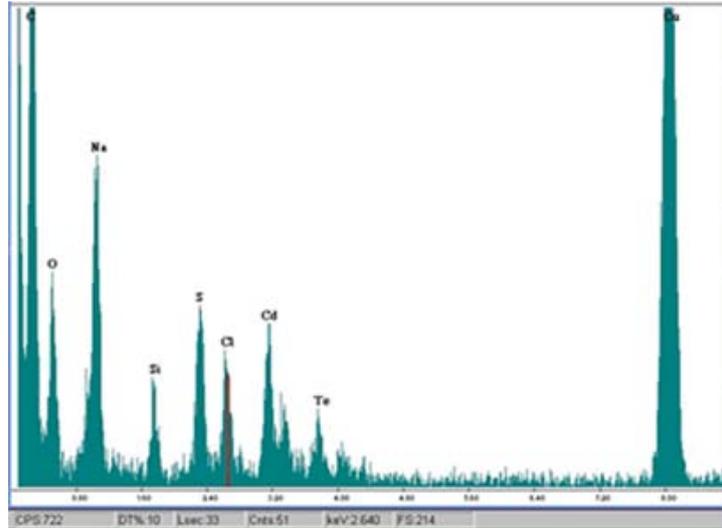


Figura 20b. Análisis de los elementos componentes de la disolución acuosa de CdTeQD-Lcys analizada por HRTEM.

3.2. Fluorescencia de CdTeQD-Lcys

Todas las muestras de CdTeQD-Lcys fueron guardadas en oscuridad en la cámara fría (6°C). Tal como se observa en la Figura 21, durante los primeros días después de la síntesis, disoluciones de CdTeQD-Lcys en medio tamponado por MOPS (pH 7.4) muestran significativos incrementos en la intensidad de fluorescencia. Esta tendencia continúa durante 10-15 días, después de este periodo de tiempo la fluorescencia se estabiliza en valores de intensidad alrededor de un valor promedio con una variación de $\pm 15\%$. Todas las muestras utilizadas 15 días después de la síntesis presentaban una buena coincidencia en el perfil del espectro de emisión así como en la posición del máximo. Una vez transcurrido >50 días se observa un desplazamiento hacia el azul de aproximadamente 2 nm.

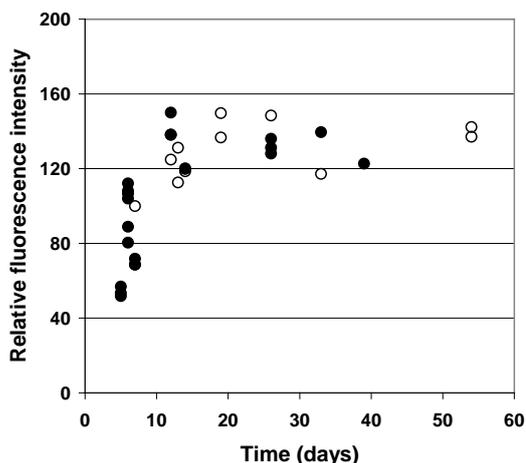


Figura 21. Efecto del tiempo transcurrido tras la síntesis sobre la fluorescencia medida en el máximo de emisión para disoluciones tamponadas de CdTeQD-Lcys en MOPS (pH 7.4) preparadas a partir de dos muestras diferentes (círculos rellenos y vacíos) guardadas a 6 °C.

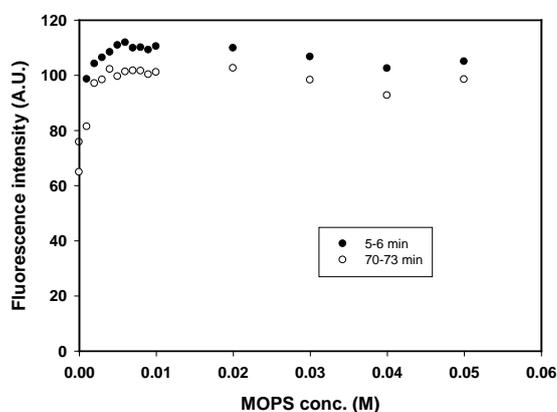


Figura 22. Variación de la intensidad de fluorescencia medida en el máximo de la banda de emisión con disoluciones de CdTeQD-Lcys en presencia de diferentes concentraciones de MOPS (pH 7.4). Las medidas se repiten con las mismas disoluciones en distintos intervalos de tiempos transcurridos después de la preparación de las disoluciones (círculos llenos): 5-6 min, (círculos vacíos): 70-73 min.

Se ha comprobado que un aumento de la concentración de MOPS va acompañado de un aumento de la respuesta inflamatoria de CdTeQD-Lcys. Así ocurre cuando se varía la concentración de MOPS 1 mM y 50 mM observándose un aumento >20% de la fluorescencia de CdTeQD-Lcys por comparación con la disolución no tamponada (Figura 22). Entre 6 mM y 20 mM se obtienen medidas bastante estables de la fluorescencia de CdTeQD-Lcys que disminuyen cuando la concentración del tampón se incrementa por encima de 20 mM. Se observa igualmente que la respuesta a la presencia del tampón se repite pasada más de una hora de la preparación de las muestras.

De otro lado, la presencia de KCl provoca un descenso de la fluorescencia de CdTeQD-Lcys que es apreciable a concentraciones relativamente bajas de la sal (Figura 23).

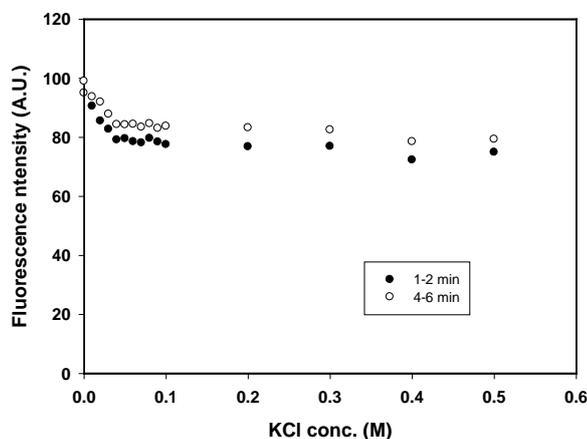


Figura 23. Variación de la intensidad de fluorescencia medida en el máximo de la banda de emisión con disoluciones de CdTeQD-Lcys (MOPS 6 mM pH 7.4) en presencia de diferentes concentraciones de KCl. Las medidas se repiten con las mismas disoluciones en intervalos de tiempos distintos transcurridos después de la preparación de las disoluciones (círculos llenos): 1-2 min, (círculos vacíos): 4-6 min

La influencia de la temperatura en la fluorescencia de CdTeQD-Lcys en MOPS pH 7.4, se muestra en la Figura 24. Las muestras se toman de la cámara fría (6°C) y se diluyen en el tampón tal como se indica en el apartado de Metodología. Posteriormente se distribuyen 2.9 mL de esta dilución en los diferentes pocillos de placas previamente calibradas con disolución de sulfato de quinina 0.015 M, y a los que se agrega 0.1 mL de agua bidestilada. Tras la preparación se toma la temperatura de las disoluciones al inicio y al final de la serie de medidas en la placa. Así se obtienen cuatro grupos de medidas a 530 nm en los que se comprueba que la temperatura cambia entre los siguientes intervalos i) 13.3 °C - 23.6 °C; ii) 23.6 °C - 25.8 °C; iii) 25.8 °C - 26.5 °C; and iv) 26.5 °C - 26.8 °C siendo 12 minutos el tiempo empleado en efectuar las medidas en cada grupo. El cambio inicial de temperatura (10°C/12 min) origina un pronunciado descenso de la fluorescencia. Con posterioridad, un cambio de temperatura más suave (3°C/42 min) da lugar a un ligero aumento de la fluorescencia.

En otro experimento las muestras tomadas de la cámara fría (6°C), se diluyen en el tampón y se distribuyen en los pocillos a la temperatura ambiente y se deja alcanzar los 21°C (15 minutos), a partir de ese momento se realizan las medidas a distintos tiempos. En la Figura 25 se muestran los valores medios y la desviación estándar en los tres grupos de medidas fluorescencia a 530 nm realizados con la misma muestra en un tiempo total de 28 minutos. El promedio de la intensidad relativa de fluorescencia resulta ser 792 con una desviación estándar de $\pm 2.4\%$. El máximo de la emisión (530 nm) varía sólo un 0.1% en las medidas efectuadas. También en este caso aunque de forma suave, la tendencia observada en el tiempo es un aumento de fluorescencia que parece descartar el deterioro de los QD por pérdidas de ligandos durante el desarrollo del experimento.

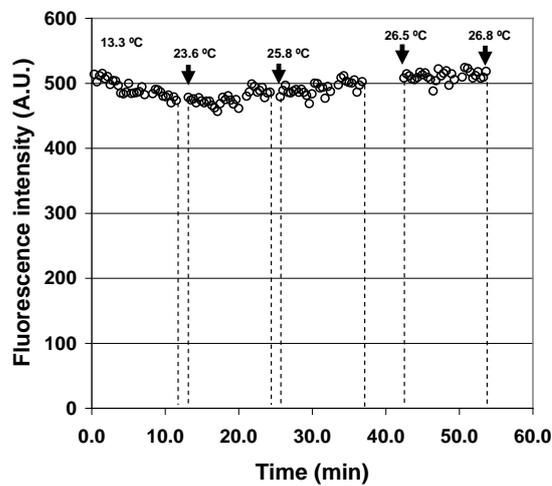
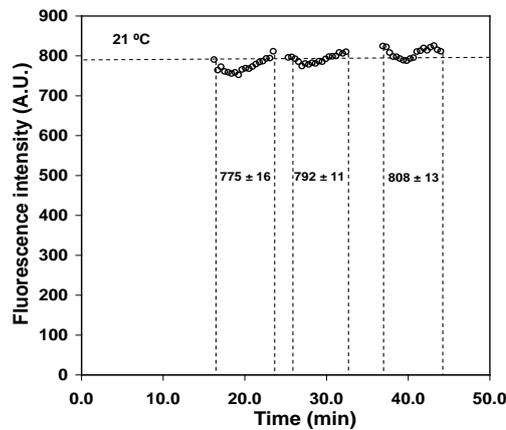


Figura 24. Intensidades de fluorescencia medidas a 530 nm con disoluciones de CdTeQD-Lcys (MOPS pH 7.4) en función de la temperatura. Las mismas disoluciones son medidas sucesivamente en cuatro periodos de tiempo.



Gráfica 25. Intensidades de fluorescencia medidas a 530 nm con disoluciones de CdTeQD-Lcys (MOPS pH 7.4) en función del tiempo transcurrido desde la preparación de la disolución. Las mismas disoluciones son medidas sucesivamente en tres periodos de tiempo.

3.3. Desactivación de la luminiscencia de QD por iones Cu(II)

La fluorescencia de CdTeQD-Lcys disminuye al aumentar la concentración de Cu(II) en el medio como se puede observar en los cambios espectrales mostrados en la Figura 26. En la citada Figura se observa cómo al aumentar la concentración de Cu(II) se produce un descenso de la fluorescencia sin que varíe el perfil del espectro de emisión. En la Figura 27 se muestra la comprobación de que la desactivación de la fluorescencia de CdTeQD-Lcys se ajusta a la ecuación de Stern-Volmer.

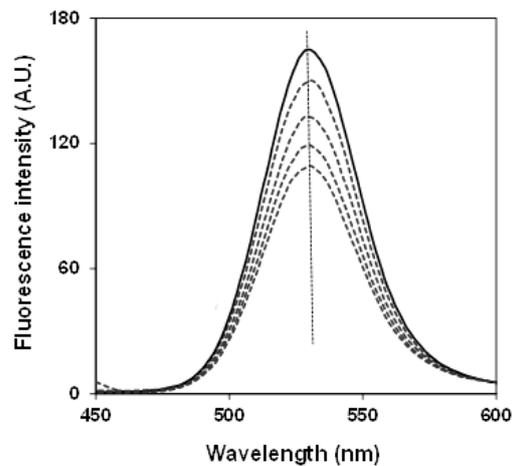


Figura 26. Efecto de concentraciones crecientes de cobre en la emisión de CdTeQD-Lcys en disolución acuosa tamponada (MOPS pH 7.4)

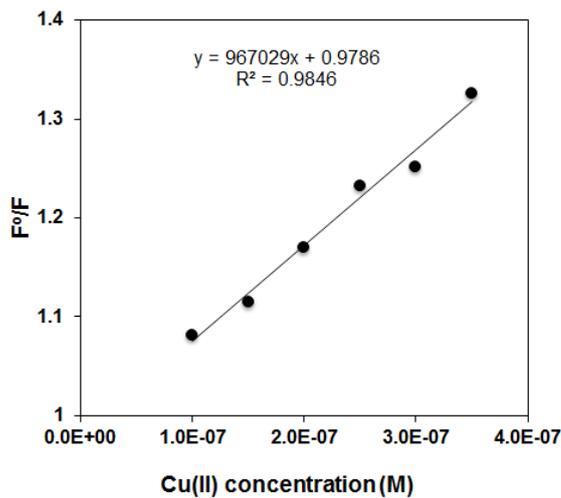


Figura 27. Ajuste de los datos experimentales de la desactivación de la fluorescencia de CdTeQD-Lcys por Cu(II) según la ecuación de Stern-Volmer. Los resultados del ajuste aparecen insertos en la gráfica.

3.4. Determinación fluorimétrica de Cu(II) en plasma y eritrocitos utilizando CdTeQD-Lcys

Se ha utilizado CdTeQD-Lcys para la determinación fluorimétrica de Cu(II) en muestras biológicas de individuos pertenecientes a los grupos estudiados en el análisis del estrés oxidativo asociado a deficiencia de cobre para pacientes de UCI. Se han utilizado un número de muestras representativo de los grupos control y de pacientes críticos a efectos de comparación.

Las muestras biológicas analizadas en este apartado se sometieron al pretratamiento descrito en el apartado metodológico antes de su uso en la determinación de Cu(II). Las determinaciones de Cu(II) en muestras biológicas se realizaron en la misma placa y de forma simultánea con las medidas necesarias para obtener K_{SV} , utilizando para ello muestras de CdTeQD-Lcys a concentración constante en tampón MOPS pH 7.4 y en presencia de concentraciones de Cu(II) de concentraciones comprendidas entre 0.1 μ M y 0.4 μ M. Los resultados del análisis se muestran en la Figura 28 y aparecen resumidos en la Tabla XIX.

Muestra	Fluorescencia				
	E1	E2	E3	E1C	E2C
Cu (II) eritrocito (μ M)	7.9 \pm 2.4	7.6 \pm 1.4	8.1 \pm 0.6	2.2 \pm 1.4	3.1 \pm 1.1
	FAAS				
	8.4 \pm 0.3	9.2 \pm 1.0	10.4 \pm 0.7	3.1 \pm 1.5	3.3 \pm 1.0
	ICP-MS				
	5.2 \pm 0.8	5.5 \pm 1.3	6.3 \pm 1.0	2.6 \pm 1.2	3.5 \pm 0.9

Tabla XIX. Concentraciones de Cu(II) en eritrocitos procedentes de muestras extraídas a individuos sanos (E1, E2, E3) and pacientes críticos (E1C, E2C) en el primer día de estancia en la UCI.

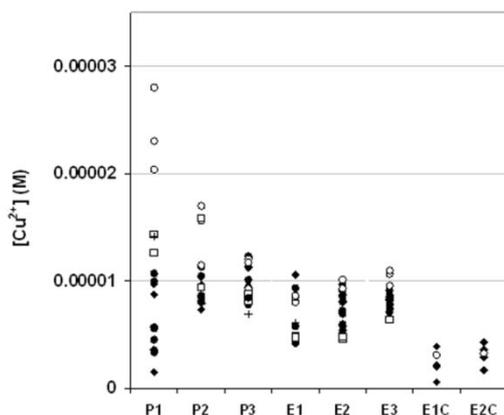


Figura 28. Resultados de la determinación de Cu(II) en plasma (P1,P2,P3) y eritrocitos (E1,E2,E3) de individuos sanos y de enfermos de UCI (E1C,E2C) en su primer día de hospitalización. (Símbolos rellenos) datos de fluorescencia de CdTe-QD en microplacas; (círculos no rellenos) datos de FAAS; (cuadrados no rellenos) datos de ICP-MS; (cruces) datos de fluorescencia de CdTE-QD en cubetas convencionales.

Discusión de los Resultados

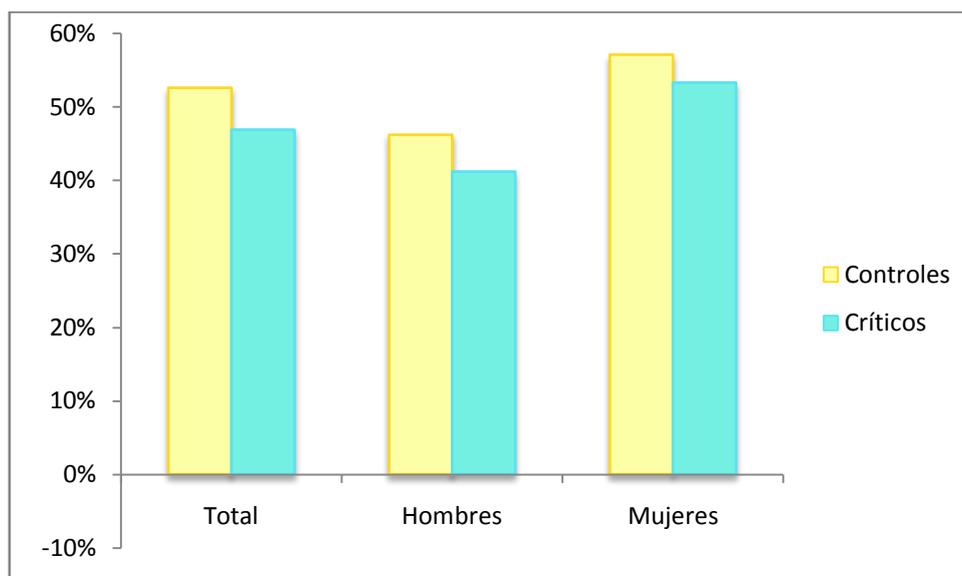
DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

1. ESTUDIO DE VALORACIÓN DE ESTADO NUTRICIONAL EN COBRE Y ESTRÉS OXIDATIVO

1.1. Ingesta de cobre

Como se comentó en el apartado de resultados, un 52.2% de la población control presenta ingesta deficiente en Cu.

Al realizar la evaluación del aporte de cobre en paciente crítico, se han tenido en cuenta los mismos requerimientos que en una población adulta sana y se han recogido tanto los niveles aportados por el soporte enteral, como por el parenteral. En la actualidad las recomendaciones de cobre para paciente crítico sólo vienen referidas a la nutrición parenteral y se establecen entre unos límites muy amplios de 300-1300 $\mu\text{g}/\text{día}$, datos mostrados en la Tabla XIV. Hay que tener en cuenta que el cobre por vía enteral se absorbe de en un 55-75%. Teniendo en cuenta que los requerimientos de cobre por vía oral son de 1.1 mg/día en población sana adulta, si tenemos en cuenta una absorción del 55-75%, pasarían a sangre 0.6-0.8 mg/día. Según esto, se observa que existe un aporte por debajo de estos niveles en un 46.9% de la población crítica (Gráfica 1).



Gráfica 1. Porcentaje de sujetos y pacientes con ingesta de $\text{Cu} < 2/3\text{RDA}$.

Tanto en la población crítica como control, las mujeres presentan valores de ingesta significativamente más bajos que los hombres ($p < 0.05$).

Turnlund et al (1994) indicaron una reducción en las concentraciones de cobre en hombres con una ingesta a partir de productos bajos en cobre (0.4 mg/día) durante 42 días. Por otro lado, otros estudios (Milne et al, 1985; Solomons et al, 1986) indicaron el mantenimiento de las concentraciones plasmáticas de cobre en un rango de 6.7-8.6% en personas sanas y personas que consumían dietas con un contenido adecuado de cobre durante más de 12 meses. Sin embargo, Milne et al en 1990, demostró que las concentraciones plasmáticas de cobre eran más variables ($\pm 20\%$) cuando los sujetos estaban alimentados con una dieta baja en cobre que durante períodos en los que la ingesta de cobre era adecuada.

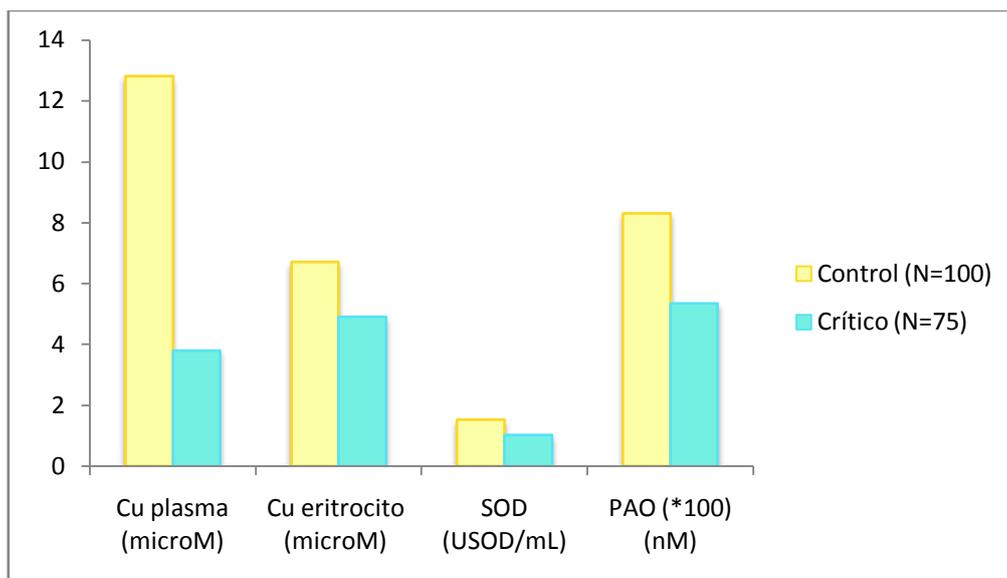
Diversos autores recomiendan la suplementación de cobre en NP para evitar los efectos adversos de su deficiencia. Diversos autores recomiendan la suplementación de cobre en nutrición parenteral para evitar los efectos adversos de su deficiencia. Dicha recomendación está basada en la valoración de la ingesta oral, la absorción gastrointestinal y las condiciones fisiológicas generales del individuo, sugiriendo el rango de suplementación de 0.5-1-5 mg/día para adultos (Expert Panel for Nutrition Advisory Group, 1979). Skine et al (1981), indicaron una cantidad media óptima de cobre en soluciones de NP de 0.3 mg/día.

Shankar et al (2010) recomiendan una suplementación de un 50% y un 200% adicional en el porcentaje de RDA de cobre en cirugía gástrica y bariátrica, respectivamente (0.9 mg/día). Estas recomendaciones de incremento en la ingesta de cobre después de una cirugía son confirmadas por otros autores (Prodan et al, 2009; Juhasz-Pocsine, 2007).

1.2. Estudio comparativo sujetos control y pacientecrítico

Como se comentó en el apartado de resultados existen diferencias estadísticamente significativas tanto en los niveles plasmáticos como eritrocitarios de Cu en paciente crítico, respecto a los niveles del grupo control ($p < 0.01$).

En cuanto al estatus antioxidante, los valores obtenidos en el estudio muestran que la actividad de la enzima SOD en los pacientes críticos es significativamente menor que en el grupo control. Igualmente, como se comentó anteriormente, se han observado diferencias significativas con el grupo control ($p < 0.01$) en los niveles de PAO, siendo menores en paciente crítico (Gráfica 2).



Gráfica 2. Diferencias de parámetros entre control y crítico. Control vs Paciente Crítico * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$.

En numerosos estudios (Reiser et al, 1985; Milne et al, 1990; Klevay et al, 1984; Milne y Johnson, 1993; Milne y Nielsen, 1996) se ha demostrado la sensibilidad de la Cu/Zn-SOD eritrocitaria a cambios en el estatus de cobre. Reiser et al (1985) observaron una caída significativa en la actividad de dicha enzima en sujetos que ingerían 1.03 mg/día de cobre.

Se ha demostrado que en situaciones de elevado estrés oxidativo, tiende a aumentar la actividad de la Cu/Zn-SOD, incluso durante los períodos de baja ingesta de cobre (Nielsen et al, 1990; Nielsen et al, 1993).

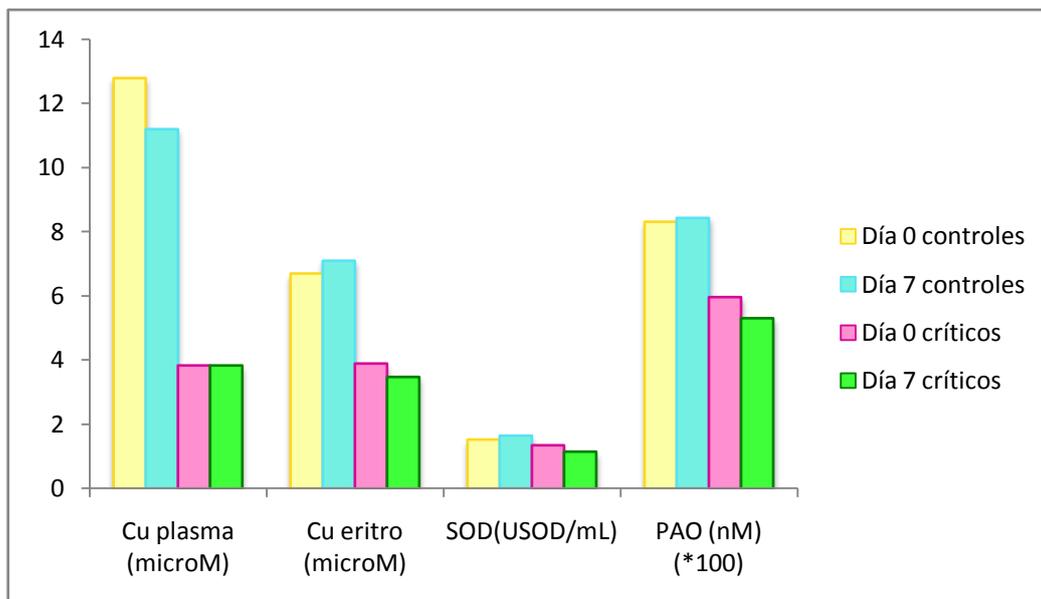
Estudios previos han confirmado que la condición crítica de los pacientes admitidos en la UCI está asociada con el empeoramiento del estrés oxidativo. La ingesta de vitaminas antioxidantes por debajo del 66% de las RDA y una alteración en los niveles endógenos de sustancias con capacidad antioxidantes, están relacionados

con imbalances redox en pacientes críticamente enfermos, recomendando la monitorización y ajuste en la ingesta de antioxidantes (Abilés et al, 2006).

Nuestro estudio demuestra que el paciente crítico presenta una menor disponibilidad de antioxidantes que puedan ejercer su función protectora frente a radicales libres. Por tanto, podemos deducir que dicha situación puede ser consecuencia de la falta de aporte de nutrientes antioxidantes en situaciones en las que las reservas endógenas se agotan, causando inflamación sistémica y alterando la morbimortalidad del paciente crítico.

1.3. Estudio de evolución del paciente crítico

Como se mostró en el apartado de resultados, se observan diferencias estadísticamente significativas en los niveles de cobre en eritrocito al inicio con respecto al final de la estancia en UCI ($p < 0.001$). Así mismo, se observan diferencias estadísticamente significativas en los niveles de actividad de la enzima SOD y los niveles de PAO al inicio y al final de la estancia en UCI ($p < 0.001$ en ambos casos) (Gráfica 3).



Gráfica 3. Evolución en los niveles plasmáticos y eritrocitarios de cobre y de marcadores de estatus antioxidante en controles y paciente crítico. Paciente Crítico Día 0 vs Día 7 °p<0.001.

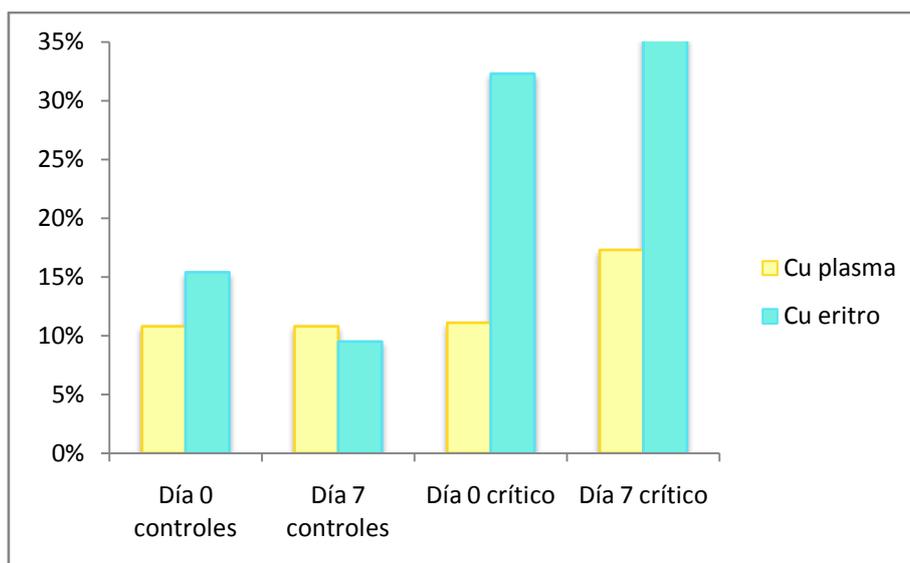
En el eritrocito, el principal reservorio de cobre es la enzima antioxidante Cu/Zn-SOD que acumula cerca del 95% del cobre total. Además, los transportadores de cobre en plasma son la albúmina y la macroglobulinas, siendo la ceruloplasmina la proteína que presenta seis puntos de unión con el Cu (II) (Sato y Gritlin, 1991) a la cual se une la mayoría del cobre en plasma.

La deficiencia de cobre induce a una disminución de la actividad de la SOD y, consiguientemente, a una alteración de los sistemas de defensa antioxidante (Bureau et al, 2003; Uriu-Adams y Keen, 2005).

En nuestros resultados hemos observado que existe una deficiencia de cobre, tanto a nivel plasmático como eritrocitario, siendo más acusado en este último compartimento, tendiendo a aumentar durante la estancia del paciente en la UCI. Por tanto, resulta lógico que los niveles de biomarcadores antioxidantes también se vean afectados y evolucionen de manera negativa durante la estancia de 7 días evaluada en este estudio.

Como se mostró en el apartado de resultados, los niveles plasmáticos de cobre en el paciente crítico disminuyen durante la estancia en UCI, observándose un incremento de un 6.2% en los sujetos deficientes al final del estudio. Haciendo referencia a los niveles de cobre en eritrocito, observamos que al final de la estancia en UCI el 35.4% de los pacientes presentan deficiencia de cobre.

Como se observa en la Gráfica 4 el porcentaje de individuos, controles y críticos, deficientes en cobre plasmático y eritrocitario varía de manera significativa a lo largo del estudio, siendo estos cambios más acusados en el caso del cobre intracelular.



Gráfica 4. Porcentaje de individuos deficientes en cobre plasmático y eritrocitario.

Menéndez et al (2005) realizaron un estudio en 11 pacientes que no recibían suplementación de micronutriente, observándose que las concentraciones plasmáticas de cobre disminuyeron durante un primer período de 12 horas, manteniéndose bajas hasta las 24 horas, aumentando después durante el resto del estudio, hasta un 30%. Las concentraciones eritrocitarias de cobre son más fiables en la evaluación del estatus de estos elementos en pacientes comprometidos nutricionalmente. Así, se manifiesta la inadecuación del cobre en plasma para evaluar el estado nutricional durante una respuesta inflamatoria aguda, apoyando el papel clave de los eritrocitos como medio para medir dicho estatus.

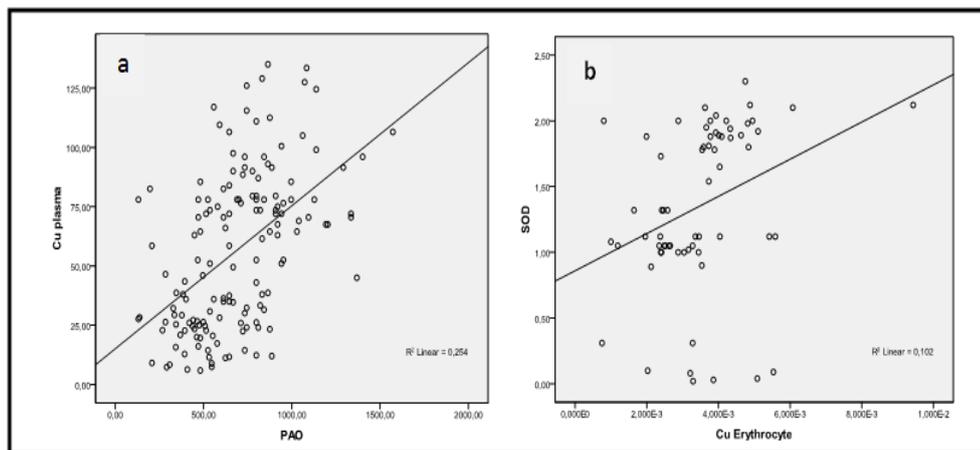
1.4. Correlaciones entre parámetros en paciente crítico

En los resultados obtenidos, observamos que existe asociación estadísticamente significativa al correlacionar los niveles de PAO con los niveles plasmáticos de cobre en la población total (controles más paciente crítico al inicio de la estancia en UCI) ($r=0.504$, $p<0.001$) (Gráfica 5a). Dicha correlación no existe en la población de críticos al final de la estancia en UCI.

La asociación entre los niveles de PAO y los niveles plasmáticos de cobre en la población total también se demuestra en otros estudios (Bureau et al, 2003; Uriu-Adams y Keen, 2005), lo que es lógico teniendo en cuenta que en los niveles de poder antioxidante total se incluye el cobre como mineral antioxidante. El hecho de que la

correlación desaparezca cuando se considera la población crítica por separado en el estudio de asociación, posiblemente es debido a que en el paciente crítico dichos niveles están alterados como consecuencia de la situación oxidativa hipercatabólica y altamente deficiente en cobre a la que está sujeta esta población.

Además, por otro lado, se observa una asociación significativa entre los niveles de cobre en eritrocito y la actividad de la enzima antioxidante SOD ($r=0.341$, $p=0.005$) al final de la estancia (Gráfica 5b). Este hecho confirma que el cobre intracelular forma parte en su mayoría de la estructura enzimática de la SOD. De ahí esa alta correlación entre ambas, tal y como lo demuestra la Gráfica 5a.



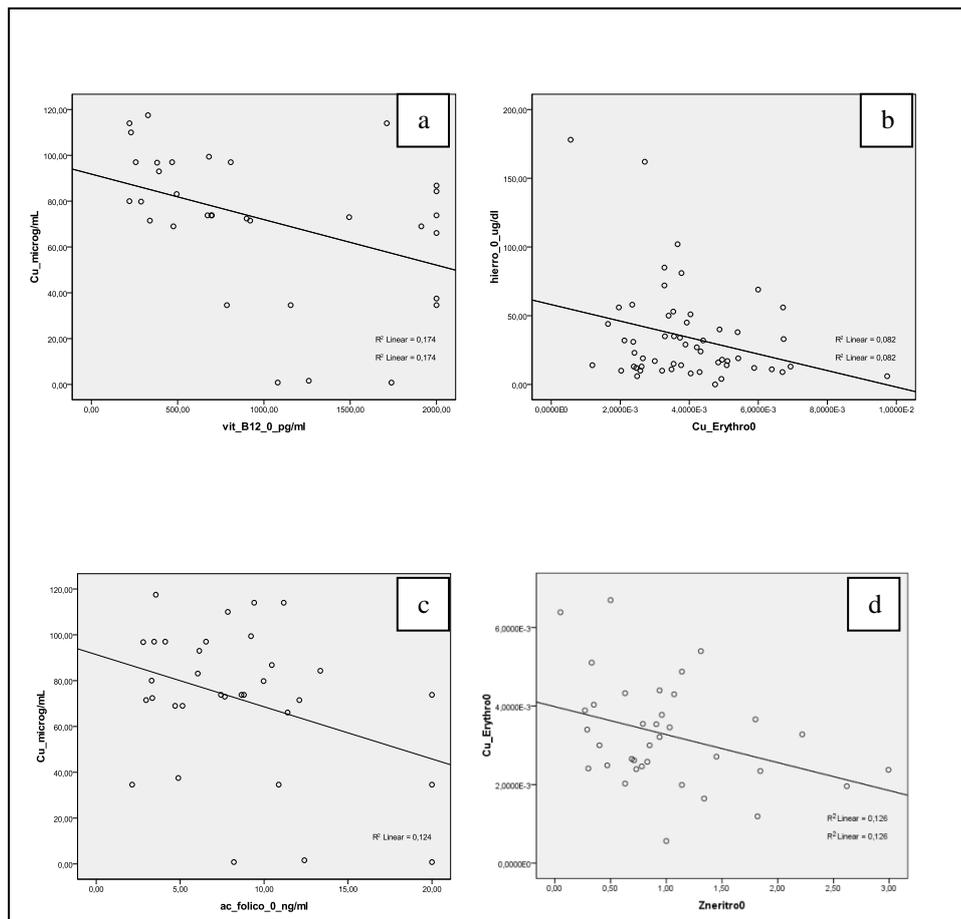
Gráfica 5. Asociación entre los niveles de Cu plasmático y los niveles de PAO en la población total (a), y niveles de Cu en eritrocito con SOD en pacientes críticos (b).

Por otro lado, encontramos correlación significativa negativa entre los niveles de cobre plasmático con el SOFA ($r=-0.380$, $p=0.014$), y entre los niveles de cobre eritrocitario y los valores en la escala APACHE ($r=-0.328$, $p=0.037$) y el SOFA ($r=-0.323$, $p=0.017$).

Diversos autores (Berger et al, 2008) indican que la intervención con antioxidantes no reduce en principio la disfunción de órganos, pero sí lo hace de manera significativa con la respuesta inflamatoria en pacientes sometidos a cirugía cardíaca y traumas, lo que puede probar sus efectos beneficiosos en condiciones de una intensa inflamación, como sucede en los pacientes críticos estudiados.

Con respecto a los parámetros involucrados en el metabolismo del hierro, se observa una asociación significativa negativa entre los niveles plasmáticos de cobre y los niveles de vitamina B₁₂ ($r=-0.417$, $p=0.016$) (Gráfica 6a). Igualmente, se observa una asociación significativa negativa entre los niveles de cobre eritrocitario y los niveles de hierro ($r=-0.287$, $p=0.034$) (Gráfica 6b), y vitamina B₁₂ ($r=-0.320$, $p=0.041$). Además, existe una asociación significativa negativa entre los niveles plasmáticos de cobre y los niveles de ácido fólico ($r=-0.352$, $p=0.045$) (Gráfica 6c).

Existen estudios que muestran los niveles deficientes de B₁₂ y fólico en población crítica a lo largo de la estancia en UCI (Abilés et al, 2008). Podríamos considerar que dicha asociación se hace negativa como consecuencia de alteraciones de estos biomarcadores nutricionales en la situación crítica.



Gráfica 6. Asociación entre los niveles de Cu y diferentes biomarcadores nutricionales: B₁₂, Fe, ácido fólico y Zn.

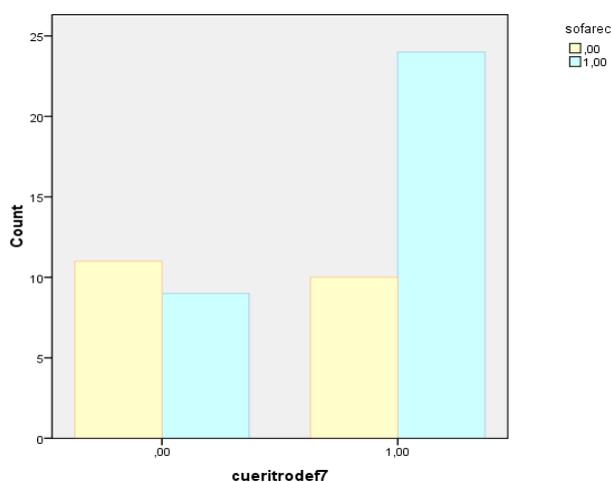
Igualmente, se observa asociación significativa negativa entre los niveles de cobre eritrocitario y cinc eritrocitario al inicio de la estancia del paciente en la UCI ($r=-0.354$, $p=0.001$) (Gráfica 6d). Este hecho queda confirmado por diferentes autores (Menéndez et al, 2005; Solomons et al, 1983; Prasad et al, 1978) dado que ambos forman parte de la Cu/Zn SOD citosólica, además de entrar en competencia en diferentes procesos metabólicos como iones divalentes.

1.5. Análisis de regresión

Al realizar el análisis estadístico de regresión, teniendo en cuenta a los sujetos críticos deficientes y no deficientes en cobre eritrocitario, se observa que los pacientes deficientes presentan 4.4 veces más riesgo de mostrar un SOFA superior a 8 ($p=0.04$) (Gráfica 7).

Estudios preios del equipo (Abilés et al, 2006) han demostrado un incremento del estrés oxidativo en pacientes críticos durante la estancia en UCI asociado a la ingesta de nutrientes antioxidantes de manera independiente a los indicadores de gravedad (sobre todo SOFA y APACHE).

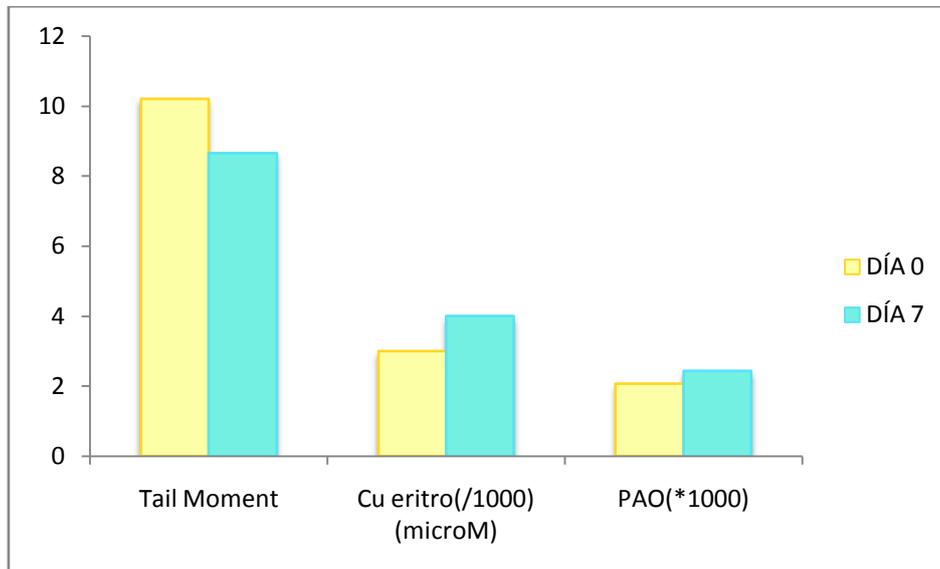
La alta correlación encontrada entre los parámetros SOFA y Cu eritrocitario confirma el posible valor pronóstico de la deficiencia de cobre como biomarcador de la evolución y morbimortalidad del paciente durante su estancia en UCI.



Gráfica 7. Análisis estadístico de regresión.

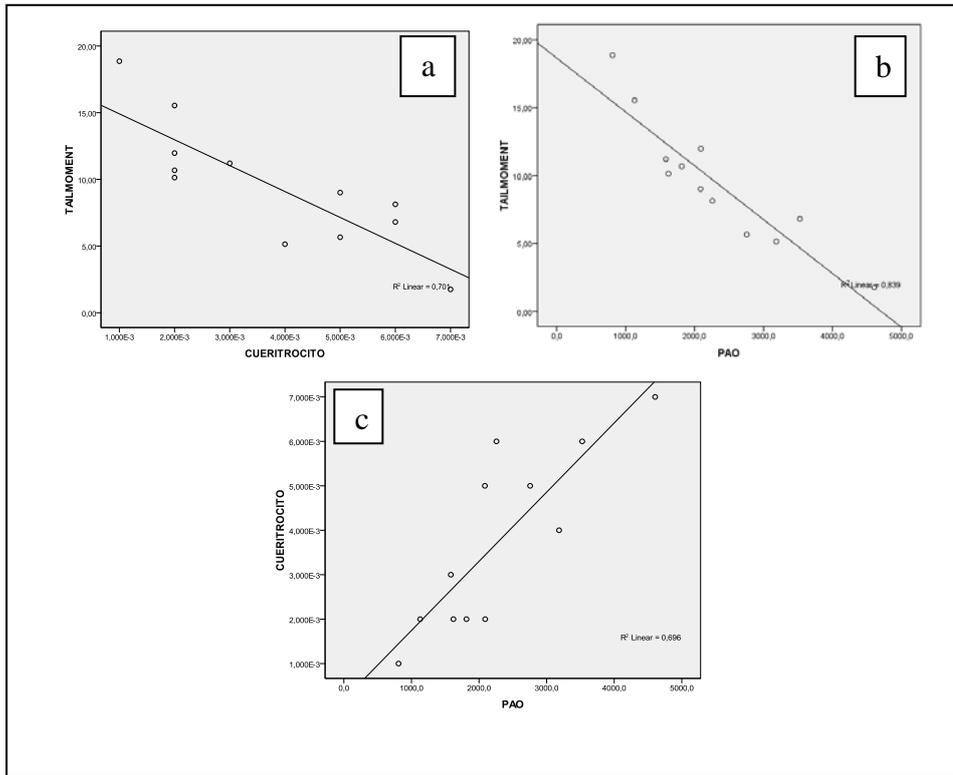
2. ESTUDIO DE DAÑO EN EL ADN

Al hacer el análisis comparativo de medias (test de ANOVA de un factor) en el subgrupo seleccionado para estudiar el daño en el ADN mediante el ensayo *Comet*, no se observaron diferencias significativas en los parámetros *Tail Moment*, cobre eritrocitario y PAO al evaluar la evolución del paciente durante su estancia en UCI (Gráfica 8).



Gráfica 8. Subgrupo pacientes críticos día 0 y 7.

Sí se pueden observar altas significaciones estadísticas negativas al asociar el parámetro *Tail Moment* tanto con los niveles de cobre eritrocitario ($r=-0.839$, $p=0.001$) (Gráfica 9a), como con los niveles de PAO ($r=-0.884$, $p<0.001$) (Gráfica 9b). Así mismo, también se observaron correlaciones significativas entre los niveles de cobre eritrocitario y los niveles de PAO ($r=0.857$, $p<0.01$) (Gráfica 9c).



Gráfica 9: Asociación entre los niveles de Cu y diferentes marcadores de daño oxidativo en el subgrupo.

Los resultados obtenidos en referencia al daño en el ADN indican que la deficiencia de cobre en el paciente crítico puede derivar en un aumento del estrés oxidativo hasta niveles que dañen la estructura del material genético, de ahí que en nuestros resultados aparezca una asociación entre el parámetro *Tail Moment* y los niveles de marcadores de estrés oxidativo, y de éstos con los niveles de cobre eritrocitario, tal y como lo confirman diversos autores (Pickart et al, 2012).

4. DETERMINACIÓN DE COBRE POR QD

3.1. Síntesis y caracterización de los CdTe QD-Lcys

La preparación de QD se atiende, en general, a dos métodos básicamente. Por un lado, una síntesis organometálica a alta temperatura (Peng y Peng, 2001) y, por otro, una síntesis en medio acuoso a baja temperatura (Gaponik et al, 2002). Este último método presenta notables ventajas entre las que cabría señalar la

simplicidad del método y la solubilidad de las nanopartículas en medio acuoso junto a una alta luminiscencia y una distribución estrecha de tamaños.

El espectro de absorción se caracteriza por la aparición de un máximo de absorción hacia 497 nm que puede considerarse como indicativo de que las nanopartículas presentan una estrecha distribución de tamaños. De otro lado, la emisión fluorescente presenta un máximo a 530 nm. El FWHM medido en el espectro de fluorescencia es de 37 nm, bastante próximo al encontrado por Ghosh et al (36 nm) en medidas de photoluminiscencia (Ghosh et al, 2009) y ligeramente superior al reportado por Yu et al (29 nm) (Yu et al, 2003).

La reducción del tamaño de los QDs provoca cambios sustanciales en sus propiedades sin cambiar la composición química (Alivisatos, 1996). Además, el tamaño de los QDs puede ser controlado por la proporción de los precursores, la temperatura y el tiempo de reacción. En el presente trabajo la proporción de precursores fue $\text{Cd}^{2+}:\text{L-cisteína}:\text{Te}^{2-}$ 1:2:0.5; la temperatura de la reacción 108°C y el tiempo de reacción 25 minutos. Según los datos aportados por Priyam et al. (Priyam et al, 2007) un tiempo de reflujo de 25 minutos a 108°C debe dar como resultado una alta concentración de CdTeQD-Lcys de un tamaño próximo a 3 nm. Los resultados encontrados en el análisis por HRTEM dan un valor en el rango comprendido entre 2-4 nm, y confirma la presencia de los metales que forman la nanopartícula así como la de NaCl como subproducto de la síntesis.

Por otro lado, se puede calcular un valor promedio para el diámetro de la nanopartícula, tomando el valor experimental del "absorption edge". Para ello se realiza previamente una transformación de las unidades de la abscisa en el espectro de absorción a unidades de energía (eV). Posteriormente se obtiene la derivada de la curva de absorción para obtener la energía correspondiente al máximo (Figura 29) resulta así un valor de 2.47 eV y, como referencia, el valor de 1.57 eV correspondiente al "absorption edge" de películas nanoestructuradas de CdTe obtenidas en presencia de $\text{O}_2 < 0.1\%$ (Arizpe-Chávez et al, 2000).

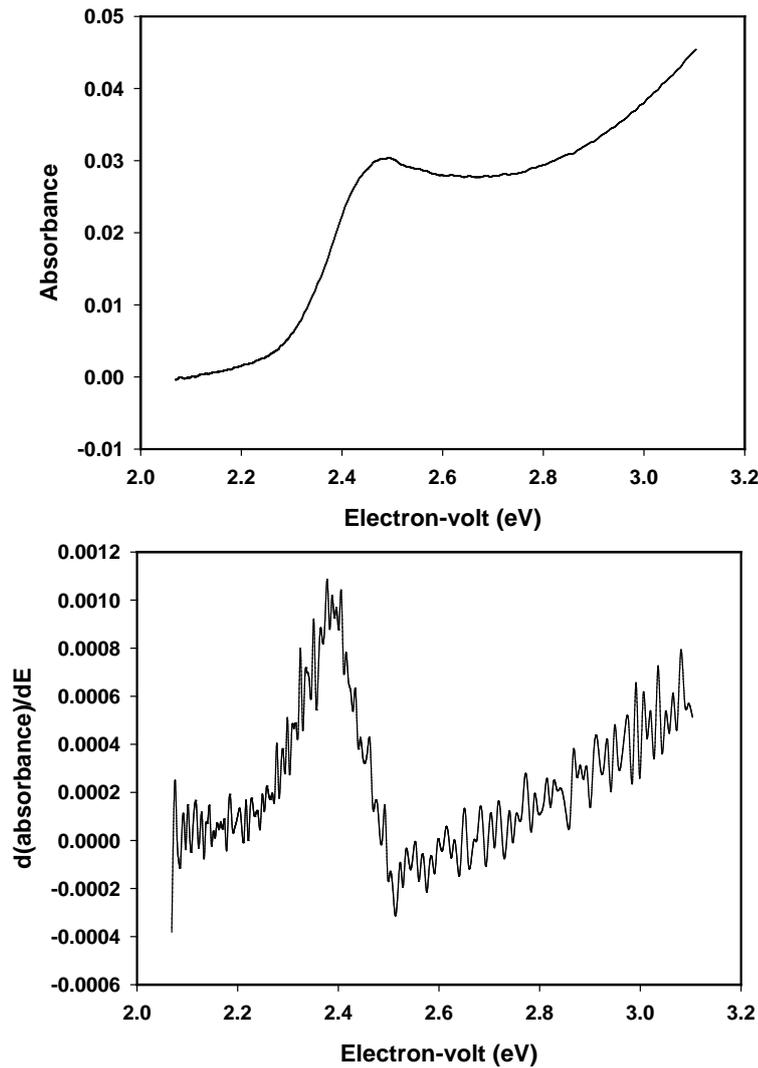


Figura 29.(Gráfica superior) Representación en función de la energía de la radiación del espectro de absorción obtenido con una disolución tamponada (MOPS, pH 7.4) de CdTeQD-Lcys. (Gráfica inferior) Espectro derivada del anterior

Así es posible determinar el “band gap shift” ($\Delta E_g = E_g(\text{nanocrystal}) - E_g(\text{referencia})$) que puede ser interpolado en la representación gráfica de la ecuación (Sapra and Sarma, 2004)

$$\Delta E_g = 5.77e^{-d/8.45} + 1.33e^{-d/43.73}$$

obteniéndose un tamaño promedio de 2.8 nm lo que coincide aceptablemente con el valor calculado en HRTEM y que es un valor claramente inferior 6.27 nm al calculado para el radio de Bohr excitónico (a_b) según la ecuación de Brus (Brus, 1986) y utilizando los datos de masas efectivas para el electrón ($0.096 m_e$); y para el hueco

($0.84 m_e$) (Berger, 1997) así como la constante dieléctrica para el CdTe (10.392) (Zanio, 1978). Estos datos confirman que las dimensiones de CdTeQD-Lcys deben provocar el confinamiento cuántico del excitón.

Se puede calcular teóricamente (Yu et al, 2003) el coeficiente de absorción molar a 497 nm de CdTeQD-Lcys a partir de la ecuación

$$\varepsilon = 10043.(D)^{2.12}$$

en la que D representa el diámetro de la nanopartícula. La estimación basada en esta ecuación da como resultado un valor próximo a $1.00 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ por lo que la concentración de CdTeQD-Lcys empleada en las medidas de fluorescencia es aproximadamente $0.3 \mu\text{M}$. Teniendo en cuenta las diluciones realizadas para dichas medidas la concentración las muestras de CdTeQD-Lcys conservadas a 6°C sería $2 \mu\text{M}$.

En los CdTe QD estabilizados por tioles, la disposición de los iones en el QD es tal que Te^{2-} está orientado hacia el interior del QD y Cd^{2+} hacia la superficie siendo a este ion al que une el ligando a través del grupo tiol (Murray et al, 2000). Se puede estimar el número moléculas de CdTe (N) presentes en cada CdTeQD-Lcys según la ecuación (Zhang et al, 2011).

$$N = \frac{\rho V N_A}{\mu}$$

en donde ρ es la densidad del material, V es el volumen ocupado por una esfera de radio R , μ es la masa molar del material y N_A el número de Avogadro. Para un valor promedio de 3 nm encontrado para CdTeQD-Lcys, la aplicación de la anterior ecuación da como resultado un valor $N = 260$ moléculas de CdTe y, admitiendo que en la superficie (N_s) del QD el número de iones Cd^{2+} viene dada por (Zhang et al, 2011)

$$N_s = N^{2/3}$$

el número de sitios disponibles en la superficie para unirse al ligando es de 41 moléculas.

Teniendo en cuenta el número de moléculas de CdTe por QD (260 moléculas) calculado anteriormente, en el caso de producirse una transformación del 100% de la

cantidad inicial de Te^{2-} (0,59 mmol/50 mL), se obtiene un valor de 4.5 μM la concentración máxima esperada para CdTeQD-Lcys lo que significa que el rendimiento en la obtención de CdTeQD-Lcys está próximo al 50% teniendo en cuenta el valor de la concentración (2 μM) estimado antes a partir de los datos espectrales.

Las muestras obtenidas de la síntesis que fueron conservadas en vacutainers a 6 °C mantienen niveles de fluorescencia aceptable por un periodo de dos a tres meses. Debe advertirse que se aprecian significativos incrementos en la fluorescencia de la muestras en los primeros 15 días cuando se analizan en disoluciones tamponadas con MOPS (pH 7.4). Sin embargo, los espectros registrados con posterioridad a esos 15 días presentan una buena coincidencia en el perfil del espectro y en la posición del máximo: esta circunstancia motivó que todas las muestras fueran utilizadas a partir de 15 días de su síntesis. Por otra parte, debe indicarse igualmente que en los espectros registrados pasados más de 50 días desde la síntesis, se advierte una desviación de 2 nm hacia el ultravioleta que podría ser atribuida a una disminución del tamaño medio de las nanopartículas como consecuencia de la desorción de ligandos de la superficie del QD. La pérdida de ligandos puede disminuir el tamaño del núcleo y aumentar la energía de la primera transición electrónica (Yu et al, 2003).

3.2. Fluorescencia de CdTeQD-Lcys

La fluorescencia de CdTeQD-Lcys tiene un valor máximo a pH 7.4 en medio acuoso tamponado con MOPS lo que ocurre igualmente en medios tamponados con Tris-HCl (Zhao et al, 2010). Sin embargo, para las pruebas realizadas en esta Memoria se ha escogido MOPS, porque, a diferencia de otros tampones, no tiene tendencia a unirse al ion Cu^{2+} a pH próximo a la neutralidad y a 4°C (Roland et al, 2001). Además, en presencia de MOPS se observa un aumento de la fluorescencia de CdTeQD-Lcys (Figura 22) lo que sugiere que la respuesta fluorescente está aparentemente unida a un aumento de la capacidad amortiguadora del tampón necesaria para mantener el pH en 7.4. Dentro del margen comprendido entre 6 y 20 mM se obtienen medidas bastante estables de la fluorescencia de CdTeQD-Lcys que se reproducen transcurrida hora de preparadas las muestras. La presencia de KCl provoca un quenching que es apreciable a concentraciones relativamente bajas de la sal (Figura 23). Por esta razón la fuerza iónica de las disoluciones analizadas en esta Memoria, están determinadas sólo por la concentración del tampón MOPS. También se produce un descenso de

fluorescencia si se añade cantidades mayores de 1 mM de L-cisteína a las disoluciones de CdTeQD-Lcys aun cuando los nanocristales recubiertos de tioles hidrofílicos mejoran su estabilidad en presencia de un exceso de tioles libres (Döllefeld et al, 2002; Gaponik et al, 2002). Este comportamiento pudiera estar justificado por el hecho de que, como se ha indicado anteriormente, el proceso de síntesis de CdTeQD-Lcys contiene ya un exceso de L-cisteína libre dado que el número de ligandos necesarios para el recubrimiento superficial es relativamente pequeño.

Hay otra cuestión de interés que se puede igualmente observar en las Figuras 4 y 5 y que se refiere a la estabilidad de CdTeQD-Lcys. En ambas representaciones gráficas se aprecia que los resultados no se reproducen completamente ya que hay cambios de la intensidad de fluorescencia cuando se mide la misma disolución a diferentes tiempos. En el caso de las disoluciones con diferentes cantidades de MOPS la repetición de las medidas supone una disminución de la fluorescencia en todos los casos (Figura 22) mientras que en presencia de diferentes cantidades KCl ocurre a la inversa, todas las disoluciones presentan aumentos de fluorescencia al repetir la medida. Por otro lado, se ha comprobado que se produce igualmente cambios de la intensidad de fluorescencia con la temperatura. Así, muestras mantenidas a 35 °C durante 5 días presentan una disminución en la intensidad de fluorescencia del 50% cuando se compara con la misma muestra conservada a 6°C.

En principio, la estabilidad de los QD parece estar relacionada con la concentración. Se ha señalado (Döllefeld et al, 2002) que nanopartículas semiconductoras con metales de los grupos (II-VI), estabilizadas con tioles son más estables cuando la concentración es lo suficientemente alta ya que, en caso contrario, se produce una continua desorción de ligandos con la correspondiente disminución del número de partícula y el cambio en sus propiedades espectrales. Para el caso de nanopartículas de CdS estabilizadas con tioles este comportamiento se traduce en una disminución de la absorción de la banda a mayor longitud de onda cuando la concentración de la nanopartícula era 1 μM incrementándose notablemente la estabilidad cuando la concentración era 2 μM (Döllefeld et al, 2002). En el presente trabajo la conservación de las muestras a 6°C se efectúa con concentraciones próximas a 2 μM por lo que cabría esperar que se mantuvieran estables, como así ocurre, durante un periodo de tiempo relativamente largo. Sin embargo, en todos los experimentos las concentraciones calculadas de CdTeQD-Lcys son del orden de 0.3-0.4 μM , por lo tanto, las disminuciones observadas en la fluorescencia en función del

tiempo (Figura 4) podrían estar relacionadas con una menor estabilidad del QD por la desorción del ligando, proceso que se ve favorecido al aumentar la temperatura.

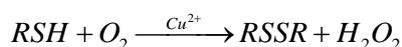
Para el análisis de las muestras biológicas se optó por la medida que en placa que permitía una considerable reducción del tiempo de medida. Todas las determinaciones se realizaron tras comprobar el correcto ajuste de la posición de las placas mediante medidas de la fluorescencia emitida por una disolución de sulfato de quinina 0.015 M. Se aceptaron los ajustes que daban lugar a desviaciones estándar no superiores al 0.01 % en el máximo de fluorescencia para un conjunto de 12 medidas. La influencia de la temperatura en la fluorescencia de CdTeQD-Lcys en MOPS pH 7.4, se muestra en la Figura 24. Se ha monitorizado los cambios de fluorescencia que se producen cuando la temperatura cambia. Se observa que la fluorescencia disminuye como respuesta a un relativamente rápido aumento de temperatura (0.8 °C/min), posteriormente la intensidad de fluorescencia se estabiliza (2-26 min) para aumentar posteriormente. Los cambios de fluorescencia no son muy pronunciados aunque podría constituir un factor de dispersión de resultados si la temperatura no se fija adecuadamente.

La repetición de la prueba manteniendo la temperatura a 21 °C ofrece valores con una aceptable reproducibilidad en un intervalo de tiempo (28 min) superior al necesario para el análisis de placas. La desviación estándar es de $\pm 2.4\%$ para las medidas realizadas en el máximo de emisión cuya posición, por otra parte, sólo varía un 0.1 %. Debe destacarse que la tendencia observada en estas pruebas es el crecimiento paulatino de fluorescencia que pudiera considerarse como una evidencia experimental de que no se produce un deterioro de las muestras por pérdida de ligandos durante el tiempo del análisis.

3.3. Desactivación de la luminiscencia de QD por iones Cu(II)

La presencia de Cu (II) en el medio produce una disminución de la fluorescencia de CdTeQD-Lcys (Figura 26). Este proceso puede ser utilizado para la determinación de Cu (II) en disolución aprovechando que CdTeQD-Lcys interacciona con los iones Cu (II) de forma selectiva en presencia de otros iones mono y divalentes (Ghosh et al, 2009). Aunque no es factible una interferencia por degradación fotoquímica de la muestra en las condiciones de irradiación empleadas en los experimentos, existe sin embargo, dos aspectos a considerar por su posible influencia

en las determinaciones analíticas. Concretamente la oxidación de la L-cisteína y, como consecuencia de ello, la aparición de especies oxidantes. Se puede calcular que en el proceso de obtención descrito para CdTeQD-Lcys están presentes aproximadamente 1300 moléculas de L-cisteína por cada QD de modo que hay un exceso suficiente para ocupar los 41 puntos de unión en la superficie del QD mediante enlaces entre iones Cd^{2+} y el grupo tiol de la L-cisteína. La cantidad restante de cisteína (ca. 97%) en el seno de la disolución representa una proporción lo suficientemente alta para que pueda sufrir un proceso de oxidación en presencia de Cu^{2+} con mayor probabilidad que los tioles ligados a la superficie del QD. El proceso de oxidación se produciría de acuerdo con la reacción global (Pecci et al, 1997).



Es de esperar, pues, que esta reacción provoque una disminución de L-cisteína libre pero no cambios significativos en la concentración de Cu (II) dado su carácter de catalizador. No obstante, la reacción genera peróxido de hidrógeno que puede producir la destrucción de CdTeQD-Lcys. De hecho, se ha señalado que H_2O_2 destruye nanocristales de CdTe a pH básicos (Wang et al, 2005). Sin embargo, a pH neutro los efectos de H_2O_2 sobre la fluorescencia de CdTe-QD parecen estar limitados a concentraciones superiores a 0.25 mM (Yuan et al, 2008). En la presente Memoria, la concentración de L-cisteína en las muestras conservadas a 6 °C es de aproximadamente 5.9 mM. La preparación de las muestras utilizadas en las medidas fluorimétricas suponen una dilución de forma que la concentración de L-cisteína baja hasta 0.94 mM. Tomando como referencia el estudio de Pecci (Pecci et al, 1997) realizado a 25 °C y pH 7.4, en donde se produce 0.32 moles de peróxido de hidrógeno por cada mol de cisteína, la cantidad que podría formarse de peróxido de hidrógeno en nuestras condiciones experimentales debería ser aproximadamente 0.29 mM un valor bastante próximo al límite señalado por Yuan et al, de modo que improbable una interferencia significativa del peróxido de hidrógeno en las medidas de fluorescencia realizadas en nuestros análisis, de modo que la desactivación observada es atribuida a la presencia de Cu (II) en disolución.

Para explicar la desactivación de la fluorescencia de QDs se han propuesto diferentes mecanismos que incluyen efectos de filtro interno (Cui et al, 2012), recombinación no radiativa (Qu y Peng, 2002) transferencia electrónica (Chen y Rosenzweig, 2002), formación de un enlace entre el QD-desactivador (Bo y Ping, Z., 2005), reacción con oxígeno singlete (Yang et al, 2011) entre otros. Con

independencia del mecanismo, los resultados obtenidos en medidas de fluorescencia en estado estacionario, parecen ajustarse en un alto número de casos a la ecuación de Stern-Vomer

$$\frac{F^o}{F} = 1 + K_{SV} [Cu^{2+}]$$

en donde F^o y F son las intensidades de fluorescencia en ausencia de Cu(II) y en presencia de Cu (II) respectivamente, siendo K_{SV} la constante de Stern-Vomer. Esta ecuación está básicamente relacionada con procesos que implican un encuentro entre la especie fluorescente y el desactivador bien en estado fundamental (desactivación estática) o en estado excitado (desactivación dinámica). En algún caso, por ejemplo si la concentración de desactivador es alta, la representación gráfica de F^o/F vs $[Cu^{2+}]$ puede mostrar un perfil ascendente como resultado de la existencia simultánea de las desactivaciones estática y dinámica (Koneswaran y Narayanaswamy, 2009). Cuando sólo un tipo de desactivación es operativo, la ecuación predice un comportamiento lineal. Así ocurre en el análisis de la desactivación de la fluorescencia de CdTe QD estabilizados con L-cisteína, debida a la presencia de Cu (II) (Ghosh et al, 2009). En este trabajo, los resultados obtenidos en las medidas de fluorescencia en estado estacionario y resueltas en el tiempo, son atribuidos a una desactivación estática. En la presente Memoria, utilizando el mismo tipo de QD, se ha comprobado que los datos experimentales se ajustan bien a la ecuación de Stern-Volmer (Figura 27). Repetidas determinaciones dan un valor promedio para la constante K_{SV} de 930000 M^{-1} con una variación de $\pm 7\%$ expresada como desviación estándar. Este valor es superior al encontrado por Ghosh et al. y ello probablemente debido al incremento de fluorescencia provocado por el tampón MOPS. Por otra parte, el valor de K_{SV} es similar al encontrado por Zhang et al (Zhang et al, 2008) para CdSe/CdS quantum-dots estabilizado con cisteína y mayor que el calculado para CdTe quantum dots estabilizados con ácido mercaptopropionico con un diámetro medio de 3 nm (Bo y Ping, 2005). Además la linealidad obtenida para la ecuación de Stern Volmer permite apreciar una desactivación de la fluorescencia del 8.5% en presencia Cu (II) 0.1 μM , lo que significa la posibilidad de medir en un rango algo inferior al encontrado con CdSe quantum dots estabilizados con ácido 2-mercaptopetanosulfónico en micelas de cloruro de dodeciltrimetilamonio (Fernández-Arguelles et al, 2005) e incluso con el método colorimétrico basado en la autoagregación de nanopartículas de Au funcionalizadas con bases de Schiff (Wang et al, 2012). No obstante, en una reciente publicación las partículas de Au han mostrado un excelente comportamiento para la detección de Cu

(II) llegando a alcanzar el límite de detección hasta 20 nM (Lu et al, 2012) aunque su aplicación a la determinación en eritrocitos, que es tratada en esta Memoria, presenta previsiblemente algún problema derivado de la interferencia de los grupos hemo con la absorbancia de los coloides de oro.

3.3. Determinación fluorimétrica de Cu (II) en plasma y eritrocitos utilizando CdTeQD-Lcys

Se ha utilizado CdTeQD-Lcys para la determinación fluorimétrica de Cu (II) en muestras biológicas de individuos pertenecientes a los grupos estudiados en el análisis del estrés oxidativo asociado a deficiencia de cobre para pacientes de UCI. Los datos expuestos en apartados anteriores indican que los daños oxidativos en el DNA se manifiestan en el primer día de estancia en UCI y se correlacionan con descensos en la concentración de Cu y un descenso de la actividad antioxidante. Nosotros hemos probado la utilidad de la emisión CdTeQD-Lcys para cuantificar Cu (II) en muestras biológicas de un pequeño grupo de individuos perteneciente a este mismo estudio global.

Todas las muestras biológicas analizadas se sometieron a un pretratamiento antes de su uso en la determinación de Cu (II). En el eritrocito, el principal reservorio de cobre según Gärtner y Weser (Gärtner y Weser, 1983) es la Cu/Zn superóxido dismutasa (Cu/Zn-SOD) que acumula hasta aproximadamente un 95% del cobre total en el eritrocito. Señalan estos autores la presencia en el eritrocito de otras tres proteínas que se reparten un 5% del cobre total. Sin embargo la unión del Cu (II) a la proteína es relativamente fuerte lo que supone una dificultad para hacer accesibles los iones. En este sentido se ha recomendado el tratamiento con ácido clorhídrico para debilitar el enlace del ion a la proteína (Assfalg et al, 2003; Mulligan et al, 2008; Säbel et al, 2010). La acidificación de las muestras de eritrocito se ha llevado a cabo en la presente Memoria (ver sección de Metodología) con anterioridad a la extracción de las proteínas hemo mediante alcohol/cloroformo de acuerdo con el método Tsuchihashi.

En el caso del plasma los transportadores de Cu son albúmina y macroglobulinas pero es la ceruloplasmina, cuya función no parece ser transportadora (Hellman y Gitlin, 2002), la que aparece de forma mayoritaria en el plasma (95%) (Harvey et al, 2009). Esta proteína tiene seis puntos de enlace con los iones Cu (II)

(Sato y Gitlin, 1991). De otro lado, se ha descrito (Sedlak y Wittung-Stafshede, 2007) que a pH 7 y 23 °C en presencia de urea (4-5 M), se produce un desplegamiento reversible de la ceruloplasmina que da lugar a una forma intermedia cuya estructura secundaria presenta una mayor exposición de aromáticos al medio, lo que lleva aparejado la pérdida de dos átomos de cobre y la reducción de su actividad catalítica. Sin embargo, los datos experimentales confirman que, en esas condiciones, un clúster de tres átomos de cobre permanece intacto. La posterior adición de una mayor cantidad de urea (concentración aprox. 6-7 M) desencadena el desplegamiento completo de la proteína lo que produce la pérdida de todos los átomos de cobre. El plegamiento de la apoproteína conduce a un glóbulo fundido sin actividad catalítica. De acuerdo con estos datos, en este trabajo, aunque también se hicieron pruebas con guanidina, la mayor parte de las experiencias se realizaron por tratamiento con urea 8M.

Se analizaron muestras procedentes de eritrocitos procedentes de tres individuos sanos pertenecientes al grupo de control y de dos sujetos pertenecientes al grupo de críticos. Las concentraciones de Cu (II) encontradas para los tres individuos sanos tienen valores promedio que se sitúan alrededor de 8 μ M (Tabla XIX), menores que los valores citados en la literatura en donde se indica como valor normal de Cu (II) $10.9 \pm 1.2 \mu$ M en eritrocito (Hatano et al, 1982). Las determinaciones fluorimétricas de Cu (II) en eritrocitos dan resultados intermedios entre los encontrados en FAAS y ICP-MS, siendo estos últimos inesperadamente bajos. En conjunto, hay una aceptable concordancia de resultados cuando se comparan las tres técnicas utilizadas (fluorescencia, FAAS, ICP-MS). La aproximación entre los valores obtenidos en FAAS y ICP-MS con los encontrados utilizando CdTeQD-Lcys, permiten afirmar que las medidas fluorimétricas son adecuadas para la detección y cuantificación de Cu (II) con la ventaja añadida de la facilidad de utilización de esta técnica en comparación con las otras dos.

Por otra parte, se puede constatar igualmente que el contenido en Cu (II) en las dos muestras de eritrocitos analizadas de pacientes de UCI, está claramente por debajo de los valores encontrados para los individuos sanos en concordancia con los datos expuestos en la Tabla XIX.

La aplicación de las medidas de fluorescencia al estudio del plasma presenta una mayor limitación que en el caso del eritrocito. Aunque en el presente trabajo el plasma ha sido tratado con urea 8 M, lo que aseguraría la desnaturalización

irreversible y subsiguiente pérdida de los iones Cu en la ceruloplasmina (Sedlak y Wittung-Stafshede, 2007) y albúmina (Leggio et al, 2009), los valores claramente más bajos encontrados en la técnica fluorimétrica, tal como se puede apreciar en la Figura 10 (datos correspondientes a P1, P2 y P3), indican que otros factores afectan a la medida imposibilitando, por tanto, la aplicación de la técnica con el tratamiento del plasma en un solo paso. Existen evidencias que ponen en duda la utilidad de la ceruloplasmina como biomarcador en la deficiencia en cobre (Lassi y Prohaska, 2011), por este motivo no se realizó ningún intento posterior por mejorar la metodología empleada en el caso de las muestras de plasma.

Conclusiones del Estudio

CONCLUSIONES DEL ESTUDIO

Valoración del estado nutricional en cobre de la población general de estudio.

PRIMERA. Nuestros resultados muestran un aporte de cobre por debajo de los 2/3 de las recomendaciones para esta mineral, en cerca del 50% de los pacientes críticos que han formado parte del estudio, mostrando diferencias estadísticamente significativas respecto a la ingesta de cobre en grupo control.

SEGUNDA. La valoración bioquímica de cobre en plasma, muestra que el 17% de los pacientes ingresados en UCI durante 7 días, presenta deficiencia en este mineral, empeorando a lo largo de su estancia, mostrando diferencias significativas con el grupo control.

TERCERA. Al determinar cobre en eritrocito, nuestros resultados muestran que un 35.4% de los pacientes críticos muestran valores deficientes, empeorando de manera significativa a lo largo de la estancia en UCI, y siendo significativamente diferentes a los valores en el grupo control.

Valoración de estrés oxidativo

CUARTA. Los resultados de nuestro estudio muestran significación estadística al comparar los niveles de antioxidantes la población crítica respecto a la control, observándose una evolución negativa significativa en los pacientes críticos a lo largo de su estancia en la UCI.

QUINTA. Los resultados obtenidos en la valoración del daño en DNA muestran niveles peores en los pacientes al final del periodo de estancia, estando asociados de manera negativa significativa con los niveles de antioxidantes.

SEXTA. Al realizar el análisis estadístico de regresión se observa, teniendo en cuenta a los sujetos críticos deficientes y no deficientes en cobre eritrocitario, que los pacientes deficientes presentan 4.4 veces más riesgo de mostrar un SOFA por encima de 8, observándose una alta correlación entre el valor SOFA y los niveles de cobre en eritrocito, confirmando el alto valor pronóstico de la deficiencia de cobre como

biomarcador de la evolución y morbimortalidad del paciente durante su estancia en UCI.

CONCLUSIÓN FINAL

SÉPTIMA. Dados los resultados obtenidos en el presente estudio, podemos concluir que existe una necesidad de determinar de una manera rápida y eficaz el cobre, como el QD, a nivel hospitalario dado el alto coste que en la actualidad conlleva, tanto económico como en tiempo, lo que contribuirá a la detección de deficiencias nutricionales en cobre en pacientes en los que su situación clínica deriva en alteraciones y sintomatología que generalmente se atribuye a otras causas o se desconocen.

La carencia de estudios recientes de valoración de estado nutricional de cobre, tanto en personas sanas como en pacientes hospitalizados, hace obligatorio el desarrollo de estudios que describan la situación actual de la prevalencia de deficiencia de cobre en la población.

CONCLUSIONS OF THE STUDY

Copper Nutritional Assessment in general population.

FIRST. Our results show a contribution of copper below two thirds of the recommendations for this mineral, in about 50% of critically ill patients who have been part of the study, showing statistically significant differences regarding the intake of copper in control group.

SECOND. The biochemical assessment of plasma copper, shows that 17% of patients admitted to the ICU for 7 days, are deficient in this mineral, showing worsening through the stay, showing significant differences with the control group.

THIRD. In reference to copper in erythrocyte, our results show that 35.4% of critically ill patients show deficient values that deteriorate significantly throughout the ICU stay, and being significantly different from the values in the control group.

Oxidative stress assessment

FOURTH. The results of our study show statistical significance when comparing antioxidant levels in critical relative to the control population, showing a significant negative trend in critically ill patients during their stay in the ICU.

FIFTH. The results in the assessment of DNA damage show worst levels in patients at the end of the period of stay, being significantly negatively associated with the levels of antioxidants.

SIXTH. When performing statistical regression analysis, our results show, considering copper deficient and no-deficient critical subjects, that deficient have 4.4 times the risk of showing a SOFA above 8, showing a high correlation between the value SOFA and erythrocyte copper levels. That confirms the high prognostic value of copper deficiency as a biomarker of evolution and morbidity of the patient during their ICU stay.

FINAL CONCLUSION

SEVENTH. Given the results in the present study, we can conclude that there is a need to determine copper quick and efficient method, as the QD in hospitals, because of the high cost that currently involves both economic and in time, that contribute to the detection of copper nutritional deficiencies in patients whose clinical condition results in alterations and symptoms generally attributed to other causes or unknown.

The lack of recent studies assessing copper nutritional status in both healthy individuals and in hospitalized patient mandates the development of studies that describe the current status of the prevalence of copper deficiency in the population.

Referencias bibliográficas

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abilés J, de la Cruz AP, Castaño J, Rodríguez-Elvira M, Aguayo E, Moreno-Torres R, Llopis J, Aranda P, Argüelles S, Ayala A, de la Quintana AM, Planells EM: Oxidative stress is increased in critically ill patients according to antioxidant vitamins intake, independent of severity: a cohort study. *Crit Care* 2006;10:R146

Abilés J, Pérez R, Moratalla G, Castaño J, Rodríguez M, Pérez A, Moreno-Torres R, Planells E. High prevalence of hyperhomocysteinemia in critically ill patients: vascular damage and adequate vitamin intake. *E J Clin Nutr* 2008;3:e240-e245

Afrin LB. Fatal copper deficiency from excessive use of zinc-based denture adhesive. *Am J Med Sci* 2010;340:164-168

Agarwal N, Norkus E, Garcia C, Nassoura Z, Leighton L, Cayten C. Effect of surgery on serum antioxidant vitamins. *JPEN* 1996;2:32S. Abstract

Agrawal A, Tripp RA, Anderson LJ, Nie S. Real-time detection of virus particles and viral protein expression with two-color nanoparticle probes. *J Virol* 2005;79:8625-8628

Akatsu HA, Hori T, Yamamoto et al. Transition metal abnormalities in progressive dementias. *BioMetals* 2012;52(2):337-350

Algar WR, Krull UJ. Multidentate surface ligand exchange for the immobilization of CdSe/ZnS quantum dots and surface quantum dot-oligonucleotide conjugates. *Langmuir* 2008;24:5514-5520

Alivisatos, AP. Perspectives on the Physical Chemistry of Semiconductor Nanocrystals. *J Phys Chem* 1996;100:13226-13239

Allen KGD, Klevay LM. Copper: an antioxidant nutrient for cardiovascular health [Review]. *Curr Opin Lipidol* 1994;5:2

Allen LH, Solomons NW. Absorption and malabsorption of mineral nutrients. In: Solomons NW, Rosenberg IH, eds. *Current topics in nutrition and disease*. Vol 12. New York: Alan R Liss Inc, 1984:199-229

Alonso de Vega JM, Diaz J, Serrano E, Carbonell LF. Oxidative stress in critically ill patients with systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med* 2002;30:1782-1786

Alonso de la Vega JM, Diaz J, Serrano E, Carbonell LF: Plasma redox status relates to the severity in critically ill patients. *Crit Care Med* 2000;28:1812-1814

Arizpe-Chávez H, Ramírez-Bon R, Espinoza-Beltrán FJ, Zelaya-Angel O, Marín JL, Riera R. Quantum confinement effects in CdTe nanostructured films prepared by the RF sputtering technique. *J Phys Chem Solids* 2000;61:511-518

A.S.P.E.N Board of Directors and the Clinical Guidelines Task Force: Guidelines for the use of parenteral and enteral nutrition in adult and pediatric patients. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2002;26(suppl):22SA-24SA

Assfalg M, Banci L, Bertini I, Turano P, Vasos PR. Superoxide dismutase folding/unfolding pathway: role of the metal ions in modulating structural and dynamical features. *J Mol Biol* 2003;330:145-158

Ballesteros E, Moreno D, Gómez T, Rodríguez T, Rojo J, García-Valverde M, Torroba T. A new selective chromogenic and turn-On fluorogenic probe for copper (II) in water-acetonitrile 1:1 solution. *Org Lett* 2009;11:1269-1272

Barceloux DG. Copper. *J Toxicol Clin Toxicol* 1999;37:217-230

Barnham KJ, Masters CL, Bush AI. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discovery* 2004;3:205-14

Baue AE. MOF, MODS, and SIRS: What is in a name or an acronym? *Shock* 2006;26:438-449

Bawendi MG, Carroll PJ, Wilson WL, Brus LE. Luminescence properties of CdSe quantum crystallites: resonance between interior and surface localized states. *J Chem Phys* 1992;96:946-954

Becker JS, Zoriy MV, Pickhardt C, Palomero-Gallagher N, Zilles K. Quantitative imaging of selenium, copper, and zinc in thin sections of biological tissues (slugs-genus arion) measured by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Chem* 2005;77:6074-6080

Bentolila LA, Ebenstein Y, Weiss S. Quantum dots for in vivo small-animal imaging. *Journal of Nuclear Medicine* 2009;50:493-496

Bentzen EL, House F, Utley TJ, Crowe JE, Wright DW. Progression of Respiratory Syncytial Virus Infection Monitored by Fluorescent Quantum Dot Probes. *Nano Lett* 2005;5:591-595

Berger LI. *Semiconductor Materials*. CRC Press USA. 1997

Berger MM, Eggimann P, Heyland DK, et al. Reduction of nosocomial pneumonia after major trauma burns by trace element supplementation: aggregation of two randomized trials. *Crit Care* 2006;10:R153

Berger MM, Soguel L, Pinget C, et al. Antioxidant supplements modulate clinical course after complex cardiac surgery and major trauma. *Abstr. Intensive Care Med* 2005;31:S32

Bertini I, Rosato A. Menkes disease. *Cell Mol Life Sci* 2008;65:89-91

Beyer WF, Fridovich I. Assaying for superoxide dismutase activity; some large consequences of minor changes in conditions. *Anal Biochem* 1987;161:559-66

Biju V, Itoh T, Anas A, Sujith A, Ishakawa M. Semiconductor quantum dots and metal nanoparticles: Syntheses, optical properties, and biological applications. *Anal Bioanal Chem* 2008;391:2469-2495

Bo C, Ping Z. A new determining method of copper (II) ions at ng.ml⁻¹ levels based on quenching of the water-soluble nanocrystals fluorescence. *Anal Bioanal Chem* 2005;381:986-992

Boldt, K, Bruns OT, Gaponik N, Eychmüller A. Comparative examination of the stability of semiconductor quantum dots in various biochemical buffers J Phys Chem B 2006;110:1959-1962

Botash AS, Nasca J, Dubowy R, Weenberger HL, Oliphant M. Zinc-induced copper deficiency in an infant. Am J Dis Child 1992;164:709-11

Bristian BR, McCowen KC. Nutritional and metabolic support in the adult intensive care unit: key controversies. Crit Care Med 2006;34:1525-1531

Brown DR, Kozlowski H. Biological inorganic and bioinorganic chemistry of neurodegeneration based on prion and Alzheimer diseases. Dalton Trans 2004;1907-17

Bruchez M Jr, Moronne M, Gin P, Weiss S, Alivisatos AP. Nanocrystals as fluorescent biological labels. Science 1998;281:2013–2016

Brujin LI, Miller TM, Cleveland DW. Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. Annu Rev Neurosci 2004;27:723-49

Brus LE. Electron–electron and electron-hole interactions in small semiconductor crystallites: The size dependence of the lowest excited electronic state. J Chem Phys 1984;80:4403-4409

Brus LE. Electronic Wavefunctions in Semiconductor Clusters” J Phys Chem 1986;90:2555-2560

Bulger EM, Maier RV: Antioxidants in critical illness. Arch Surg 2001, 136:1201-1207

Bureau I, Gueux E, Mazur A, Rock E, Roussel AM, Rayssiguier Y. Female rats are protected against oxidative stress during copper deficiency. J Am. Coll Nutr 2003;22:239-246

Byers RJ, Hitchman ER. Quantum Dots Brighten Biological Imaging”. Prog Histochem Cytochem 2011;45: 201-237

Cai W, Shin DW, Chen K, Gheysens O, Cao Q, Wang SX, Gambhir SS, Chen X. Peptide-Labeled Near-Infrared Quantum dots for imaging tumor vasculature in living subjects. Nano Lett 2006;6:669-676

Camakaris J, Voskoboinik I, Mercer JF. Molecular mechanisms of copper homeostasis. Biochem Biophys Res Commun 1999;261:225-232

Cander B, Dundar ZD, Gul M, Girisgin S. Prognostic value of serum zinc levels in critically ill patients. J Crit Care 2011;26:42-6

Cerra FB, Benitez MR, Blackburn GL, et al. Applied nutrition in ICU patients: a consensus statement of the American College of Chest Physicians. Chest 1997;111:769-778

Chan WCW, Nie SM. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. Science 1998;281:2016–2018

Chen YF, Rosenzweig Z. Luminescence CdS quantum dots as selective ion probes. *Anal Chem* 2002;74:5132-38

Cheng CH, Chen CH, Wong Y, Lee BJ, Kan MN, Huang YC. Measured versus estimated energy expenditure in mechanically ventilated critically ill patients. *Clin Nutr* 2002;21:161-172

Choi JH, Chen KH, Strano MS. Aptamer capped nanocrystal quantum dots: a new method for label free protein detection. *J Am Chem Soc* 2006;128:15584-15585

Cobine PA, Pierrel F, Winge DR. Copper trafficking to the mitochondrion and assembly of copper metalloenzymes. *Biochem Biophys Acta* 2006;1763:759-772

Corbisier P, Houbion A, Remade J. A new technique for highly sensitive detection of superoxide dismutase activity by chemiluminescence. *Anal Biochem* 1987;164:240-7

Crimi E, Sica V, Williams-Ignarro S, et al. The role of oxidative stress in adult critical care. *Free Radic Biol Med* 2006;40:398-406

Cui DX, Pan BF, Zhang H, Gao F, Wu R, Wang JP, He R, Asahi T. Self-assembly of quantum dots and carbon nanotubes for ultrasensitive DNA and antigen detection. *Anal Chem* 2008;80:7996-8001

Dabbousi BO, Rodriguez-Viejo J, Mikulec FV, Heine JR, Mattoussi H, Ober R, Jensen KF, Bawendi MG. (CdSe)ZnS core-shell qds: synthesis and characterization of a size series of highly luminescent nanocrystallites. *J Phys Chem* 1997;B101,9463-9475

Dahan M, Laurence T, Pinaud F, Chemla DS, Alivisatos AP, Sauer M, Weiss S. Time-gated biological imaging by use of colloidal quantum dots. *Opt Lett* 2011;26:825-827

Danks DM, Campbell PE, Stevens BJ, Mayne V, Cartwright E. Menkes' kinky hair syndrome: an inherited defect in copper absorption with widespread effects. *Pediatrics* 1972;50:188-201

Davis AV, O'Halloran TV. A place for thioether chemistry in cellular copper ion recognition and trafficking. *Nat Chem Biol* 2008;4:148-151

Deng Z, Zhang Y, Yue J, Tang F, Wei Q. Green and orange CdTe quantum dots as effective pH-sensitive fluorescent probes for dual simultaneous and independent detection of viruses. *J Phys Chem* 2007;B11;12024-12031

Denko CU. Protective role of ceruloplasmin. *Agents Actions* 1979;9:333-43

Di Silvestro RA. Effects of inflammation on copper antioxidant enzyme levels. *Adv Exp Med Biol* 1989;258:253-8

Dive A, Moulart M, Jonard P, et al. Gastrointestinal motility in mechanically ventilated critically ill patients: a manometric study. *Crit Care Med* 1994;22:441-447

Doig GS, Simpson F. The Australian and New Zealand Intensive Care Society Clinical Trials Group. Evidence-based guidelines for nutritional support of the critically ill:

results of a bi-national guideline development conference. Carlton: Australian and New Zealand Intensive Care Society; 2005

Döllefeld H, Hoppe K, Kolny J, Schilling K, Weller H, Eychmüller A. Investigations on the stability of thiol stabilized semiconductor nanoparticles. *Phys Chem Phys* 2002;4:4747-4753

Domaille DW, Que EL, Chang CJ. Synthetic fluorescent sensors for studying the cell biology of metals. *Nat Chem Biol* 2008;4:168-175

Doraiswamy PM and Finefrock AE. Metals in our minds: therapeutic implications for neurodegenerative disorders. *Lancet Neurology* 2004;3(2):431-34

Drummen GPC. Quantum Dots. From Synthesis to Applications in Biomedicine and Life Sciences. *Int J Mol Sci* 2010;11:154-163

Dujols V, Ford F, Czarnik AWJ. A long-wavelength fluorescent chemodosimeter selective for Cu (II) ion in water. *Am Chem Soc* 1997;119:7386-7387

Dunlap WM, James JC, Hume DM. Anemia and neutropenia caused by copper deficiency. *Ann Intern Med* 1974;80:470-6

Ekimov AI, Efros AL, Onushchenko AA. Quantum size effect in semiconductor microcrystals". *Solid State Commun* 1985;56:921-924

Elia M. Changing concepts of nutrient requirements in disease: implications for artificial nutritional support. *Lancet* 1995;5:1279-1284

Empedocles SA, Bawendi MG. Spectroscopy of Single CdSe Nanocrystallites. *Acc Chem Res* 1999;32, 389-396

Ensafi AA, Khayamian T, Benvidi A. Simultaneous determination of copper, lead and cadmium by cathodic adsorptive stripping voltammetry using artificial neural network. *Anal Chim Acta* 2006;561:225-232

Expert Panel for Nutrition Advisory Group, AMA Department of Foods and Nutrition. Guidelines for Essentials trace element preparations for parenteral use. *JAMA* 1979;241:2051-2054

Fernandez-Argüelles, M. T.; Jin, W. J.; Costa-Fernandez, J. M.; Pereiro, R.; Sanz-Medel, A. *Anal. Chim. Acta.* 2005, 549, 20-25.

Ferns GAA, Lamb DJ, Taylor A. The possible role of copper ions in atherogenesis: the Blue Janus. *Atherosclerosis* 1997;133:139-52

Fischer PWF, L'Abbé MR, Giroux A. Effects of age, smoking, drinking, exercise and estrogen use on indices of copper status in healthy adults. *Nutr Res* 1990;10:1081-90

Fiske DN, McCoy HE III, Kitchens CS. Zinc induced sideroblastic anemia: report of a case, review of the literature, and description of the hematologic syndrome. *Am J Hematol* 1994;46:147-50

Flohé L, Otting F. Superoxide dismutase assays. *Methods Enzymol* 1984;105:93-104

Fraústo da Silva JJR, Williams RJP. The biological chemistry of the elements: the inorganic chemistry of life. Oxford University Press, Oxford UK 2001

Frigoli M, Ouadahi K, Larpent C. A Cascade FRET-mediated ratiometric sensor for Cu²⁺ ions based on dual fluorescent ligand-coated polymer nanoparticles. Chem Eur J 2009;15:8319-8330

Galloway P, McMillan DC, Sattar N. Effect of the inflammatory response on trace element and vitamins status. Ann Clin Biochem 2000;37:289-97

Ganaraja B, Pavithran P, Ghosh S. Effect of estrogen on plasma ceruloplasmin level in rats exposed to acute stress. Indian J Med Sci 2004;58:150-154

Gao XH, Cui YY, Levenson RM, Chung LWK, Nie S. In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. Nat Biotechnol 2004;22:969-976

Gao XH, Nie SM. Molecular profiling of single cells and tissue specimens with quantum dots. Trends Biotechnol 2003;21:371-373

Gao X, Yang L, Petros JA, Marshall FF, Simons JW, Nie S. In vivo molecular and cellular imaging with quantum dots. Curr Op Biotech 2005;16:63-72

Gaponik NA, Talapin DV, Rogach AL, Hoppe K, Shevchenko EV, Kornowski A, Eychmuller A, Weller H. Thiol-Capping of CdTe Nanocrystals: An Alternative to Organometallic Synthetic Routes. J Phys Chem B 2002;106:7177-7185

Gärtner A, Weser U. Erythrocuprein (Cu₂Zn₂ superoxide dismutase) is the major copper protein of the red blood cell". FEBS Letter 1983;155:15-18

Garnica AD, Frias JL, Rennert OM. Menkes' kinky hair syndrome: is it a treatable disorder? Clin Genet 1977;11:154-61

Genin E, Carion O, Mahler B, Dubertret B, Arhel N, Charneau P, Doris E, Mioskowski C. Crash-quantum dot nanohybrids for smart targeting of proteins. J Am Chem Soc 2008;130:8596-8597

Ghosh S, Priyam A, Bhattacharya SC, Saha A. Mechanistic aspects of quantum dot based probing of Cu (II) ions: role of dendrimer in sensor efficiency. J Fluoresc 2009;19:723-731

Goldman E, Balighian E, Mattoussi H, Kuno M, Mauro J, Tran P, Anderson G. Avidin: A natural bridge for quantum dot-antibody conjugates. J Am Chem Soc 2002;124:6378-6382

Goldman ER, Clapp AR, Anderson GP, Uyeda HT, Mauro JM, Medintz IL, Mattoussi H. Multiplexed toxin analysis using four colors of quantum dot fluororeagents. Anal Chem 2004;76:684-688

Gonzales APS, Firmino MA, Nomura CS, Rocha FRP, Oliveira PV, Gaubeur I. Peat as a natural solid-phase for copper preconcentration and determination in a multicommuted flow system coupled to flame atomic absorption spectrometry. Anal Chim Acta 2009;636:198-204.

Goode HF, Cowley HC, Walker BE, Howdle PD, Webster NR. Decreased antioxidante status and increased lipid peroxidation in patients with septic shock and secondary organ dysfunction. *Crit Care Med* 1995;23:646-651

Gupta A and Lutsenko S. Human copper transporters: mechanism, role in human diseases and therapeutic potential *Future Med Chem* 2009;1(6):1125-1142

Haas KL, Franz KJ. Application of metal coordination chemistry to explore and manipulate cell biology. *Chem Rev* 2009;109:4921-4960

Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 1984;219:1-14

Hammond EL, Sayer D, Nolan D, et al. Assessment of precision and concordance of quantative mitochondrial DNA assays: A collaborative International quality assurance study. *J Clin Virol* 2003;27:97-110

Harvey LJ, Ashton K, Hooper L, Casgrain A, Fairweather-Tait SJ. Methods of assessment of copper status in humans: a systematic review. *Am J Clin Nutr* 2009;89:2009S-2024S

Hatano S, Nishi Y, Usui T. Copper levels in plasma and erythrocytes in healthy Japanese children and adults. *Am J Clin Nut.* 1982;35:120-126

Hellman NE, Kono S, Mancini GM, Hoogeboom AJ, De Jong GJ, Gitlin JD. Mechanisms of copper incorporation into human ceruloplasmin. *J Biol Chem* 2002;277(48):46632-46638

Heyland DK. Nutritional support in critically ill patients: a critical review of the evidence. *Crit Care Clin* 1998;14:423-440

Heyland DK, MacDonald S, Keefe L, Drover JW. Total parenteral nutrition in the critically ill patients: a meta-analysis. *JAMA* 1998;280:2013-2019

Heyland DK, Novak F, Drover JW, Jain M, Su X, Suchner U. Should immunonutrition become Soutine in critically ill patients? A systematic review of the evidence. *JAMA* 2001;286:944-53

Heyland DK, Tougas G, King D, Cook DJ. Impaired gastric emptying in mechanically ventilated, crirically il patients. *Crit Care Med* 1996;22:1339-1344

Higgins TL, Murray M, Kett DH, Fulda G, Kramer KM, Belmont D, Dedhia HV, Levy H, Teres D, Zaloga GP, Ko H, Thompson KA. Trace element homeostasis during continuous sedation with propofol containing EDTA versus other sedatives in critically ill patients. *Intens Care Med* 2000;26:S413-421

Howard L, Ashley C. Nutrition in the peroperative patient. *Annu Rev Nutr.* 2003;23:263-282

Hu FQ, Ran YL, Zhou Z, Gao MY. Preparation of bioconjugates of CdTe nanocrystals for cancer marker detection. *Nanotechnology* 2006;17:2972-77

Hu S, Furst P, Hamer D. The DNA and Cu binding functions of ACE1 are interdigitated within a single domain. *New Biol* 1990;2:544-55

Huang J, Xu Y, Qian X. A red-shift colorimetric and fluorescent sensor for Cu²⁺ in aqueous solution: unsymmetrical 4,5-diaminonaphthalimide with N-H deprotonation induced by metal ions. *Org Biomol Chem* 2009;7:1299-1303

Huckleberry Y. Nutritional support and the surgical patients. *Am J Health Syst Pharm* 2004;61:671-682

Hung YH, A. I. Bush, and R. A. Cherny. Copper in the brain and Alzheimer's disease. *J Biol Inorganic Chem* 2010;15(1):61-76

Institute of Medicine. Copper. In: Food and Nutrition Board, ed. Dietary referente intakes: vitamina A, vitaminK, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, Silicon, vanadium, and zinc. Washington, DC: National Academy Press 2002:224-257

Ishizuka M, Nagata H, Takagi K, Kubota K. Sequential evaluations of trace elements in patients receiving parenteral nutrition. *Hepatogastroenterol* 2011;58:1466-9

Juhasz-Pocsine K, Rudnicki SA, Archer RL, Harik SI. Neurologic complications of gastric bypass surgery for morbid obesity. *Neurology* 2007;68:1843-50

Jung HS, Kwon PS, Lee JW, Kim JI, Hong CS, Kim JW, Yan S, Lee JY, Lee JH, Joo T, Kim JSJ. Coumarin-derived Cu²⁺-selective fluorescence sensor: synthesis, mechanisms and applications in living cells. *J Am Chem Soc* 2009;131:2008-2012

Kaim W, Schwederski B. Bioinorganic chemistry: inorganic elements in the chemistry of life, John Wiley, Chichester, UK 1994

Khatua S, Choi SH, Lee J, Huh JO, Do Y, Churchill DG. Highly selective fluorescence detection of Cu²⁺ in water by chiral dimeric Zn²⁺ complexes through direct displacement. *Inorg Chem* 2009;48:1799-1801

Kim JH, Chaudhary S, Ozkan M. Multicolour hybrid nanoprobe of molecular beacon conjugated quantum dots: FRET and gel electrophoresis assisted target DNA detection. *Nanotechnology* 2007;18:195105

Kim BE, Nevitt T, Thiele DJ. Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. *Nat Chem Biol* 2008;4:176-185

Klevay LM. Cardiovascular disease from copper deficiency- a history. *J Nutr* 2000;130:S489-92

Koneswaran M, Narayanaswamy R. L-Cysteine-capped ZnS quantum dots based fluorescence sensor for Cu²⁺ ion. *Sensors and Actuators* 2009;B139:104-109

Kreymann KG, Berger MM, Deutz NE, Hiesmayr M, Joliet P, Kazandjiev G et al. ESPEN Guidelines on Enteral Nutrition: Intensive Care *Clin Nutr* 2006;25:210-233

Kumar N, Gross JB, Ahlskog JE. Copper deficiency myelopathy produces a clinical picture like subacute combined degeneration. *Neurology* 2004;63:33-39

Lassi KC, Prohaska JR. Rapid alteration in rat red blood cell copper chaperone for superoxide dismutase after marginal copper deficiency and repletion. *Nutr Res* 2011;31:698-706

Leatherdale C.A, Woo WK, Mikulec FV, Bawendi MG. On the absorption cross section of CdSe nanocrystal quantum dots. *J Phys Chem* 2002;106:7619-7622

Leggio C, Galantini L, Konarev PV, Pavel NV. Urea-induced denaturation process on defatted human serum albumin and in the presence of palmitic acid. *J Phys Chem* 2009;113:2590-12602

Lewis SJ, Egger M, Sylvester PA, Thomas S. Early enteral feeding versus "nil by mouth" after gastrointestinal surgery: systematic review and meta-analysis of controlled trials. *BMJ* 2001;323:773-776

Li J, Bao D, Hong X, Li D, Li J, Bao Y, Li T. Luminescent CdTe quantum dots and nanorods as metal ion probes. *Colloid Surf A Physicochemical Eng Aspects* 2005;257-258

Li P, YinY-L, Li D, Kim SW, Wu G. Amino acids and immunity. *Br J Nutr* 2007;98:237-252

Li ZB, Cai WB, Chen XY. Semiconductor quantum dots for in vivo imaging. *J Nanosci Nanotechnol* 2007;8:2567-2581

Liang JG, Ai XP, He ZK, Pang DW. Functionalized CdSe quantum dots as selective silver ion chemodosimeter. *Analyst (Lond)* 2004;129:619-622

Lin W, Yuan L, Tan W, Feng J, Long L. Construction of fluorescent probes via protection/deprotection of functional groups: A ratiometric fluorescent probe for Cu²⁺. *Chem Eur J* 2009;15:1030-1035.

Liu Y, Chen W, Joly AG, Wang Y, Pope C, Zhang Y, Bovin JO, Sherwood P. Comparison of water-soluble CdTe nanoparticles synthesized in air and in nitrogen. *J Phys Chem* 2006;B110:16992-17000.

Liu J, Lu YJ. A DNAzyme catalytic beacon sensor for paramagnetic Cu²⁺ ions in aqueous solution with high sensitivity and selectivity *J Am Chem Soc* 2007;129:9838-9839

Lobo A, Borchert H, Talapin DV, Weller H, Moller T. Surface oxidation of CdTe nanocrystals: a high resolution core level photoelectron spectroscopy study. *Colloids Surf* 2006;A286:1-7

Lovat R, Preiser JC. Antioxidant therapy in intensive care. *Curr Opin Crit Care* 2003;9:266-270

Lu CH, Wang YW, Ye SL, Chen GN, Yang HH. Ultrasensitive detection of Cu²⁺ with the naked eye and application in immunoassays. *NPG Asia Materials* 2012;4:e10

LyonTDB, Fell GS, Hall SDJ, Clark J, McKenna F. Determination of nine inorganic elements in human autopsy tissue. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis* 1989;31:109-118

Ma J, Chen JY, Zhang Y, Wang PN, Guo J, Yang WL, Wang CC. Photochemical instability of thiol-capped CdTe quantum dots in aqueous solution and living cells: process and mechanism. *J Phys Chem B* 2007;111:12012-12016.

Magalova T, Brtkova A, Bederova A, Kajaba I, Puchonova I. Serum copper and zinc in industrial centres in Slovakia. *Biol Trace Elem Res* 1994;40:225-35

Marin S, Merkoçi A. Direct electrochemical stripping detection of cystic-fibrosis-related DNA linked through cadmium sulfide quantum dots. *Nanotechnology* 2009;20:055101

Mason KE. A conspectus of research on copper metabolism and requirements of man. *J Nutr* 1979;109:1979-2066

Mataix José y col. *Nutrición y alimentación humana*. vol I y II. 2007

Mattoussi H, Mauro JM, Goldman ER, Anderson GP, Sundar VC, Mikulec FV, Bawendi M. Self-Assembly of CdSe-ZnS Quantum Dot bioconjugate using an engineered recombinant protein. *J Am Chem Soc* 2000;122:12142-50

Matsuda I, Pearson T, Holtzman NA. Determination of apo-ceruloplasmin by radioimmunoassay in nutritional copper deficiency, Menkes' kinky-hair syndrome, Wilson's disease, and umbilical cord blood. *Pediatr Res* 1974;8:821-4

McVeigh ER. Emerging Imaging Techniques. *Circ Res* 2006;98:879-886

Méallet-Renault R, Hérault A, Vachon JJ, Pansu RB, Amigoni-Gerbierb S, Larpent C. Fluorescent nanoparticles as selective Cu (II) sensors. *Photochem Photobiol Sci* 2006;5:300-310

Medintz IL, Uyeda HT, Goldman ER, Mattoussi H. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. *Nat Mater* 2005;4:435-446

Méndez MA, Araya M, Olivares M, Pizarro F, González M. Sex and ceruloplasmin modulate the response to copper exposure in healthy individuals. *Environ Health Perspect* 2004;112:1654-1657

Metnitz PGH, Bartens C, Fischer M, Fridich P, Steltzer H, Druml W. Antioxidant status in patients with acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med* 1999;25:180-185

Meulenberg RW, Lee JRI, Wolcott A, Zhang JZ, Terminello LJ, van Buuren T. Determination of the Exciton Binding Energy in CdSe Quantum Dots. *ACS Nano* 2009;2:325-30

Michalet X, Pinaud FF, Bentolila LA, Tsay JM, Doose S, Li JJ, Sundaresan G, Wu AM, Gambhir SS, Weiss S. Quantum dots for live cells, in vivo imaging and diagnostics. *Science* 2005;307:538-544

Milne DB: Assessment of copper nutritional status. *Clin Chem* 1994;40:1479-84

Milne DB, Johnson PE. Assessment of copper status: effect of age and gender on reference ranges in healthy adults. *Clin Chem* 1993;39:883-7

Milne DB, Klevay LM, Hunt JR. Effects of ascorbic acid supplements and a diet marginal in copper on indices of copper nutriture in women. *Nutr Res* 1988;8:865-73

Milne DB & Nielsen FH. Effects of a diet low in copper on copper-status indicators in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 1996;63:358-364

Milne DB, Nielsen FH. Effect of high dietary fructose on Cu homeostasis and status indicators in men during Cu deprivation. In: Anke M, Meisner D, Mills CF, eds. *Trace elements in man and animals. TEMA-8*. Gersdorf, Germany: Verlag Media Touristik 1993:370-3

Mishra V, Baines M, Wenstone R, et al. Markers of oxidative damage, antioxidant status, and clinical outcome in critically ill patients. *Ann Clin Biochem* 2005;42:269-276

Motoyama T, Okamoto K, Kukita I, Hamaguchi M, Kinoshita Y, Ogawa H. Possible role of increased oxidant stress in multiple organ failure after systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med* 2003;31:1048-1052

Mulligan VK, Kerman A, Ho S, Chakrabarty A. Denaturational stress induces formation of zinc-deficient monomers of Cu, Zn superoxide dismutase: implications for pathogenesis in amyotrophic lateral sclerosis. *J Mol Biol* 2008;383:424-436

Murray, C. B.; Kagan, C. R.; Bawendi, M. G. *Annu. Rev. Mater. Sci.* 2000, 30, 545-610.

Nielsen FH, Milne DB, Mullen LM, Gallagher SK. Dietary sulfur amino acids, and genetic make-up or interindividual variation affect the response of men to copper depletion. *J Trace Elem Exp Med* 1990;3:281-96

Oakes E, Lyon T, Duncan A, Gray A, Talwar D, O'Reilly D. Acute inflammatory response does not affect erythrocyte concentrations of copper, zinc and selenium. *Clin Nutr* 2008;27:115-120

Okahata S, Nishi Y, Hatano S, Kobayashi Y, Usui T. Changes in erythrocyte superoxide dismutase in a patient with copper deficiency. *Eur J Pediatr* 1980;134:121-4

Pecci L, Montefoschi G, Musci G, Cavallini D. Novel findings on the copper catalysed oxidation of cysteine. *Amino Acids* 1997;13:355-367

Pedraza-Chaverri J, Torres-Rodríguez GA, Cruz C, et al. Copper and zinc metabolism in aminonucleoside-induced nephrotic syndrome. *Nephron* 1994;66:87-92

Pelant I, Valenta J. Luminescence of excitons". In. *Luminescence Spectroscopy of Semiconductors*". Oxford Scholarship Online. DOI: 10.1093/acprof:oso/9780199588336.001.0001 (2012)

Peng ZA, Peng X. Formation of High-Quality CdTe, CdSe, and CdS Nanocrystals Using CdO as Precursor. *J Am Chem Soc* 2001;123:183-184

Petras-Juzenas P, Chen W, Sun YP, Neto-Coelho MA, Generalov R, Generalova N, Christensen IL. Quantum dots and nanoparticles for photodynamic and radiation therapies of cancer. *Adv Drug Deliv Rev* 2008 60:1600-1614

Pickart L, Vasquez-Soltero JM, and Margolina A. The Human Tripeptide GHK-Cu in Prevention of Oxidative Stress and Degenerative Conditions of Aging: Implications for Cognitive Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* Volume 2012, Article ID 324832, 8 pag

Priyam A, Chatterjee A, Bhattacharya SC, Saha A. Surface-functionalized Cadmium chalcogenide nanocrystals: a spectroscopic investigation of growth and photoluminescence. *J Cryst Growth* 2007;304:416-426

Prodan CI, Bottomley SS, Vincent AS, Cowan LD, Meerveld BG, Holland NR, et al. Copper deficiency after gastric surgery: A reason for caution. *Am J Med Sci* 2009;337:256-8

Prohaska JR, Brokate B. The timing of perinatal copper deficiency in mice influences offspring survival. *J Nutr* 2002;132:3142-5

Qu L, Peng X. Control of photoluminescence properties of CdSe nanocrystals in growth. *J Am Chem Soc* 2002;124:2049-2055

Que EL, Domaille DW, Chang CJ. Metals in neurobiology: probing their chemistry and biology with molecular imaging. *Chem Rev* 2008;108:1517-1549

Reiser S, Smith JC Jr, Mertz W, Holbrook JT, Schofield DJ, Powell AS, Canfield WK, Canary JJ, et al. Indices of copper status in humans consuming a typical American diet containing either fructose or starch. *Am J Clin Nutr* 1985;42:242-51

Resch-Genger U, Grabolle M, Cavaliere-Jaricot S, Nitschke R, Nann T. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. *Nature Methods* 2008;5:763-775

Ritz MA, Fraser R, Edwards N, et al. Delayed gastric emptying in ventilated critically ill patients: measurement by ¹³C-octanoic acid breath test. *Crit Care Med* 2001;29:1744-1749

Roland, A.; Patterson, R. A.; David, S. Measurement of copper-binding sites on low density lipoprotein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:594-602

Rossetti R, Nakahara S, Brus LE. Quantum size effects in the redox potentials, resonance Raman spectra, and electronic spectra of CdS crystallites in aqueous solution. *J Chem Phys* 1983;79:1086-1088

Roth E, Manhart N, Wessner B. Assessing the antioxidative status in critically ill patients. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2004;7:161-168

Ruan G, Agrawal A, Smith A, Gao X, Nie. Quantum Dots as Fluorescent Labels for Molecular and Cellular Imaging. *Rev. Fluoresc* 2006;3:181-193

Säbel CE, Neureuther JM, Siemann SA. Spectrophotometric method for the determination of zinc, copper, and cobalt ions in metalloproteins using Zincon. *Anal Biochem* 2010;397:218-226

Sapra S, Sarma DD. Evolution of the electronic structure with size in II-VI semiconductor nanocrystals. *Phys Review* 2004;B69:125304-7

- Sato M, Gitlin JD. Mechanisms of copper incorporation during the biosynthesis of human ceruloplasmin. *J Biol Chem* 1991;266:5128-5134
- Schroeder D, Gillanders L, Mahr K, Hill GL. Effects of immediate postoperative enteral nutrition on body composition, muscle function, and wound ealing. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1986;10:550-554
- Seeger W, Ziegler A, Wolf HRD. Serum alpha-tocopherol levels after high-dose enteral vitamina E administration in patients with acute respiratory failure. *Intensive Care Med* 1987;13:395-400
- Segura-Aguilar J. An new direct method for determining superoxide dismutase activity by measuring hydrogen peroxide formation. *Chem Biol Interact* 1993;86:69-78
- Schlief M, Gitlin J. Copper homeostasis in the CNS. *Mol Neurobiol* 2006;33:81-90
- Sedlak E, Wittung-Stafshede P. Discrete roles of copper ions in chemical unfolding of human ceruloplasmin. *Biochemistry* 2007;46:9638-9644
- Shankar P, Boylan M, Sriram KM.D., Micronutrient deficiencies after bariatric surgery *Nutrition* 26 (2010) 10311037
- Shen, H.; Wang, H.; Chen, X.; Niu, J. Z.; Xu, W.; Li, X. M.: Jiang, X. D.; Du, Z.; Li, L. S. *Chem. Mater.* 2010, 22, 4756-4761.
- Shervedani K, Mozaffari S. Copper (II) nanosensor based on a gold cysteamine self-assembled monolayer functionalized with salicylaldehyde. *Anal Chem* 2006;78:4957-4963
- Shike M, Roulet M, Kurian R & Jeejeebhoy K. Copper metabolism and requirements in total parenteral nutrition. *Gastroenterology* 1981;81:290-297
- Smart LE y Moore EA. *Solid state chemistry. An introduction.* CRC Taylor and Francis 2005;3tr Ed. Boca Ratón. USA
- Smith AM, Nie S. Chemical analysis and cellular imaging with quantum dots. *Analyst* 2004;129:672-677
- Smith AM, Nie S. Next-generation quantum dots. *Nat Biotechnol* 2009;27:732-733
- Solomons NW, Pineda O, Milne DB. Short-term intraindividual variability in plasma trace mineral concentrations. *J Micronutr Anal* 1986;2:55-65
- Solomons NW, Ruz M. Trace element requirements in humans: an update. *J trace Elem Exp Med* 1998;11:177-195
- Spitz DR, Oberley LW. An assay for superoxide dismutase in mammalian tissue homogenates. *Anal Biochem* 1989;179:8-18
- Sutherland AJ. Quantum dots as luminescent probes in biological systems. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci* 2002;6:365-370

Swamy KMK, Ko SK, Kwon SK, Lee HN, Mao C, Kim JM, Lee KH, Kim J, Shin I, Yoon J. Boronic acid-linked fluorescent and colorimetric probes for copper ions. *Chem Commun* 2008;5915-5917

Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. Trace elements in human physiology and pathology. *Copper Biomed Pharmacother* 2003;57:386-98

Therond P, Bonnefont-Rousselot D, Davit-Spraul A, Conti M, Legrand A. Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2000;3:373-384

Turnlund JR, Keen CL, Sakanashi TM, et al. Low dietary copper and the copper status of young men. *FASEB J* 1994;8:A820 (abstr)

Turski ML, Thiele DJL. New roles for copper metabolism in cell proliferation, signaling and disease. *J Biol Chem* 2009;284:717-721

Uriu-Adams JY, Keen CL. Copper, oxidative stress, and human health. *Mol Aspects Med* 2005;26:268-298

Vannoy CH, Tavares AJ, Noor MO, Uddayasankar U, Krull UJ. Biosensing with quantum dots: a microfluidic approach. *Sensors* 2011;11:9732-9763

Viguier RFH, Hulme ANJ. A sensitized europium complex generated by micromolar concentrations of copper (I): toward the detection of copper (I) in biology. *J Am Chem Soc* 2006;128:11370-11371

Wachnik A. The physiological role of copper and the problems of copper nutritional deficiency. *Food* 2006;32:755-765

Wang, Y.; Li, X.; Zhou, Y.; Liu, C. *Int. J. Chem.* 2012, 4, 90-95.

Wang ZP, LiJ, Liu B, Hu JQ, Yao X, Li JH. Chemiluminescence of CdTe nanocrystals induced by direct chemical oxidation and its size-dependent and surfactant-sensitized effect. *J Phys Chem* 2005;B109:23304-23311

Wheeler OR, Salzman JA, Elsayed NM, Omaye ST, Korte DW Jr. Automated assays for superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase activity. *Anal Biochem* 1990;184:193-9

Willis MS, Monaghan SA, Miller ML, McKenna RW, Perkins WD, Levinson BS, Bhushan V, Kroft SH: Zinc-induced copper deficiency: a report of three cases initially recognized on bone marrow examination. *Am J Clin Pathol* 2005;123:125-31

Wu X, Liu H, Liu J, Haley KN, Treadway JA, Larson JP, Ge N, Peale F, Bruchez MP, Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots. *Nat Biotechnol* 2003;21:41-6

Xiang Y, Tong A, Jin P, Ju Y. New fluorescent rhodamine hydrazone chemosensor for Cu (II) with high selectivity and sensitivity. *Org Lett* 2006;8:2863-2866

Yang L; Ren X; Meng X; Li H; Tang F. Optical analysis of lactate dehydrogenase and glucose by CdTe quantum dots and their dual simultaneous detection. *Biosensors and Bioelectronics* 2011;26:3488-3493

Yang LC, McRae R, Henary MM, Patel R, Lai B, Vogt S, Fahrni CJ. Imaging of the intracellular topography of copper with a fluorescent sensor and by synchrotron x-ray fluorescence microscopy. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 2005;102:11179-11184

Yong KT. Mn-doped near-infrared quantum dots as multimodal targeted probes for pancreatic cancer imaging. *Nanotechnology* 2009;20:015102

Yu M, Shi M, Chen Z, Li F, Li X, Gao Y, Xu J, Yang H, Zhou Z, Yi T, Huang C. Highly sensitive and fast responsive fluorescence turn-on chemodosimeter for Cu²⁺ and its application in live cell imaging. *Chem Eur J* 2008;14:6892-6900

Yu WW, Qu L, Guo W, Peng X. Experimental determination of the extinction coefficient of CdTe, CdSe and CdS nanocrystals. *Chem Mater* 2003;15:2854-2860

Yuan J, Guo W, Wang E. Utilizing a CdTe quantum dots-enzyme hybrid system for the determination of both phenolic compounds and hydrogen peroxide. *Anal Chem* 2008;80:1141-1145

Yuan JP, Guo WW, Yin JY, Wang EK. Glutathione-capped CdTe quantum dots for the sensitive detection of glucose. *Talanta* 2009;77:1858-1863

Zanio K. *Semiconductors and Semimetals. Cadmium Telluride.* Academic Press NY USA 1978;Volume 13

Zbronska H, Grezesczak W, Jendryzco A, Zbronski R, Kuzniewicz R. "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 Wewn* 1995;94:228-234

Zeng L, Miller EW, Pralle A, Isacoff EY, Chang CJJ. A selective turn-on fluorescent sensor for imaging copper in living cells. *J Am Chem Soc* 2006;128:10-11

Zhang H, Zhou Z, Yang B, Gao M. The influence of carboxyl groups on the photoluminescence of mercaptocarboxylic acid-stabilized CdTe nanoparticles. *J Phys Chem* 2003;B107:8-13

Zhang JZ. Ultrafast Studies of Electron Dynamics in Semiconductor and Metal Colloidal Nanoparticles: Effects of Size and Surface. *Acc Chem Res* 1997;30:423-429

Zhang X; Liu Z, Ma L, Hossu M, Chen W. Interaction of porphyrins with CdTe quantum dots. *Nanotechnology* 2011;22:195501-9

Zhang Y, Kaji N, Tokeshi M, Baba Y. *Nanobiotechnology: Quantum dots in bioimaging.* *Expert Rev Proteomics* 2007;4:565-572

Zhang YH, Zhang HS, Guo XF, Wang H. L-Cysteine-coated CdSe/CdS core-shell quantum dots as selective fluorescence probe for copper (II) determination. *Microchem J* 2008;89:142-147

Zhao W, Fung YOW, Cheung MP. L-cysteine-capped CdTe quantum dots as a fluorescence probe for setermination of cardiolipin. *Anal Sci* 2010;26:879-84

Zhao Y, Zhang XB, Han ZX, Qiao L, Li CY, Jian LX, Shen GL, Yu RQ. Highly sensitive and selective colorimetric and off-on fluorescent chemosensor for Cu²⁺ in aqueous solution and living cells. *Anal Chem* 2009;81:7022-7030

Zheng R, Cheng W, Wang E, Dong S. Synthesis of tellurium nanorods via spontaneous oxidation of NaHTe at room temperatura. *Chemical Physics Letters* 2004;395:302-305

Zhong W. Nanomaterials in fluorescence-based biosensing. *Anal Bioanal Chem* 2009;394:47-59

Zidar BL, Shaddock RK, Ziegler Z, Winkelstein A. Observations in the anemia and neutropenia of human copper deficiency. *Am J Hematol* 1977;3:177-85

Zrazhevskiy P, Gao X. Multifunctional Quantum Dots for Personalized Medicine. *Nano Today* 2009;4:414-428

Anexos

Anexo 1

HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Para satisfacción de los Derechos del Paciente, como instrumento favorecedor del correcto uso de los Procedimientos Diagnósticos y Terapéuticos, y en cumplimiento de la Ley General de Sanidad.

Yo, D/Dña....., como participante candidato/a (o D./Dña.....DNI....., como su representante), en pleno uso de mis facultades, libre y voluntariamente, EXPONGO:

Que he sido debidamente INFORMADO/A por D./Dña....., en entrevista personal realizada el día/...../....., de que es conveniente que se me efectúe la valoración del estado nutricional. Que he recibido explicaciones tanto verbales como escritas (Anexo), sobre la naturaleza y propósitos del procedimiento, beneficios, riesgos, y medios con que cuenta la UGR para su realización, habiendo tenido ocasión de aclarar las dudas que me han surgido.

MANIFIESTO: Que he entendido y estoy satisfecho de todas las explicaciones y aclaraciones recibidas sobre el proceso médico citado

Y OTORGO MI CONSENTIMIENTO para que me sea realizado La : valoración del estado nutricional,

Entiendo que este consentimiento puede ser revocado por mí en cualquier momento antes de la realización del procedimiento.

Y, para que así conste, firmo el presente documento

Granada, a de de

Firma del paciente y NºD.N.I.

Firma del investigador Informante

(O su representante legal en caso de incapacidad)

En caso de negativa por parte del paciente a firmar el consentimiento. Firma del testigo.

D.N.I.

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA EVALUACIÓN DEL ESTADO NUTRICIONAL

Si usted participa de éste estudio, será sometido a mediciones que permitirán conocer su situación, se evaluará la alimentación que recibe actualmente, valorando la adecuación de la misma.

También se estudiará, dentro de la analítica que se le realizará diariamente, indicadores bioquímicos de minerales para lo que se necesita obtener una cantidad extra de la que se le extraerá rutinariamente.

Éstos procedimientos no suponen ningún riesgo para su estado clínico actual, no se realizará ninguna intervención medicamentosa ni nutricional derivada de éste estudio.

Los resultados obtenidos nos permitirán conocer mejor la situación clínica-nutricional que presenta. Su participación contribuirá enormemente a ampliar los conocimientos científicos que se tienen hasta ahora y posibilitará mejorar la calidad del tratamiento brindado.

Si en algún momento quiere abandonar el estudio, podrá hacerlo libremente y sin perjuicio de tratamiento en el futuro



Universidad de Granada
Vicerrectorado de Investigación
y Tercer Ciclo

**COMISIÓN DE INVESTIGACIÓN
DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA**

La Comisión de Investigación de la Universidad de Granada, en sesión ordinaria de 7 de marzo de 2006, emite informe favorable a la metodología y a la utilización de recursos en la investigación titulada "*Implicaciones de la desnutrición y del estado antioxidante en la evolución del paciente crítico*", a realizar en las instalaciones de la UCI de la Fundación Virgen de las Nieves de la Universidad de Granada por la investigadora D^a. Elena María Planells del Pozo.

Granada a veinte y cuatro de marzo de 2006

EL PRESIDENTE

Fdo.: Rafael Payá Albert



LA SECRETARIA

Fdo.: M^a José Cano Pérez



D. Jesús Martínez Tapias, Presidente del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Virgen de las Nieves

CERTIFICA

Que este Comité ha evaluado la propuesta de la investigadora Dña. Elena Planells del Pozo para que se realice el estudio titulado: "Implicaciones de la desnutrición y del estado antioxidante en la evolución del paciente crítico. Factores asociados" de la Unidad de Nutrición y Dietética y que considera que:

Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.

La capacidad del investigador y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.

Son adecuados tanto el procedimiento para obtener el consentimiento informado como la compensación prevista para los sujetos por daños que pudieran derivarse de su participación en el ensayo.

Y que este Comité acepta que dicho ensayo clínico sea realizado en el Hospital Virgen de las Nieves, en colaboración con la Universidad de Granada por D^a. Elena Planells del Pozo como investigadora principal.

Lo que firmo en Granada a treinta y uno de octubre de dos mil seis.

