



UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE FARMACIA

**DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y
BROMATOLOGÍA**

DOCTORADO EN FARMACIA

**“NIVELES DE Zn, Cu Y Al EN SUERO DE
PACIENTES CON INSUFICIENCIA RENAL
SOMETIDOS A HEMODIALISIS”**

Memoria que presenta
M^a Luisa Reina de la Torre
para optar al grado de Doctor por la
Universidad de Granada.

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: María Luisa Reina de la torre
D.L.: GR 1976-2014
ISBN: 978-84-9083-176-2

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA

El Director del departamento, Dr. Miguel Navarro Alarcón CERTIFICA:

Que el presente trabajo de Investigación que lleva por título “Niveles de Zn, Cu y Al en suero de pacientes con insuficiencia renal sometidos a hemodiálisis”, ha sido desarrollado en el Departamento de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada, por la Licenciada en Farmacia y Máster en Nutrición Humana María Luisa Reina de la Torre.

Dr. Miguel Navarro Alarcón

Granada, 2014

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA

Directores de la Tesis Doctoral

Dra. Herminia López García de la Serrana

Dr. Miguel Navarro Alarcón

**Memoria presentada por la Licenciada en Farmacia
y Máster en Nutrición Humana por la Universidad de Granada,
María Luisa Reina de la Torre.
Aspirante al grado de Doctor.**

Granada, 2014.

AGRADECIMIENTOS

- A mis directores de Tesis, Herminia y Miguel, por su inestimable colaboración y ayuda en la realización de esta Memoria de Tesis Doctoral y por haberme formado a nivel científico durante estos últimos años.
- A la Facultad de Farmacia, en especial al Departamento de Nutrición y Bromatología, por haberme dado la oportunidad de realizar mi Tesis Doctoral y por permitirme completar mi formación académica y volver a mi facultad tras varios años de ejercicio profesional.
- A mis compañeros del Departamento de Nutrición y Bromatología, por su apoyo constante y sus continuas palabras de ánimo durante el periodo de realización de esta tesis.
- Al equipo de médicos y personal del Hospital de Guadix, por su colaboración en todos los trabajos de toma de muestras de los pacientes.
- A mi gran amigo Miguel, que, por encima de haber sido mi orientador y mi principal ayuda en la elaboración de este trabajo, ha demostrado en todo momento ser un excelente amigo.
- A todas aquellas personas que he tenido la oportunidad de conocer en mi ejercicio profesional, especialmente en este último periodo de formación, que me ha permitido sentirme plenamente realizada en la profesión de farmacia.
- A mi familia, en especial a mi marido Antonio, por su gran ayuda y comprensión durante todo el tiempo dedicado a la elaboración de este trabajo.
- A mi hija Enma, a la que, por fin, ya puedo decirle que hemos terminado la tesis.

A los que llenan mi vida:

Mi marido Antonio y mis hijos Luis, Antonio y Enma.

INDICE DE MATERIAS

INDICE DE MATERIAS

1.- INTRODUCCIÓN	17
1.1.- Cinc	19
1.1.1.- El Zn, micronutriente esencial. Fuentes de la dieta, necesidades nutricionales y aportes extra de cinc en nutrición humana	19
1.1.2.- Principales funciones del Zn en el organismo humano en situaciones fisiológicas.	25
1.1.3.- Principales funciones del cinc en situaciones patológicas.	27
1.1.4.- Niveles de Zn en pacientes con insuficiencia renal.	29
1.1.5.- Importancia de la ingesta de cinc en pacientes hemodializados: suplementación de Zn.	30
1.2.- Cobre	33
1.2.1.- El cobre como micronutriente esencial. Estado en la naturaleza. Fuentes de la dieta y necesidades nutricionales.	33
1.2.2.- Localización del Cu en el organismo humano. Funciones en situaciones fisiológicas.	38
1.2.3.- Situaciones patológicas asociadas a bajos niveles de cobre en el organismo.	47
1.2.4.- Situaciones patológicas asociadas a elevados niveles de cobre en el organismo.	50
1.2.5.- Niveles de cobre y balance Cu/Zn en pacientes con insuficiencia renal. Efectos en dichos pacientes de la suplementación de cinc	52
1.3.- Aluminio	57
1.3.1.- El aluminio en la naturaleza. Mecanismos de asimilación de Al.	57
1.3.2.- El aluminio en el organismo humano.	59
1.3.3.- Niveles de aluminio en alimentos y su aporte a la dieta	62
1.3.4.- Principales fuentes de aporte de Al en pacientes con enfermedad renal	

sometidos a hemodiálisis	67
1.3.5.- Situaciones patológicas asociadas a niveles elevados de Al en el organismo.....	71
1.3.6.- Niveles de Al en pacientes con insuficiencia renal y su relación con otros factores.	76
2.- OBJETIVOS	79
3.- PARTE EXPERIMENTAL	85
3.1.- Material	87
3.1.1.- Aparatos y material.	87
3.1.2.- Reactivos y disoluciones.	88
3.1.3.- Muestreo y tratamiento de las muestras	89
3.1.4.- Material informático	91
3.2.- Métodos	92
3.2.1.- Calibración	92
3.2.2.- Preparación de las rectas de calibrado	93
3.2.3.- Aplicación del método de adición de patrón	94
3.2.4.- Fase Preinstrumental	94
3.2.5.- Fase Instrumental	97
3.2.6.- Medida de los parámetros bioquímicos y nutricionales en muestras sanguíneas	105
4.- RESULTADOS Y ESTUDIO ESTADÍSTICO	107
4.1.- Resultados del análisis de las muestras	109
4.2.- Estudio estadístico de las concentraciones de cinc, cobre y aluminio, y de la correlación de Cu/Zn	111
4.2.1.- Análisis estadístico de la varianza para los niveles de Zn, Cu y Al, y de la	

correlación de Cu/Zn de los controles sanos frente a los pacientes con insuficiencia renal sometidos a hemodiálisis 112

4.2.2.- Análisis estadístico de los resultados en muestras de suero de los pacientes en el estudio longitudinal. ... 113

4.2.3.- Análisis estadístico de resultados según el sexo de los pacientes. ... 116

4.2.4.- Análisis estadístico de resultados de los pacientes según hayan o no sido trasplantados o hayan fallecido. ... 117

4.2.5.- Análisis estadístico de resultados de niveles de Zn, Cu y Al en muestras de suero según el grupo de edad de los pacientes. ... 119

4.2.6.- Análisis estadístico de los resultados en el suero de los pacientes según la etiología de la enfermedad. ... 122

4.2.7.- Análisis estadístico de resultados de pacientes según el consumo de distintos medicamentos. ... 125

4.3. Estudio estadístico de los valores obtenidos para los parámetros bioquímicos, hematológicos y nutricionales según los distintos factores considerados. ... 137

4.3.1.- Comparación de resultados de niveles plasmáticos determinados en enfermos frente a controles sanos. ... 137

4.3.2.- Análisis estadístico en muestras de pacientes según el tipo de muestreo en el estudio longitudinal. ... 138

4.3.3.- Análisis estadístico en muestras de pacientes según el sexo. ... 142

4.3.4.- Análisis estadístico en muestras de pacientes según trasplante o deceso. ... 143

4.3.5.- Análisis estadístico en muestras de pacientes según grupo de edad. ... 144

4.3.6.- Análisis estadístico en muestras de pacientes según la etiología de la enfermedad. ... 146

4.3.7.- Análisis en muestras de pacientes según el consumo de medicamentos para control de patologías asociadas y suplementos ... 148

4.4.- Análisis de regresión entre los niveles de los distintos minerales y parámetros bioquímicos analizados en enfermos con insuficiencia renal. 152

5.- DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS157

5.1.- Niveles séricos de Zn. 159

5.1.1.- Análisis comparativo de niveles de Zn en pacientes hemodializados frente a los controles sanos. 159

5.1.2.- Estudio longitudinal de los niveles séricos de Zn en pacientes hemodializados. 159

5.1.3.- Influencia de los factores (sexo, grupo de edad, trasplantes, etiología de la enfermedad y tratamiento farmacológico) en los niveles séricos de Zn. 160

5.2.- Niveles séricos de Cu. 162

5.2.1.- Análisis comparativo de niveles de Cu en pacientes hemodializados frente a los controles sanos. 162

5.2.2.- Estudio longitudinal de los niveles séricos de Cu en pacientes hemodializados. 163

5.2.3.- Influencia de los factores (sexo, grupo de edad, trasplantes, etiología de la enfermedad y tratamiento farmacológico) en los niveles séricos de Cu. 164

5.3.- Correlación de Cu y Zn. 168

5.3.1.- Análisis comparativo de la correlación Cu/Zn en pacientes hemodializados frente a los controles sanos. 168

5.3.2.- Estudio longitudinal de la correlación Cu/Zn en pacientes hemodializados. 169

5.3.3.- Influencia de los factores (sexo, grupo de edad, trasplantes, etiología de la enfermedad y tratamiento farmacológico) en la correlación Cu/Zn. 170

5.4.- Niveles séricos de aluminio 172

5.4.1.- Análisis comparativo de niveles de Al en pacientes hemodializados frente a los controles sanos. 172

5.4.2.- Estudio longitudinal de los niveles séricos de Al en pacientes

hemodializados.	174
5.4.3.- Influencia de los factores (sexo, grupo de edad, trasplantes, etiología de la enfermedad y tratamiento farmacológico) en los niveles séricos de Al. ...	175
5.5.- Valores de los parámetros bioquímicos, nutricionales y hematológicos en pacientes hemodializados.	178
5.5.1.- Análisis comparativo de los parámetros bioquímicos, nutricionales y hematológicos en pacientes hemodializados frente a los controles sanos. ...	178
5.5.2.- Estudio longitudinal de los parámetros bioquímicos, nutricionales y hematológicos en pacientes hemodializados.	180
5.5.3.- Influencia de los factores (sexo, grupo de edad, trasplantes, etiología de la enfermedad y tratamiento farmacológico) en los valores de los parámetros bioquímicos, nutricionales y hematológicos.	182
5.5.4.- Análisis de regresión entre los niveles de los distintos minerales (Zn, Cu, balance Cu/Zn y Al) y parámetros bioquímicos analizados en enfermos con insuficiencia renal. ...	182
6.- CONCLUSIONES FINALES DEL TRABAJO.	183
7.- BIBLIOGRAFIA.	189
8.- ANEXOS.	229

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- CINC

1.1.1.- EL CINC, MICRONUTRIENTE ESENCIAL. FUENTES DE LA DIETA, NECESIDADES NUTRICIONALES Y APORTES EXTRA DE Zn EN NUTRICIÓN HUMANA.

La consideración del cinc como nutriente esencial en la nutrición humana se estableció en el año 1960, al demostrarse que el hipogonadismo observado en los jóvenes Iraníes se debía en parte a deficiencias de cinc (Mataix y Llopis, 2009).

El Zn se considera como un metal poco tóxico (NAS/NRC., 1980), esencial para cientos de procesos biológicos y que tiene que ser administrado con la dieta. No parece que el Zn se acumule en el organismo con la edad y no se conocen anomalías genéticas que den lugar a excesiva acumulación del mismo. Existen unos mecanismos homeostáticos que además regulan estas cantidades en el organismo y cuando se produce una alta ingesta, la absorción se disminuye y se aumenta la excreción.

El Zn es un ión de alta carga, hidrofílico y que no puede atravesar membranas biológicas por difusión pasiva, por lo que existen mecanismos especializados para su captación, transporte intracelular y liberación (Olivares y col., 2010).

La mayoría del Zn es absorbido por el intestino delgado por un proceso transcelular, dándose la mayor velocidad de transporte en el yeyuno. La absorción parece ser un proceso activo saturable que requiere ATP, existiendo un aumento de la velocidad de dicho transporte en la depleción del Zn. Existe también otro tipo de transporte no saturable, probablemente de tipo paracelular, que puede ocurrir con ingestas elevadas de Zn (Olivares y col., 2010).

Desde el intestino, ese mineral es transferido vía portal, unido mayoritariamente a la albumina (70%) y a la α_2 -macroglobulina (20-40%). Existen otras proteínas que son capaces de ligar Zn, como la transferrina y una glicoproteína rica en histidina (Olivares y col., 2010).

El lumen intestinal es el principal sitio al cual se excreta el Zn a través de las secreciones pancreática, intestinal y biliar (Navarro-Alarcón y col., 2010).

El Zn se encuentra altamente distribuido en nuestro organismo, formando parte de gran cantidad de enzimas y otros metabolitos. La cantidad total de Zn en el individuo adulto oscila entre 1,5 y 2,5 g (Calesnick y Dinan 1988; Mataix y Llopis, 2009). No solo se encuentra en órganos, sino también en fluidos y secreciones. Lo encontramos en una proporción del 50-60% en el músculo esquelético, en una proporción del 25-30% en el hueso del individuo adulto y en un 11% en la piel. Lo tenemos también en elevadas cantidades en el hígado y riñón (50-60 $\mu\text{g/g}$), aunque las mayores concentraciones las tenemos en coroides (250-280 $\mu\text{g/g}$) y secreciones prostáticas (300-400 $\mu\text{g/mL}$) (Navarro-Alarcón y col., 2010). La concentración en los tejidos blandos como músculo, cerebro, pulmón y corazón, es relativamente estable e independiente de los niveles en la dieta dentro de un amplio rango. Por el contrario, el contenido de Zn en otros tejidos, especialmente hueso, testículos, cabello y sangre tiende a estar asociado a la ingesta del ion (Mataix y Llopis, 2009).

En los organismos pluricelulares, todo el Zn se encuentra en el interior de la célula, el 40% se encuentra en el núcleo, el 50% en el citoplasma, orgánulos y vesículas especializadas y el resto en la membrana celular (Tapiero y Tew, 2003).

Los niveles séricos de Zn se encuentran próximos a 100 mg/dL. La sangre total contiene aproximadamente diez veces más Zn que el plasma, debido a la presencia del catión en la enzima eritrocitaria anhidrasa carbónica (Mataix y Llopis, 2009).

El cinc es eliminado del cuerpo a través de los riñones, la piel y el intestino. La cantidad que se pierde a nivel intestinal depende de la ingesta y puede variar de 0,5 mg/día a 3 mg/día, mientras que las pérdidas por la orina y el sudor oscilan entre un 0,5 mg/día a 0,7 mg /día y dependen en menor medida de la ingesta (Navarro-Alarcón y col., 2010).

Existen numerosas evidencias de que la deficiencia de cinc es un grave problema en todo el mundo y se producen con mucha asiduidad, tanto a nivel agudo, como a nivel crónico. Fue en 1963 cuando se estudió por primera vez (Hambidge y col., 1979; Prasad, 1991) y, desde entonces, tanto la deficiencia nutricional como la debida a enfermedades crónicas está siendo continuamente investigada.

La deficiencia de origen nutricional se observa en personas que ingieren poca cantidad de proteínas de origen animal (carne de vacuno, ave, pescados, mariscos), o bien en dietas con gran cantidad de proteínas de cereales con altas

cantidades de fitatos (semillas, raíces, leguminosas y tubérculos); estas dietas son frecuentes en personas ovo-lacto vegetarianas (Prasad, 1988; Olivares y col., 2010). También se producen deficiencias debidas a malabsorción en el caso de alcoholismo, anemia de células falciformes, enfermedad renal crónica, etc. Esta deficiencia afecta por igual a hombres y mujeres de todas las edades y es independiente del nivel socioeconómico y cultural.

Henkin y Aamodt (1983) clasificaron la deficiencia de Zn en tres tipos: aguda, crónica y subaguda. La deficiencia aguda es poco común y necesita de alimentación parenteral u oral con l-histidina. La deficiencia crónica se debe a déficit en la ingesta de Zn de forma continuada y, por último, la deficiencia subaguda o latente es la más frecuente y tiene como síntoma inicial la disfunción del gusto y del olfato, síntomas que se recuperan con la administración exógena de cinc, aunque tarda algo de tiempo.

Los síntomas clínicos varían en un amplio espectro que va desde síntomas leves a graves e incluso la muerte si no se reconocen y no se corrigen. Entre los síntomas graves destacamos dermatitis pustulosa bullosa, diarrea, alopecia, trastornos mentales e infecciones recurrentes debidos a trastornos en el sistema inmune (Ribeiro y col., 2004; Bozalioglu y col., 2005; Stefanidou y col., 2006; Olivares y col., 2010a). Los síntomas moderados aparecen con retraso en el crecimiento, cambios en la piel, reducción de las gónadas masculinas, falta de apetito (Sahin y col., 2009; Lobo y col., 2012; Aranha y col., 2012), letargo mental, adaptación a la oscuridad anormal y retraso en la cicatrización. Los síntomas leves son cambios neurosensoriales, oligospermia en varones, disminución de testosterona en suero en hombres, hiperamonemia, disminución de la actividad de la timulina en suero, alteraciones en las subpoblaciones en células T (Prasad, 1988; Bozalioglu y col., 2005) y deterioro de las funciones neuropsicológicas (Penland, 1991). Estas manifestaciones anteriores son corregibles con una suplementación de Zn.

Los requerimientos de Zn propuestos hasta ahora siguen siendo provisionales, ante la ausencia de un marcador que sea sensible y específico para definir grupos de seres humanos con deficiencia de Zn en condiciones clínicas o de poblaciones. Esto determina que haya cierta variabilidad en las sugerencias de requerimientos y las recomendaciones establecidas por diversos organismos internacionales.

Un comité de expertos convocado por la Organización Mundial de la Salud (1996), propuso que las recomendaciones debían basarse en los requerimientos

metabólicos de cada edad, a lo que se agrega un factor dado por la interferencia de los fitatos en su absorción. Los fitatos presentes en cereales y vegetales que componen la dieta, forman complejos insolubles con el Zn a pH alcalino, que además se hacen más insolubles cuando contactan con el calcio (Mills, 1985).

Las recomendaciones están basadas en los límites inferiores de consumo de Zn y se ajustan para dietas de baja, media y alta biodisponibilidad, considerando la de baja biodisponibilidad aquella cuyo contenido en fitatos es mayor a 15 mg/día, la de media de contenido 10-15 mg/día y la de alta, menor a 15 mg/día. Así, las recomendaciones mínimas de consumo de Zn propuestas para dietas infantiles con baja biodisponibilidad son 7,9 mg/día entre 1 y 3 años; 9,2 mg/día entre 3 y 6 años, y 10,7 mg/día entre 6 y 10 años (Navarro-Alarcón y col., 2010).

No obstante, hemos de tener en cuenta que el contenido de Zn de los productos alimenticios es alterado por la cocción y que la biodisponibilidad de Zn depende de otros componentes de la dieta. En consecuencia, la ingesta de Zn sobre la base de los cálculos de las tablas de los alimentos son solo estimaciones.

Tabla1. Contribución de los alimentos a la ingesta dietética de Zn (Sandstead, 1982).

Grupos de alimentos	Contenido de Zn en producto (mg/kg)	Zn consumido /persona/día (mg)	Porcentaje de la dieta
Leche, Queso y Helado	4,3	2,5	20
Carne y Pescado	18,6	5,5	43
Legumbres, Guisantes y Frutos secos	24,7	0,5	4
Huevos	12,7	0,6	5
Verduras de hoja verde	2,8	0,1	1
Frutas cítricas y Tomates	1,8	0,3	2
Patatas	2,4	0,3	2
Otras verduras y Frutas	2,0	0,7	6
Cereales y Pasta	16,3	0,8	7
Harinas	2,8	0,1	1
Pan	7,2	0,6	5
Productos de panadería	6,0	0,4	3
Grasas y Aceites	1,8	0,1	1
Azúcar y Chocolate	0,6	0	0
Total Ingerido		12,5	100

La principal fuente de Zn fácilmente biodisponible en la dieta de los EEUU, es la carne de vacuno (Welsh y Marston, 1982). La segunda fuente más importante es el cerdo (Pekarinen, 1973). Los datos adjuntos sugieren que la carne proporciona casi el 50% del Zn de la dieta media de los EEUU, los productos lácteos proporcionan aproximadamente 20%, los cereales y leguminosas proporcionan el resto.

Una fracción importante de población consume menos cinc de lo recomendado. Los niños en edad de crecimiento, los adolescentes y las madres embarazadas necesitan más cantidad de Zn por Kg que los adultos maduros. Por otro lado se sabe que el Zn es menos disponible a partir de las leches formuladas de vaca, que en leche humana, por eso se complementan las formulas de leche para que aporten 5 mg de Zn diario, suponiendo un consumo de 750 ml de fórmula.

Así, las actuales directrices de Estados Unidos para RDA de Zn las podemos ver en la siguiente tabla:

Tabla 2. Ingesta diaria recomendada de Zn (RDA) (National Research Council (NRC), 1989).

Edad (años)	Lactantes		Niños	Hombres	Mujeres	Embarazadas	Mujeres en lactancia	
	0-0,5	0,5-1	1-10	11-51+	11-51+		1º semestre	2º semestre
Zn RDA (mg)	5	5	10	15	12	15	19	16

Las estimaciones provisionales de los requisitos en Zn en función de la edad y la biodisponibilidad de este, quedan reflejadas en la tabla 3. Aquí distinguimos, por ejemplo, que para varones de más de 18 años los requerimientos diarios son de 2,2 mg, con lo cual si consideramos una dieta con biodisponibilidad del 20% se necesitará una ingesta de 11mg diarios. En revisiones posteriores se ha estimado que la dosis diaria recomendada sea de 15 mg/día (Tapiero y Tew 2003) y el nivel máximo de consumo tolerable de Zn se establezca en 25 mg / día (SCF, 2006).

Tabla 3. Necesidades dietéticas provisionales de Zn en relación con las estimaciones de retención, perdidas y disponibilidad (Sandstead, 1982).

Edad		Retención diaria (mg)	Excreción urinaria (mg)	Excreción glandular (mg)	Necesidades totales (mg)	Cantidad necesaria en la dieta diaria en función a la biodisponibilidad del Zn		
						10%	20%	40%
Lactantes (meses)	0-4	0,35	0,4	0,5	1,25	12,5	6,3	3,1
	5-12	0,2	0,4	0,5	1,1	11,0	5,5	2,8
Hombres (años)	1-10	0,2	0,4	1,0	1,6	16,0	8,0	4,0
	11-17	0,8	0,5	1,5	2,8	28,0	14,0	7,0
	+18	0,2	0,5	1,5	2,2	22,0	11,0	5,5
Mujeres (años)	1-9	0,15	0,4	1,0	1,55	15,5	7,8	3,9
	10-13	0,65	0,5	1,5	2,65	26,5	13,3	6,6
	14-16	0,2	0,5	1,5	2,2	22,0	11,0	5,5
	+17	0,2	0,5	1,5	2,2	22,0	11,0	5,5
Embarazadas (semanas)	0-20	0,55	0,5	1,5	2,55	25,5	12,8	6,4
	20-30	0,9	0,5	1,5	2,9	29,0	14,5	7,3
	30-40	1,0	0,5	1,5	3,0	30,0	15,0	7,5
Mujeres Lactantes		3,45	0,5	1,5	5,45	54,5	27,3	13,7

1.1.2.- PRINCIPALES FUNCIONES DEL ZN EN EL ORGANISMO HUMANO EN SITUACIONES FISIOLÓGICAS.

- El cinc es uno de los oligoelementos más importantes del cuerpo humano y es esencial como ion catalítico, por su función estructural y por su función reguladora (Stefanidou y col. 2006).

Este elemento es un componente estructural de muchas enzimas y proteínas, incluyendo enzimas metabólicas (hidratos de carbono, lípidos y proteínas), factores de transcripción y proteínas de señalización celular. Hay cada vez más pruebas de una función de señalización directa de Zn en todos los niveles de transducción de señales celulares (Beyersmann, 2002; Stefanidou y col, 2006).

Interviene también en los procesos de degradación y síntesis de ácidos nucleicos, en el transporte de dióxido de carbono y en muchas otras reacciones. Así mismo, forma también parte de diferentes deshidrogenasas, actuando en los mecanismos de desintoxicación corporal del alcohol etílico a través de la alcohol deshidrogenasa (Mataix y Llopis, 2009).

El Zn es un oligoelemento esencial para la proliferación y diferenciación celular (Olivares y col., 2010a). Participa en la síntesis hepática de la proteína transportadora de retinal y en el metabolismo de la vitamina A (Mataix y Llopis, 2009).

- A nivel de la membrana celular ejerce dos funciones muy importantes (Bettger y col., 1981; Frederickson, 1989; Mataix y Llopis, 2009):

Por un lado, es un estabilizador de las membranas celulares. Participa en la supresión de radicales libres en células aisladas una vez que se ha iniciado la formación de peróxidos, ya que se requiere junto con el cobre para que la enzima superóxido dismutasa actúe eficazmente eliminando los aniones superóxido (Coyle y col., 2002; Tapiero y Tew, 2003; Stefanidou y col., 2006).

Por otro lado, el Zn puede afectar a la unión de proteínas a las membranas, lo cual se acompaña de una redistribución celular del ion en los microsomas y citosol con incremento de la actividad de la proteinquinasa C. Este papel bioquímico podría explicar muchas funciones fisiológicas del cinc.

Una deficiencia de cinc aumenta los niveles de peroxidación lipídica en las membranas mitocondriales y microsomales, así como la fragilidad osmótica de las membranas de los eritrocitos (Tapiero y Tew, 2003).

- En cuanto a la expresión génica, se sabe que el cinc está involucrado en los procesos de la estabilidad genética y en la expresión de genes de diferentes maneras, incluyendo la estructura de la cromatina, la replicación del ADN y la transcripción de ARN a través de la actividad de factores de transcripción y de ARN y ADN polimerasas, así como jugando un papel en la reparación del ADN y la muerte celular programada (Falchuk, 1998; Stefanidou y col., 2006; Mataix y Llopis, 2009).

La interacción del cinc con proteínas ayuda a explicar otra función importante de este mineral en los sistemas biológicos: la regulación de la síntesis de ADN y ARN (Wu y col., 1987; Berg, 1990; Mocchegiani y Muzzioli, 2000a; Tapiero y Tew, 2003). En coordinación con cisteína e histidina, el cinc confiere al

conjunto una estructura terciaria que tiene afinidad por tramos de ADN en regiones de genes promotores.

La transcripción genética también depende del Zn. Se ha visto que las concentraciones nucleares de Zn reflejan la ingesta dietética.

- El sistema inmune se ve afectado también por los niveles de Zn. Un déficit de Zn eleva los niveles plasmáticos de glucocorticoides y esto puede tener efectos adversos sobre los componentes del sistema inmune. Así, el aumento de corticosterona causa depleción de células B de la médula ósea y atrofia del timo. Como consecuencia de ello, se produce una disminución de la capacidad de respuesta mediada por células y anticuerpos (Goldstein 1984; Mocchegiani y col., 2000; Ribeiro y col., 2003; Bazalioglu y col., 2005; Stefanidou y col., 2006; Mataix y Llopis, 2009; Navarro-Alarcón y col., 2010).

- El Zn es necesario también para la actividad óptima de la hormona de crecimiento (Cunningham y col.1990; Barceloux, 1999; Olivares y col., 2010). Algunos autores intentan explicar esta alteración del crecimiento por la anorexia a que da lugar, ya que la falta de apetito es un síntoma característico de la deficiencia de Zn (Sahin y col., 2003; Mataix y Llopis, 2009; Lobo y col., 2010; Aranha y col., 2012).

- Otra función reconocida del Zn es su participación en el mantenimiento de la integridad de la retina y su actuación a nivel de ceguera nocturna, provocada por la deficiencia de este y que parece deberse a la depleción de las enzimas retinal y retinol deshidrogenasas (Mataix y Llopis, 2009).

1.1.3.- PRINCIPALES FUNCIONES DEL ZN EN SITUACIONES PATOLÓGICAS.

Las situaciones patológicas de mayor relevancia en relación a este trabajo y que más pueden interesar son aquellas que nos dan lugar a un déficit de Zn en el organismo.

Las funciones que están claramente asociadas a la deficiencia de Zn son el crecimiento, la inmunidad y la cicatrización. A esto podemos asociar su posible participación en el desarrollo psicomotor y comportamiento, así como en la regulación de la composición corporal y del apetito (Barceloux, 1999; Mocchegiani y col., 2000; Navarro-Alarcón y col., 2010; Olivares y col., 2010; Lobo y col., 2011; Aranha y col., 2012).

Son varios los pasos del crecimiento y la multiplicación celular en los que está involucrado el Zn. Este mineral es indispensable en sistemas enzimáticos que participan en la división celular y la multiplicación. Sin embargo, el paso limitante que puede explicar el efecto sobre el crecimiento parece estar en la regulación hormonal de la división celular, ya que este mineral es necesario para la actividad de la hormona de crecimiento y la prolactina (Cuninham y col., 1990; Olivares y col., 2010).

Aunque forma parte de la estructura de la insulina, no hay evidencias claras que muestren una alteración de esta hormona ante una deficiencia nutricional de Zn. Además, desempeña un papel importante en la regulación de las señales de membrana celular posreceptor (Navarro-Alarcón y col., 2010; Olivares y col., 2010).

El Zn se considera crucial para la respuesta inmune. Las alteraciones de la inmunidad también están asociadas al proceso activo de división y multiplicación celular requerido para la defensa del huésped ante un agente microbiológico externo. También tienen que ver con la autoprotección de las células inmunitarias de la producción de radicales libres necesarios para su capacidad bactericida. La deficiencia de Zn contribuye a la apoptosis de precursores y células B inmaduras en la médula ósea y de precursores de linfocitos T en el timo (Goldstein, 1984; Mocchegiani y col., 2000; Tapiero y col., 2003; Bozalioglu y col., 2005; Navarro-Alarcón y col., 2010).

Durante el envejecimiento, el Zn tiene tendencia a unirse a proteínas tales como metalotioneínas, desplazando incluso al cobre de su unión a estas e impidiendo la liberación del cinc. Este hecho es debido a un estrés persistente en este periodo que provoca un secuestro intracelular de este elemento, con la consiguiente baja biodisponibilidad de estos iones para la eficiencia inmune y para la actividad de las enzimas y proteínas dependientes de Zn (Mocchegiani y col., 2000, 2002). Por esto se considera necesario en esta etapa de la vida el aporte de Zn (Lesourd, 1997; Fortes y col., 1998; Stefanidou y col., 2006).

En la mayoría de las especies animales, la deficiencia de Zn se acompaña de una disminución del consumo de alimentos, ya que el Zn participa en la liberación de neurotransmisores en el hipotálamo, necesarios para la activación de la señal de apetito (Lobo y col., 2011; Aranha y col., 2012).

Hay algunas evidencias que nos demuestran que la deficiencia nutricional de Zn favorece modificaciones en la composición corporal, con un mayor depósito de tejido adiposo en vez de masa grasa (Lobo y col., 2011).

1.1.4.- NIVELES DE ZN EN PACIENTES CON INSUFICIENCIA RENAL.

Los pacientes con enfermedades renales graves, sometidos a largos tratamientos de diálisis, tienen una elevada morbilidad y mortalidad; ello se debe en parte a complicaciones médicas, estrés oxidativo, infecciones, inflamaciones y a una respuesta inmune alterada. Parece ser que parte de esas complicaciones pueden deberse a la alteración que la diálisis produce en la homeostasis de determinados micronutrientes, ya que estos juegan un papel muy importante en el mantenimiento de la actividad antioxidante, la función inmune y la mejora de los procesos inflamatorios.

Los pacientes con enfermedades renales en etapa terminal (ESRD) que se someten a hemodiálisis a largo plazo, pueden desarrollar enfermedades cardiovasculares (Bevc y col., 2006), anemia, desnutrición proteico-calórica, infecciones, alteración de la función inmune, osteodistrofia y trastornos de la piel (Himmelfarb, 2005).

Se sabe que los pacientes sometidos a diálisis tienen estrés oxidativo e inflamación, ya que tienen significativamente más altas las concentraciones plasmáticas de productos de peroxidación de lípidos como las sustancias reactivas del ácido barbitúrico (TBARS), malondialdehído (MDA) (Guo y col., 2010; Kirmizis y col., 2010), productos de oxidación de proteínas (AOPP) (Taki y col., 2006; Chen y col., 2011), y productos de oxidación de ADN (8-hydroxydeoxyguanosina, 8-OHdG) (Morishita y col., 2011).

La inflamación crónica en estos pacientes se caracteriza por concentraciones elevadas de los marcadores inflamatorios y citoquinas, como la proteína C-reactiva (PCR), interleuquina-1 β (IL-1 β), IL-2, IL-6 y factor de necrosis tumoral α (TNF- α) (Guo y col. 2010; Kirmizis y col., 2010). Las citoquinas son también importantes mediadores implicados en las enfermedades inflamatorias sistémicas.

El estrés oxidativo está estrechamente relacionado con el estado inflamatorio, y el mantenimiento del equilibrio redox regula la homeostasis del sistema inmune en pacientes en hemodiálisis.

La inflamación crónica puede inducir un aumento de la producción de radicales libres que no pueden ser contrarrestados por los defectos en la capacidad antioxidante (Stefanidou y col., 2006). El estrés oxidativo se produce en sitios de inflamación activa y como una parte de la reacción a microorganismos invasivos (Nihi y col., 2010).

El aumento del estrés oxidativo también está marcadamente relacionado con la retención de solutos oxidados, el dializador de membrana, los contaminantes bacterianos en la disfunción del líquido de diálisis, así como con la disminución de los niveles de enzimas antioxidantes, incluyendo la superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa (GPx) (Dursun y col., 2002; Tapiero y Tew, 2003; Ward y McLeish., 2003; Himmelfarb, 2008).

El estrés oxidativo se encuentra también implicado en otras complicaciones a largo plazo, incluyendo la anemia, amiloidosis, la desnutrición y la infección (Mocchegiani y col., 2001; Morena y col., 2005; Sahin y col., 2008). La infección puede agravar las carencias de micronutrientes por reducción de la ingesta de estos, por un aumento de las pérdidas y por interferir en su utilización, ya que se alteran ciertas rutas metabólicas (Coyle y col., 2002; Maggini y col., 2007). El mal estado nutricional surge debido al aumento del estrés oxidativo, y este último puede estar relacionado con alteraciones en la homeostasis de los micronutrientes en pacientes en hemodiálisis. En general, este bajo nivel de micronutrientes puede promover el estrés oxidativo y la respuesta inflamatoria puede conducir a la supresión de la inmunidad, lo que predispone a las infecciones y agrava la desnutrición.

1.1.5.- IMPORTANCIA DE LA INGESTA DE ZN EN PACIENTES HEMODIALIZADOS: SUPLEMENTACIÓN DE ZN.

La diálisis es un método de depuración sanguínea extrarenal. Consiste en infundir en la cavidad peritoneal un líquido dializante de composición similar al líquido extracelular. Por gradiente osmótico se produce la difusión y osmosis de tóxicos y electrolitos desde la sangre al líquido introducido. El dializado se crea mediante la adición de cantidades reguladas de iones biológicamente esenciales, como sodio, bicarbonato, potasio y calcio; sin embargo los elementos traza no son introducidos. Los elementos que tienen concentraciones más bajas en el dializado que en la sangre tienden a ser eliminados por el líquido de diálisis. Aunque esto es apropiado en el caso de toxinas urémicas, puede conducir al agotamiento de

las sustancias biológicamente esenciales. Parte de los micronutrientes son eliminados del plasma por este proceso. En hemodiálisis se produce peroxidación lipídica y desregulación del metabolismo corporal, alterándose los micronutrientes del organismo.

Por todo esto, debemos asegurar la ingesta adecuada de micronutrientes, para mantener un buen estado nutricional en estas situaciones.

Los pacientes con enfermedades renales graves tienen unas dietas con restricción de proteínas, tomando poca cantidad de carnes, pescados y mariscos; ello les lleva a tener deficiencia de elementos traza como el hierro o el cinc (Gilmour y col., 1998). Aunque algunos investigadores recomiendan suplementos de vitaminas y minerales para los pacientes en diálisis (Kopple y col., 1981; Blumberg y col., 1983; Mydlik y col., 1985; Gentil y col., 1988), la actual dieta de estos pacientes es una gran desconocida.

La única manera de mantener los niveles de cinc apropiados de forma continua durante los tratamientos de diálisis prolongados, es suministrar suplementos de dicho mineral.

Hay que tener en cuenta que la mayoría de suplementos existentes en el mercado, están compuestos por gran cantidad de vitaminas y minerales, que pueden interferir la absorción del cinc y pueden aportar algunos elementos no necesarios. Por eso, la suplementación en pacientes sometidos a diálisis debería de hacerse específica para ellos, teniendo en cuenta sus necesidades y ajustada en cada paciente. Esta recomendación nutricional está todavía en proceso de desarrollo.

1.2.- COBRE

1.2.1.- EL COBRE COMO MICRONUTRIENTE ESENCIAL. ESTADO EN LA NATURALEZA. FUENTES DE LA DIETA Y NECESIDADES NUTRICIONALES.

El nombre del cobre deriva del latín Cuprum, que proviene de Cyprum, nombre que recibe la isla de Chipre. Es un elemento que presenta tres estados de oxidación: Cu^0 (Cu metálico), Cu^{1+} y Cu^{2+} . En los sistemas biológicos, el cobre se encuentra predominantemente como Cu^{2+} . El ión Cu^{1+} es inestable, siendo fácilmente oxidado a ión Cu^{2+} .

Como metal, el cobre es el tercero más usado del mundo detrás del Hierro y el Aluminio. Es uno de los pocos metales que puede encontrarse en la naturaleza en estado nativo, es decir, sin combinarse con otros elementos. Se han encontrado utensilios de cobre nativo del año 7000 a.C. procedentes de la zona conocida actualmente como Turquía e Irak. Tiene una enorme aplicación industrial por sus propiedades de conductividad eléctrica, ductilidad y maleabilidad y así se ha convertido en el material más utilizado para fabricar cables eléctricos y otros componentes eléctricos y electrónicos. También tiene un gran uso formando parte de diversas aleaciones como el latón (Cu-Zn), bronce (Cu-Sn), alpaca (Cu-Ni-Zn), etc.

El cobre no metálico posee también numerosas aplicaciones. El sulfato de cobre (II) es el compuesto de cobre de mayor importancia industrial empleándose como abono y pesticida en agricultura, alguicida en la depuración de las aguas y como conservante de la madera.

Como consecuencia de la producción intensiva de alimentos para abastecer a una población en rápido crecimiento, se están administrando nutrientes adicionales a plantas y animales. De esta forma este mineral, al igual que le ocurre al Zn, queda difundido en el medio ambiente y puede ser absorbido y acumulado por los productos agrícolas a través de la aplicación de fertilizantes o suplementos (Almas y Singh, 2001; Zhou y col., 2005; Nookabkaewa y col., 2013). La aplicación de dichos fertilizantes, abonos comerciales y lodos de aguas residuales, así como la contaminación de la minería y la industria, hacen que los productos alimenticios y las aguas tanto de consumo como las usadas para riego

de cultivos tengan una concentración mayor de dicho elemento (Gimeno-García y col., 1996; Mazej y col., 2010; Pritchard y col., 2010; Nookabkaewa y col., 2013).

El Cobre se encuentra normalmente en el suelo y es absorbido por las raíces de las plantas (Marschner, 1995; White, 2003). En dicho suelo, se puede encontrar como ion libre o formando parte de la estructura de minerales y organismos. La disponibilidad de este mineral está condicionada por unas determinadas propiedades del suelo como son el pH, las condiciones redox, la capacidad de intercambio catiónico, la actividad de determinados microorganismos, la estructura del suelo, así como la cantidad de materia orgánica y contenido en agua de dicho suelo (Shuman, 1998; Frossard y col., 2000). De hecho, aunque hay altas concentraciones de Cu en muchos suelos, la utilización de estos elementos minerales, a menudo está restringida por las propiedades del suelo, y han de usarse estrategias genéticas y agrícolas para su utilización efectiva (White y col., 2009).

Se sabe que algunos oligoelementos como el litio (Li), cromo (Cr), manganeso (Mn), cobalto (Co), níquel (Ni), cobre (Cu), cinc (Zn), selenio (Se) y molibdeno (Mo) son micronutrientes esenciales que deben consumirse en adecuadas cantidades para mantener las funciones fisiológicas normales (Goldhaber, 2003). Todos estos elementos traza pueden ser tóxicos cuando se toma en cantidades excesivas, o pueden llevar a deficiencias cuando se toman en cantidades insuficientes (Noël y col., 2012). La deficiencia se define como "una anormal condición fisiológica resultante de la ingestión inadecuada de un nutriente..." (Institute of Medicine, Dietary Reference Intakes, 2000; Klevay, 2011). Según el libro de texto de medicina de Oxford, tomar baja cantidad de nutrientes puede reducir las concentraciones de los mismos en los tejidos y comprometer determinadas vías metabólicas (Golden, 1996; Klevay, 2011).

El cobre puede ser aportado al organismo por las tuberías de agua (en muchos países siguen existiendo hogares con tuberías de cobre que pueden ser una porción importante del cobre ingerido) (National Research Council, 2000), por la contaminación del agua dulce (rara vez existen niveles elevados de Cu en las aguas, pues hay un gran control sobre ellas) (Lonnerdal, 1998; Lopez de Romaña y col., 2011) o a través de la alimentación. El valor de referencia para el cobre en agua para consumo humano es de 2 mg/L (Directivas OMS (World Health Organization, 2008).

La dieta es la fuente principal de la mayoría de oligoelementos, en concreto del cobre. Este puede ingresar en los alimentos a través de la contaminación del

medio ambiente, a través de los cultivos debido a la aplicación de pesticidas en las granjas de algunos países, y también a través del procesamiento de los alimentos (Pennington y Calloway, 1973; Onianwa y col., 2001; Harvey y col., 2005; Bilandzic y col., 2012).

El desarrollo económico en España durante las últimas décadas, ha favorecido la aparición de cambios sociales, culturales y alimentarios en este país. La influencia de los medios de comunicación, turismo y comercio internacional ha conducido a la aparición de la nueva dieta, que se caracteriza por una disminución en el consumo de productos de grano, verduras y legumbres y un aumento en el consumo de carne, frutas y productos lácteos (Serra-Manjem y col., 1995; Sánchez y col., 2010). En términos generales, nuestra población, actualmente se caracteriza por presentar un bajo consumo de energía, con un alto consumo de proteínas (16% de la oferta total de energía) y grasa (39% de suministro de energía). El consumo de hidratos de carbono ha quedado disminuido, proporcionando sólo un 41% de la fuente de energía (Sánchez y col., 2010).

Se sabe que el cobre en la dieta occidental ha disminuido al menos desde la década de 1930; la mitad de la población adulta consume menos de la cantidad recomendada en las comunidades europeas y el Reino Unido (Klevay, 2011). No se sabe si esto se debe a dietas inusualmente bajas o a altos requerimientos por el organismo humano. Para afirmar esto, algunos autores se han basado en las bajas concentraciones de cobre en los fluidos del cuerpo, en la baja actividad de enzimas dependientes de cobre y en los beneficiosos efectos que los suplementos han proporcionado a algunos pacientes (Klevay, 2011). En nuestra área geográfica (Andalucía), se ha descrito también este descenso en la ingesta (Planells y col., 2003; Sánchez y col., 2010) y se piensa que es debido a una reducción del consumo de cereales, frutos secos y legumbres (Mataix y Llopis, 2009).

Las necesidades de cobre recomendadas en adultos son difíciles de establecer pues los datos de necesidades fisiológicas y biodisponibilidad son imprecisos. Generalmente son de 1 mg/ día (Marsh y Riley, 1998; Crisponi y col., 2010), con un nivel máximo tolerable de 10mg/día (RDA).

La cantidad recomendada de cobre en la infancia (RDA) es de 80µg por kg / día (Griscon y Craigh, 1971; Crisponi y col., 2010).

Debemos hacer una mención especial a la etapa de la pubertad, donde los requerimientos de Cu, al igual que ocurría para el Zn, se ven aumentados por las necesidades fisiológicas tan particulares de este periodo. Durante la adolescencia se produce un gran crecimiento y desarrollo del organismo, y es justo en este intervalo donde la alimentación se encuentra más alterada. El consumo de productos de panadería, comidas rápidas, fritos y alimentos precocinados, caracterizan los hábitos alimenticios de estas edades (Guthrie, Lin, y Frazao, 2002; Libuda y col., 2008; Mesias y col., 2012). Por este motivo, en esta etapa se necesitan apoyos nutricionales para evitar la carencia de estos minerales.

Las recomendaciones más recientes son las publicadas en 2001 por el instituto de Medicina de Estados Unidos (IOM, 2001) (Tabla 4).

Tabla 4. Ingesta recomendada de Cu e ingesta superior tolerable diaria en función de la edad y el sexo.

Edad	Ingesta recomendada	Ingesta diaria superior tolerable
Lactante 0 - 6 meses	200 µg/día	
Lactante 7 - 12 meses	220 µg/día	
Niños 1 - 3 años	340 µg/día	1000 µg/día
Niños 4 - 8 años	440 µg/día	3000 µg/día
Niños 9 - 13 años	700 µg/día	5000 µg/día
Niños 14 - 18 años	890 µg/día	8000 µg/día
Mayores de 18 años	900 µg/día	10000 µg/día
Mujer embarazada	1000 µg/día	
Nodriza	1300 µg/día	

Hay diferentes factores a tener en cuenta en la concentración de cobre de los alimentos, como son la ubicación geográfica de los cultivos y de la crianza de los animales, la temporada del año (la concentración de cobre es mayor en las porciones de vegetales más verdes), la calidad del suelo y el uso de fertilizantes o pesticidas (Pennington Calloway, 1973; Harvey y col., 2005; López de Romaña y col., 2011).

Noel y col., (2012) han publicado los niveles de Cu en los diferentes alimentos tal y como se consumen expresados en mg/Kg de producto (Tabla 5).

Tabla 5. Niveles de Cu en los alimentos tal y como son consumidos.

Grupos de alimentos	Grupos productos	Media mg/Kg	Mínimo mg/Kg	Máximo mg/Kg
Cereales y productos de cereales	Pastelería	1.09	0.43	2.45
	Pan	1.34	0.88	2.34
	Cereales para desayuno	0.72	0.30	1.17
	Pasta	2.19	1.02	4.18
	Arroz y sémola	1.71	0.72	2.87
	Bollos, panes y repostería vienesa	1.09	0.66	1.78
	Galletas	1.91	0.33	3.03
	Total	1.46	0.30	4.18
Aperitivos y platos cocinados	Platos cocinados	1.10	0.45	2.77
	Sándwiches	0.89	0.59	1.23
	Postres	0.71	0.01	2.99
	Pizas, quiches y tartas saladas	0.69	0.36	1.06
	Total	0.95	0.01	2.99
Productos Lácteos	Leche	0.09	0.04	0.53
	Productos lácteos frescos	0.11	0.05	0.36
	Queso	0.49	0.22	1.45
	Total	0.15	0.04	1.45
Bebidas	Bebidas alcohólicas	0.12	0.04	0.48
	Café	1.89	0.05	5.34
	Bebidas calientes	0.76	0.07	1.30
	Agua	0.10	0.01	0.65
	Bebidas sin alcohol	0.21	0.01	1.13
	Total	0.64	0.01	5.34
Huevos y ovoproductos	Huevos y ovoproductos	0.73	0.45	1.69
Tofú	Tofú	2.32	2.23	2.41
Grasas y aceites	Mantequilla	0.19	0.05	0.47
	Margarina	0.08	0.04	0.14
	Aceite	0.04	0.02	0.07
	Total	0.10	0.02	0.47
Pescado y productos del mar	Pescado	0.69	0.22	8.56
	Marisco	6.13	0.39	17.0
	Total	3.11	0.22	17.0
Frutas y hortalizas	Nueces	6.63	2.40	11.7
	Frutas	0.65	0.22	2.13
	Productos con patata	0.85	0.39	1.55
	Hortalizas	0.67	0.11	2.11
	Compotas de frutas	0.51	0.34	0.94
	Vegetales secos y semillas oleaginosas	2.50	1.90	3.21
	Total	0.82	0.11	11.7
Helados	Helados	1.68	4.87	4.92
Carnes y menudencias	Delicatesen	1.42	0.24	71.9
	Carnes	0.80	0.24	4.51
	Menudencias	113	58.4	211
	Aves de corral	0.86	0.35	3.99
	Total	9.45	0.32	211
Sales, especias, sopas y salsas	Sopas	0.57	0.14	1.12
	Condimentos y salsas	0.61	0.09	1.09
	Total	0.58	0.09	1.12
Edulcorantes, miel y confitería	Chocolate	6.43	1.80	17.9
	Azúcar y productos a base de azúcar	0.27	0.01	0.61
	Total	3.69	0.01	17.9

En esta tabla cabe resaltar las concentraciones de Cu presentes en el grupo de carnes y menudencias con una media de 9,45mg/Kg, destacando especialmente los niveles existentes en las menudencias (con una media de 113mg/Kg) representadas por 16 muestras de hígado con niveles de cobre entre 58,4mg/Kg y 211mg/Kg, superando muy por encima la concentración media de cobre en el resto de alimentos. También un grupo importante en cuanto a aporte de Cu son los edulcorantes, miel y productos de confitería, donde destacamos el chocolate (6,25mg/Kg). En el grupo de los pescados y productos del mar, podemos destacar las cantidades de cobre presentes en el marisco (6,13mg/Kg). Además, podemos mencionar como alimentos ricos en Cu el grupo de frutos secos y semillas oleaginosas (2,45mg/Kg), así como el Tofú (2,32mg/Kg).

Así pues, las fuentes alimenticias de cobre más directas son el chocolate negro, el hígado animal, crustáceos, mariscos, vegetales verdes, frutos secos y nueces (Food Standards Agency, 2002; Harvey y col., 2005; Leblanc y col., 2005; Lopez de Romaña y col., 2011; Noël y col., 2012; Mesias y col., 2012), siendo mucho más biodisponible el cobre procedente de la carne que el presente en las verduras. Las concentraciones de cobre entre los productos cárnicos son muy diferentes (Lombardi-Boccia y col., 2003; Ferreira y col., 2005; LeBlanc y col., 2005; Demirezen y Uruc, 2006; Guérin y col., 2011; Noël y col., 2012).

De esta forma podemos afirmar como los alimentos con más altos niveles de cobre son los de alto contenido en proteínas. Otro alimento a tener en cuenta, especialmente en algunos países donde su consumo es elevado, son los frijoles (Ferreira y col., 2005). El contenido de cobre en muestras crudas de frijoles y trigo integral fueron 0.44–1.04 mg/100 g. En las muestras de habas, el contenido de cobre varió de 0.08 a 0,85 mg/100 g de producto crudo.

1.2.2.- LOCALIZACIÓN DEL CU EN EL ORGANISMO HUMANO Y FUNCIONES EN SITUACIONES FISIOLÓGICAS.

El cobre es un elemento traza esencial para el ser humano. Es indispensable para la actividad de numerosas enzimas y funciones corporales. Se encarga también de regular la expresión de múltiples genes (Olivares y col., 2010).

El Cobre es además un oligoelemento esencial para la vida de las plantas. Este mineral juega un importante papel en el proceso de la fotosíntesis formando

parte de la composición de la plastocianina. Alrededor del 70% del cobre de una planta está presente en la clorofila, principalmente en los cloroplastos.

A nivel del ser humano, el cobre se encuentra en cantidades relativamente altas: Un adulto sano de 70 kg contiene unos 110mg de cobre, la mayor parte (46 mg) en esqueleto y médula ósea, 26mg en los músculos esqueléticos, 10mg en hígado, 8,8 mg en cerebro, 6mg en sangre y 3mg al riñón (Hasan y col., 1995; Franchitto y col., 2008; Crisponi y col., 2010; Olivares y col., 2010). En el organismo, el cobre tiene numerosas funciones. Así, este mineral es necesario para el crecimiento, los mecanismos de defensa inmunitaria, la mineralización ósea, la maduración de glóbulos rojos y blancos, el transporte de hierro, el desarrollo fetal, el metabolismo del colesterol, la contractibilidad del miocardio, el metabolismo de la glucosa y el desarrollo cerebral (Olivares y col., 2010).

El cobre es un nutriente mineral esencial que participa en el metabolismo celular y funciona como un cofactor para muchas enzimas (cuproenzimas), un elemento estructural integrado de varias proteínas no enzimáticas y un agente regulador (Tapiero y col., 2003; Ikee y col., 2012).

Los oligoelementos, como el cobre, son micronutrientes imprescindibles para una gran variedad de funciones bioquímicas en los organismos (Bilandzic y col., 2012).

El Cobre es necesario en la dieta en cantidades suficientes, debido a su papel importante en la promoción de la salud y la reproducción, la utilización de hierro, las reacciones de oxidación-reducción y como un cofactor de enzimas implicadas en el metabolismo de la glucosa y la síntesis de hemoglobina, tejido conectivo y fosfolípidos (Ward y Spears, 1997; Salgueiro y col., 2000; Nardi y col., 2009; Crisponi y col., 2010; Bilandzic y col., 2012).

El Cobre tiene una importante función como pro-oxidante. Es un metal de transición caracterizado por un bajo potencial redox entre Cu(II) y Cu(I) (0.158V en agua), teniendo en cuenta su capacidad para el intercambio de electrones con otros compuestos químicos (Weast, 1970). La utilidad biológica del cobre deriva principalmente de esta aptitud para desplazarse entre sus formas oxidadas y reducidas (Crisponi y col., 2010).

Los efectos de determinados metales que se caracterizan por estados de oxidación variable, como el caso del cobre, dependen notablemente de la forma predominante del metal, y esta a su vez depende de los potenciales redox (Crisponi y Remelli, 2008). Por esta razón, el cobre es utilizado por un gran

número de enzimas, probablemente más de 300 en los seres humanos, normalmente involucradas en reacciones oxidativas (Crisponi y col., 2010).

El estado redox de cobre es una de las variables críticas que afectan a las vías de transporte de iones. La absorción de cobre y sus efectos oxidativos intracelulares son causados principalmente por el ion cúprico, mientras que los efectos sobre el transporte a nivel de membrana son en gran parte debido al ion cuproso, formado probablemente en la superficie de la membrana, donde los grupos sulfhidrilo actúan como agentes reductores (Crichton, 2008).

Los iones de cobre son componentes integrados en la estructura de algunas proteínas involucradas en actividades catalíticas y cruciales para las funciones reguladoras. A pesar de que el contenido promedio de cobre en el cuerpo humano es de 100 mg, prácticamente no hay cobre libre en la célula (Rae y col., 1999). Este se encuentra unido a varias proteínas como la citocromo c oxidasa (CcO), superóxido dismutasa de cobre y cinc (Cu, Zn-SOD), dopamina β -hidroxilasa (DBH), prión proteína (PrP), tirosinasa, X-ligado inhibidor de la proteína de la apoptosis (XIAP), lisil oxidasa, metalotioneína (MT), ceruloplasmina y algunas otras. Estas uniones permiten al cobre ejercer su gran papel en los organismos vivos tanto en microorganismos, como en plantas, como en seres humanos (Kim y col., 2008; Ding y col., 2011).

En los sistemas biológicos, los iones de cobre existen generalmente en dos estados de oxidación: cuproso -Cu(I)- reducido y cúprico -Cu(II)- oxidado. Esta actividad redox se ha utilizado para la catálisis por un gran número de enzimas (Uauy y col., 1998). Las proteínas aprovechan la naturaleza redox del cobre para lograr reacciones de transferencia y ganancia fácil de electrones (Uauy y col., 1998; Ding y col., 2011).

Sin embargo, las propiedades químicas que hacen al cobre biológicamente útil lo hacen también potencialmente tóxico.

Las reacciones redox en las que interviene el cobre se generan radicales hidroxilo que son potencialmente dañinos para los lípidos, proteínas y ADN (Halliwell y Gutteridge, 1984; Ding y col., 2011).

Por otra parte, el desequilibrio de la homeostasis del cobre en los seres humanos provoca graves problemas de salud, incluyendo síntomas neurodegenerativos (Waggoner y col., 1999; Cerpa y col., 2005), defectos estructurales y funcionales a nivel cardiovascular (Nath, 1997; Klevay, 2000), trastornos del metabolismo óseo (Strause y col., 1986; Eaton-Evans y col., 1996),

enfermedades de la musculatura (Wonk y Klomp, 2008; Rayman y Pattison, 2008) y desregulación de la respuesta inflamatoria (Brewer, 2005; Rayman y Pattison, 2008).

Para solventar este problema y hacer menos reactivo al cobre, se tiende a administrar quelatos con los que el cobre forme complejos como tioéteres, nitrilos, cianuro e yoduro (Uauy y col., 1998). El objetivo es eliminar el exceso de cobre de los órganos. Sin embargo, un factor importante que no ha recibido una atención suficiente, es el hecho de la ausencia de cobre libre en células de mamíferos (Rae y col., 1999). La eliminación de Cu(I) así como Cu(II) del organismo conduce a consecuencias que no han sido completamente analizadas o entendidas.

La afinidad del cobre para algunas proteínas es variable. Así se insinúa la posibilidad de que un quelato puede privar de cobre a una proteína y transferirlo a otra proteína. Esto nos lleva a alteraciones intracelulares en cobre así como en el transporte y en el tráfico entre órganos. De esta forma los quelantes de cobre (Uauy y col., 1998) pueden cambiar el equilibrio entre Cu(I) y Cu(II) en organismos, y esto puede o no estar asociado con cambios en las concentraciones totales de cobre (Rae y col., 1999; Ding y col., 2011).

Los mecanismos bioquímicos y celulares por los que el cobre se almacena, pudiendo inducir daño celular y necrosis de las células, todavía están siendo discutidos (Seymour y col., 1987; Crisponi y col., 2010). Se presume que un exceso de cobre podría desencadenar daño celular por peroxidación y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Farinati y col., 2003). De hecho, el estrés oxidativo es citado a menudo como posible causa de daño en las células expuestas a altas concentraciones de cobre (Crisponi y col., 2010).

El cobre es esencial para la reproducción, regulación de la expresión génica, y para el crecimiento normal y desarrollo (Linder, 1991). El interés por el metabolismo del cobre en los seres humanos ya era importante desde finales de los años veinte, cuando fue revelado su papel en la síntesis de la hemoglobina (Hart y col., 1928).

En cuanto a la biodisponibilidad de cobre vemos que esta depende de tres factores principales: la absorción a nivel del tracto gastrointestinal, el transporte en sangre y la extracción de los hepatocitos del torrente sanguíneo (Crisponi y col., 2010).

Una variedad de factores puede alterar la biodisponibilidad de cobre. Entre ellos tenemos: el envejecimiento (que disminuye la eficacia de la homeostasis del

cobre dando concentraciones más altas de cobre sérico en población anciana (Fischer y col., 1990; Sauberlich, 1999; Madsen y col., 2007), el sexo (se detectan niveles medios de cobre superiores en mujeres, esto podría ser debido al hecho de que las mujeres adultas presentan niveles más altos de absorción que los hombres, y por lo tanto tiene una rotación más rápida de Cu una vez que es absorbido (Johnson y col., 1992; Sanchez y col., 2010)), los factores hormonales y la obesidad (el cobre tiende a disminuir en obesos y a aumentar en sedentarios). Los niveles séricos de cobre se correlacionan positivamente con el porcentaje de la energía aportada por la grasa monoinsaturadas y poliinsaturadas, así como con la energía aportada por hidratos de carbono. En nuestra población los obesos tienden a consumir menos grasas poliinsaturadas (Mataix y Llopis, 2009).

El Cobre se absorbe en el estómago, duodeno y en el intestino (Linder y Hazeg-Azam, 1996). En el tracto gastrointestinal solo se recibe 1mg/día de la dieta (Turlund y col., 1989; Marsh y Riley, 1998), pero además se secretan cantidades significativas al intestino (~4.5 mg/día) a través de la saliva, bilis, secreción gástrica y apoptosis de células de la mucosa intestinal (Wapnir, 1998; Crisponi y col., 2010).

El primer paso en la absorción de cobre es la captación del metal presente en la dieta por células epiteliales intestinales. El mecanismo íntimo por el que esta ión se transporta a través del borde en cepillo del intestino aún no es totalmente conocido. La especiación química de cobre contenida en los alimentos vegetales o en los animales representa un factor clave para la absorción de cobre: Ledoux (1991 y 1995), llegó a la conclusión de que mientras las sales de cobre (carbonato, acetato, sulfato y cloruro) se absorben bien, el óxido de cobre tiene una capacidad mucho menor para atravesar la barrera intestinal.

Algunos tratamientos de los alimentos también afectan a la absorción de cobre. Así, ciertas sales usadas para la conservación de alimentos pueden modificar la solubilidad de este mineral que se encuentra unido a proteínas y su biodisponibilidad (Clydesdale, 1988; Crisponi y col., 2010).

El pH intestinal es probablemente el factor fisiológico más importante que afecta a la absorción de cobre, puesto que un ambiente ácido es esencial para liberar los iones de cobre de los complejos formados en los alimentos y en las secreciones mucosas (Gollan, 1975).

La presencia en la dieta de agentes quelantes como el ácido cítrico, en grandes cantidades en las frutas y ácido láctico, favorece la absorción de cobre (Shah, 1981; Wapnir, 1998; Crisponi y col., 2010; Mesias y col., 2012).

También la presencia en la dieta de cationes divalentes modifica la absorción intestinal de cobre, ya que se produce competitividad entre ellos (Wapnir, 1998).

La capacidad del Zn para limitar la absorción de cobre primero fue descrita en ratas (Van Reen, 1953), y posteriormente confirmada en seres humanos: 3mg de cinc en la dieta causa deficiencia de cobre (Gregor, 1980; Wapnir, 1998; Navarro y col., 2000), llevando a una anemia severa y leucopenia (Hoffman, 1988). El cinc interfiere en el metabolismo de cobre actuando en diferentes lugares: por un lado desplaza al cobre del transportador específico en las células intestinales (Bremner, 1980) y por otro aumenta la concentración de metalotioneína en el epitelio intestinal, impidiendo de esta forma el tráfico de cobre y favoreciendo su eliminación por heces (Lee y col., 2002).

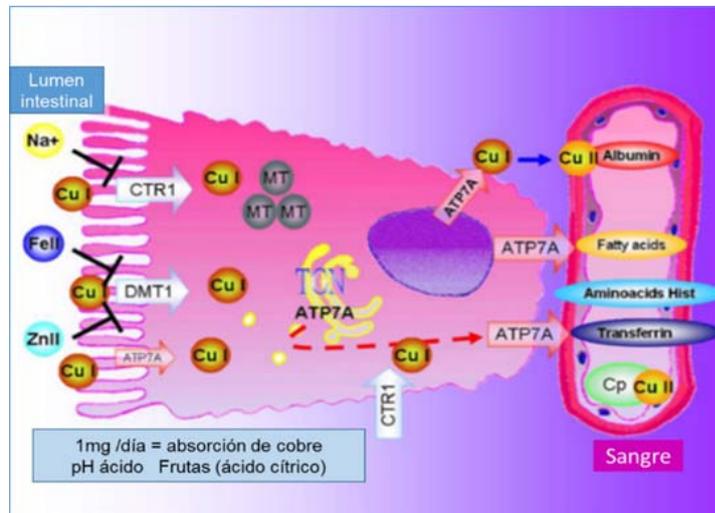
El Cobre se absorbe principalmente en el duodeno, aunque también una pequeña cantidad es absorbida por el estómago y la parte distal del intestino delgado (Mason, 1979). Se estima que la eficacia de la absorción de cobre en los seres humanos está entre el 12% y 60% de lo ingerido (Tumlund y col., 1989). Otros autores consideran entre un 15 y 80% y más frecuentemente 40-60% (Olivares y col., 2010). El % de Cu biodisponible depende de la cantidad ingerida, de la presencia de algunos factores dietéticos que pueden promover o inhibir su absorción en el individuo, así como del estado nutricional del Cu.

El paso del cobre desde el lumen intestinal al interior del enterocito se puede realizar de varias formas; quizá la más importante es por medio del transportador de cationes conocido como hCTR1. Este es una proteína de 190 aminoácidos cuya acción es dependiente del tiempo, saturable y se ve estimulada por el pH ácido extracelular así como por la alta concentración de potasio (Lee y col., 2002). Es una proteína esencial para la absorción intestinal de cobre; está localizada en la membrana plasmática de los enterocitos realizando una función de transporte convencional para los iones cobre (Lee y col., 2002; Nose, 2006).

Otra forma de este transporte es llevada a cabo por el transportador DMT1, que permite el paso a través de la membrana del enterocito de iones Cu(I), así como de Fe(II). Este transportador nos permite relacionar la absorción de Cu y de Fe, existiendo una competencia entre ambos por este transportador (Han y

Wessling-Resnick, 2002; Tennant y col., 2002; Knöpfel y col., 2005). Este transportador es también sensible al pH.

Fig. 1- Absorción del cobre de la dieta por los enterocitos del lumen intestinal y transporte en sangre (Crisponi y col., 2010).



Una vez en el interior del enterocito, el transporte de cobre está mediado por un grupo de proteínas llamadas metalotioneínas (MTs). Estas permiten su distribución hacia los distintos orgánulos y cuproenzimas, así como el paso por el citoplasma y su traslado a la parte basal (Bremner, 1980; Crisponi y col., 2010; Olivares y col., 2010), sin exponer la célula a la toxicidad del cobre y así prevenir el daño oxidativo (Sturniolo y col., 1999). Esta proteína es también transportadora de otros oligoelementos como cadmio y cinc, explicándose así la competencia que existe entre estos elementos y el cobre a nivel de transporte (Botash y col., 1992).

Ya en el polo basal del enterocito, este mineral atraviesa la membrana de forma casi exclusiva por un transportador conocido como ATP7A (ATPasa de Menkes) que lleva el cobre desde el interior del enterocito al plasma sanguíneo (Crisponi y col., 2010).

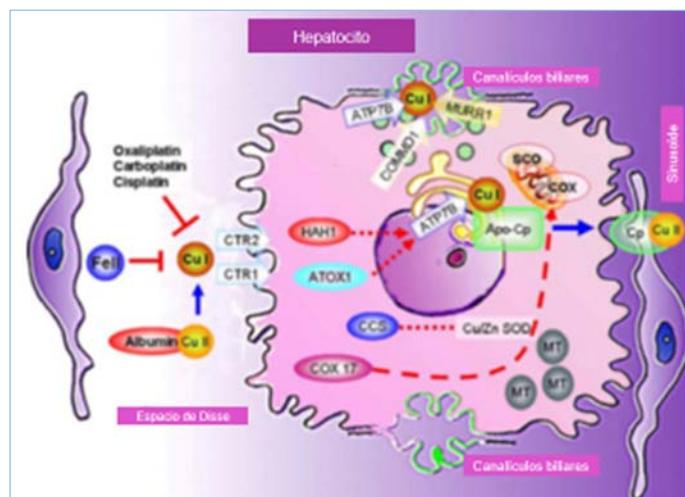
El cobre que no ha sido exportado ni incorporado a las cuproenzimas se almacena en el citosol del enterocito, unido a una proteína liante de metales que es la MT y aquí permanece como reserva.

Ya en el sistema portal de sangre, el cobre se puede unir a distintos aminoácidos, péptidos y ácidos grasos formando complejos que no son muy relevantes (Carter, 1994), o bien unirse a diferentes proteínas, entre las que tenemos la albúmina (Guiraud y col., 2008; Crisponi y col., 2010) -proteína más abundante del plasma- y la transcupreína (Linder y col., 1987; Linder y col., 1998) que son los dos principales transportadores del cobre en su camino al hígado. En ausencia de albúmina, el cobre puede ser transportado a través del plasma también por la transferrina.

La albúmina sérica humana es una proteína portadora versátil capaz de transportar ácidos grasos, vitaminas, hormonas y una gran cantidad de iones metálicos entre los que tenemos Cu(II), Ca(II), Zn(II), Co(II), Ni(II) y Cd(II) (Breslow, 1964; Crisponi y col., 2010). La transcupreína es una glicoproteína alfa que tiene mayor afinidad por el Cu(II) y es bien conocida en ratas, sin embargo algo desconocida en el ser humano. Se sabe que el complejo Cu-transcupreína representa el 12% de la reserva de Cu en rata. Una proteína con similares funciones en el hombre, es la ceruloplasmina; más del 65% del cobre presente en el suero está asociado a ceruloplasmina (Wirth y col., 1985; Faure y col., 2003; Crisponi y col., 2010).

El hígado desempeña un papel esencial en la excreción de Cu y en el control del metabolismo de este mineral. El tejido hepático extrae el cobre desde la circulación atrapándolo en proteínas quelantes de este mineral.

Fig.2. Transporte de cobre en el hepatocito (Crisponi y col., 2010).



Este proceso de absorción de cobre por los hepatocitos probablemente es iniciado por la unión de cobre como complejo ternario de Cu-His-Alb o como complejo Cu-His₂, seguida de la reducción de los iones Cu(II) a Cu(I) (Van den Berg y McArdle, 1994; Crisponi y col., 2010).

Una proporción de Cu es almacenada en el hígado unido a la metalotioneína, la superóxido-dismutasa y otras proteínas ligantes, mientras que el exceso de mineral es excretado hacia la bilis (Davis y Mertz, 1987; Crisponi y col., 2010; Faure y col., 2003; Franchitto y col., 2008).

El cobre es posteriormente devuelto a la circulación extrahepática y se distribuye principalmente entre los eritrocitos y el plasma. Más o menos un 60% del cobre eritrocitario se encuentra en la superóxido-dismutasa y el resto se halla unido a proteínas y aminoácidos. En el plasma, cerca de un 90-95% del Cu se encuentra unido firmemente a ceruloplasmina y el 5-10% unido a albúmina, transcurreína y otros componentes de bajo peso molecular (Olivares y col., 2010).

La ceruloplasmina es sintetizada en el hígado, para lo cual requiere Cu(II), con lo que Cu(I) debe sufrir un proceso de oxidación en algún momento antes de su incorporación a la proteína (Bingham y col., 1997; Crisponi y col., 2010). Esta proteína representa el principal transportador de cobre a los tejidos periféricos (Martin y col., 2005; Olivares y col., 2010). Entre estos tejidos, podemos destacar:

- La placenta, en la que el cobre tiene una influencia significativa en el mantenimiento de la reproducción en la mujer y el desarrollo fetal (Michaluk y Kochman, 2007).
- Los riñones, que son de considerable importancia en el metabolismo del cobre y se encargan de regular muy eficazmente el contenido de este, siendo ATP7A y ATP7B los transportadores de cobre más importantes que contribuyen a esta regulación (Linz y col., 2008).
- Las glándulas mamarias, que presentan una marcada afección por cobre, más acentuada durante la lactancia cuando la mayoría del cobre absorbido es desviada del hígado y riñón y llevado a estas (Donley y col., 2002).
- El sistema nervioso central, donde el cobre es esencial, ya que actúa como un cofactor de la superóxido dismutasa, dopamina-beta-hidroxilasa, la proteína precursora del amiloide, la ceruloplasmina y otras metaloproteínas esenciales para una función normal del cerebro. La ATP7A y ATP7B juegan un papel central en la distribución de cobre en los diferentes compartimientos del sistema nervioso

central (Barnes y col., 2005; Kitzemberg y col., 2005; Kodama y col., 2005; Aschner y col., 2006; Rossi y col., 2007).

La eliminación del cobre se produce fundamentalmente por el tracto gastrointestinal, ya sea mediante la bilis o como cobre no absorbido (Aggett, 1999; Olivares y col., 2010; Lopez de Romaña y col., 2011). Hay otras pérdidas de menor importancia por el sudor, orina y menstruación. Una cantidad importante de Cu ingerido no es absorbido; a esta se suma el Cu excretado por las vías biliares, la saliva, otras secreciones gastrointestinales y la descamación de enterocitos. Solo el 10-15% del cobre eliminado por la vía biliar es reabsorbido, siendo muy importante el estado de oxidación del cobre para la reabsorción. Sin embargo, la fracción de cobre que se reabsorbe procedente de otras secreciones gastrointestinales no biliares es probablemente mayor. La secreción endógena biliar de cobre está aumentada cuando la ingesta de Cu es excesiva y disminuida cuando la ingesta está reducida o hay deficiencia de Cu (Turnlund y col., 1989; Olivares y col., 2010; Lopez de Romaña y col., 2011).

1.2.3.- SITUACIONES PATOLÓGICAS ASOCIADAS A BAJOS NIVELES DE CU EN EL ORGANISMO.

Los seres humanos requieren por lo menos 22 elementos minerales para su bienestar (Welch y Graham, 2004; White y Broadley, 2005; Graham y col., 2007). Las dietas de más de dos tercios de la población mundial carecen de uno o más de los elementos minerales esenciales.

La deficiencia de Cu puede provenir de una causa genética o ser adquirida con el tiempo por causas nutricionales (Olivares y col., 2010). Se produce con mayor frecuencia en el lactante, aunque también se puede producir a otras edades, como por ejemplo en el adulto. En este caso, suele deberse a unos bajos depósitos al nacer, a consumo de dietas de bajo contenido en cobre o a baja biodisponibilidad, ya sea por un aumento de las necesidades o de las pérdidas.

Los recién nacidos, los bebés prematuros y de bajo peso al nacer son los de mayor riesgo a desarrollar deficiencia en cobre. En la práctica clínica se debe presuponer una deficiencia de Cu en todos los bebés con diarrea prolongada o recurrente [Rodríguez y col., 1985; Crisponi y col., 2010).

Los lactantes que están alimentados con leche de vaca frente a leche materna tienen también más predisposición a desarrollar una deficiencia de este

mineral, ya que la leche de vaca tiene un contenido más bajo de cobre y su absorción es menor (Olivares y col., 2010). Sin embargo, no podemos olvidarnos de que el contenido en cobre de la leche humana es en algunos casos hasta 500 veces menor que en algunos alimentos (Picciano y Guthrie, 1976; Delves, 1980; Crisponi y col., 2010) y disminuye en gran medida (50%) a partir del cuarto mes de lactancia (Vuori y Kuitunen, 1979; Krachler, 1998), de modo que una lactancia prolongada podría conducir a la deficiencia de cobre (Vuori, 1979; Crisponi y col., 2010). Las formulas en polvo, sustitutorias de la lactancia materna, tienen concentraciones significativamente más altas que las concentraciones encontradas en la leche materna de algunas mujeres (Saracoglu y col., 2007), a lo que debemos añadir el cobre adicional presente en el agua para la preparación de la fórmula (Pandelova y col., 2012).

Los límites de seguridad de Cu en niños según el comité de científicos para la alimentación (SCF, 2006) son de 1mg/día para niños de 1 a 3 años.

En el adulto, la aparición de deficiencias de cobre es muy rara, ya que nuestro sistema homeostático se encarga de regularlas. Sin embargo, a veces se producen como consecuencia de síndromes de malabsorción o síndrome nefrótico persistente, que produce un aumento en las pérdidas de cobre (Olivares y Uauy, 1996; Lopez de Romaña y col., 2011).

Las deficiencias de cobre son comunes en los países desarrollados o en vías de desarrollo (Frossard y col., 2000; Welch y Graham, 2002, 2005; Grusak y Cakmak, 2005; Thacher y col., 2006; White y Broadley, 2009).

Las manifestaciones clínicas más frecuentes de la deficiencia de Cu (Olivares y Uauy, 1996b; Onianwa y col., 2001; Bilandzic y col., 2012) son crecimiento deprimido, despigmentación de la piel por alteraciones en la síntesis de melanina, desmineralización ósea (Heller y col., 1978; Williams, 1983; Strause y col., 1986; Eaton-Evans y col., 1996; Uauy y col., 1998; Ding y col., 2011), alteraciones gastrointestinales, alteraciones hematológicas (anemia normocítica y macrocítica) (Olivares y col., 2010), enfermedades de la musculatura (Vonk y Klomp, 2008; Rayman y Pattison, 2008), alteraciones a nivel de la córnea, enfermedades neurodegenerativas (Waggoner y col., 1999; Cerpa y col., 2005; Bayer y Multhaup, 2005), aumento del riesgo de padecer enfermedades coronarias (Khan y col., 1984; Nath, 1997; Ford, 2000; Klevay, 2000; Kim y col., 2010) y alteración de las respuestas inflamatorias (Brewer, 2005; Rayman y Pattison, 2008) e inmunes.

En recientes y relevantes publicaciones se recoge ya la relación entre el déficit de Cu y la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad isquémica del corazón (Klevay, 2011).

Un fenómeno importante e interesante a tener en cuenta, es el hecho de que cuando se produce disminución de cobre en los órganos, como por ejemplo corazón, pulmón o cerebro, se ocasiona aumento del cobre en plasma (Khan y col., 1984; Bayer, 2005; Kim y col., 2010; Klevay, 2011). Así, en la enfermedad de Alzheimer, se produce un aumento del cobre a nivel plasmático y una disminución a nivel cerebral. Por otra parte, el cobre se acumula en las placas de amiloide, produciéndose una distribución desequilibrada en el cerebro. Algunos autores como Jiang (2007), consideran que el cobre liberado por los órganos al plasma, en estas circunstancias se enlaza con unas proteínas y péptidos diferentes que impiden ser procesados de nuevo por el hígado y su reutilización.

El déficit de estos minerales, en la mayoría de los casos puede remediarse a través de la diversificación dietética, suplementación mineral, la fortificación de alimentos o el aumento de la concentración de elementos minerales en los productos agrícolas, favoreciendo de esta forma su biodisponibilidad (White y Broadley, 2009). La recuperación mediante la suplementación con cobre puede ser lenta, sobre todo para la desaparición de síntomas motores, siendo necesario a veces utilizar dosis más altas que las empleadas habitualmente (Olivares y col., 2010).

Las primeras estrategias de enriquecimiento en Cu tomadas han sido a nivel agronómico, aplicando fertilizantes minerales para mejorar la solubilización y movilización de estos elementos minerales en el suelo. En segundo lugar, los cultivos se han desarrollado para conseguir un aumento de la capacidad de adquirir elementos minerales y acumularlas en tejidos comestibles. Además, se tiende a aumentar las concentraciones de sustancias "promotoras" como ascorbato (vit.C), β -caroteno y polipéptidos ricos en cisteína que estimulan la absorción de elementos minerales esenciales por el intestino y reducir las concentraciones de "anti-nutrientes" como oxalato, taninos o fitato, que interfieren con la absorción del cobre (White y Broadley, 2009).

También es frecuente administrar suplementos nutricionales para mejorar el nivel de ingesta de Fe y Cu. Sin embargo, hay cierta preocupación por la posible interacción negativa entre estos dos minerales, ya que Fe y Cu comparten parte de sus vías de absorción (Gunshin y col., 1997; Olivares y col., 2010b). También se suelen administrar frecuentemente suplementos de cinc que pueden

causar de forma secundaria una deficiencia de cobre (Maret y Sandstead, 2006; Lopez de Romaña y col., 2011).

La primera vez que se vio la esencialidad nutricional del Cu fue en 1928 (Hart, 1928), cuando la administración de un suplemento de 1,0mg/día de sulfato de cobre durante 6 días en ratas permitió observar la rápida aparición de anemia, así como el aumento del crecimiento en ratas con problemas de desarrollo, y por otra parte un aumento de los niveles de hemoglobina en sangre.

1.2.4.- SITUACIONES PATOLÓGICAS ASOCIADAS A ELEVADOS NIVELES DE Cu EN EL ORGANISMO.

Los altos niveles de cobre en el organismo pueden ser consecuencia de un defecto genético (enfermedad de Wilson), o bien pueden tener un origen ambiental o bien por la existencia de alguna patología en el individuo (Olivares y col., 2010). En cualquier caso, el Cu en niveles elevados, puede ser tóxico para el cuerpo humano.

Cuando el individuo se ve sometido a niveles elevados de cobre, la propia homeostasis del organismo intenta regularlo, y así reduce su absorción y aumenta su eliminación a nivel biliar (Haschke y col., 1986; Turnlund y col., 1990; Lopez de Romaña y col., 2011).

Los síntomas de la sobrecarga de Cu tardan en aparecer y algunas manifestaciones clínicas dependen de los órganos en los que se produzcan los depósitos de Cu, principalmente hígado, cerebro y córnea (anillo de Kayser-Fleischer).

No hay indicadores sensibles y específicos usados para la detección de niveles elevados de Cu en el individuo. Los indicadores que con más frecuencia se usan son la ceruloplasmina y la concentración de Cu sérico; sin embargo estos sólo detectan cambios bastante intensos en el estado del cobre.

La enfermedad de Wilson es la principal causa de la aparición de concentraciones altas de Cu en el ser humano. Es un defecto genético letal en el que las células y tejidos, especialmente hígado, cerebro, riñones y cornea, acumulan altos niveles de Cu (Propst y col., 1995; El-Youssef, 2003; Franchitto y col., 2008). La pérdida de la homeostasis del Cu puede conducir a la producción de especies reactivas de oxígeno, que pueden provocar el desarrollo de distintas

enfermedades (Evelyn Tiffany-Castiglioni y col., 2011). Estos pacientes tienen una ausencia o disfunción de la ATPasa tipo P (ATP-7B) encargada en el hígado de exportar el Cu a la circulación y de excretarlo por vía biliar (Olivares y col., 2010). Las manifestaciones clínicas de esta patología son la aparición de enfermedad hepática crónica y/o alteraciones neurológicas o psiquiátricas. A pesar de los niveles elevados de Cu hepáticos, la concentración de ceruloplasmina y de cobre en sangre son bajas, mientras que el cobre urinario excretado es mayor (Scheinberg y Sternlieb, 1996, Olivares y col., 2010; Lopez de Romaña y col., 2011).

El anillo de Kayser-Fleischer es un signo diagnóstico en la enfermedad de Wilson. Se caracteriza por su coloración café verdosa en el margen externo de la córnea, estando presente en prácticamente todos los casos de la presentación neurológica y entre un 70% y 90% en el caso de la forma hepática. Típicamente, aparece inicialmente en los polos superior e inferior del limbo corneal y se disemina posteriormente a la zona central. La densidad del anillo se correlaciona con la duración de los síntomas y su desaparición refleja, en general, una buena respuesta terapéutica a los fármacos quelantes o al trasplante hepático. El anillo desaparece en forma inversa a como se formó, es decir, desaparece primero centralmente y finalmente lo hacen los polos superior e inferior.

La restricción dietética de cobre modifica poco el curso de esta enfermedad. La estrategia terapéutica actual consiste en la disminución de la absorción de cobre mediante el uso farmacológico de dosis orales de Zn, y el aumento de la excreción urinaria por medio de agentes quelantes como la D-penicilamina (Scheinberg y Sternlieb, 1996, Olivares y col., 2010; Lopez de Romaña y col., 2011).

La intoxicación por Cu de origen ambiental es muy rara. Se produce en áreas geográficas determinadas, como por ejemplo la India o el Tirolo, donde tienen costumbre de usar recipientes de Cu para almacenar o calentar alimentos y leche (O'Neill y Tanner, 1989; Lopez de Romaña y col., 2011). En ambos lugares, el reemplazo de esos utensilios de cobre produjo una reducción o eliminación de los casos de cirrosis. También se ha producido algún caso de cirrosis infantil atribuida al elevado nivel de Cu en el agua de consumo, aunque se trata de casos esporádicos.

Los recién nacidos son los más vulnerables a una exposición excesiva de Cu y se les considera como un grupo de riesgo debido, por una parte a que su sistema de excreción biliar se desarrolla a lo largo del primer año de la vida y, por

otra parte a que reciben grandes cantidades de líquidos. Si el agua utilizada para preparar la leche maternizada es rica en cobre, el resultado puede ser fatal (Olivares y col., 1998, 2000; Lopez de Romaña y col., 2011)

La ingestión accidental de sales de Cu produce molestias gastrointestinales, fundamentalmente náuseas, vómitos y diarrea, así como dolor muscular (Stein y col., 1976; Olivares y Uauy, 1996; Franchitto y col., 2008; Bilandzic y col., 2012). Estos síntomas aparecen normalmente cuando se ingieren dosis entre 15mg y 1g. Si las cantidades ingeridas persisten en el tiempo o son mayores a 1g, pueden llegar a producir hemólisis, lesiones hepáticas y renales (Oldenquist y Salem, 1999; Takeda y col., 2000; Faure y col., 2003; Gunay y col., 2006; Storelli y col., 2007).

El tratamiento de la intoxicación aguda de cobre es igual al descrito para la enfermedad de Wilson. Gran variedad de quelantes de cobre pueden usarse para ello, sin haber un consenso sobre cuál es el mejor. Entre ellos, tenemos la D-penicilamina, el dimercaprol y el ácido etilendiamintetraacético (EDTA). Para su aplicación hemos de tener en cuenta dos factores, primero, que la vía oral es difícil de usar debido a los síntomas gastrointestinales, y segundo, que una vez quelado el cobre, este es eliminado por el riñón y no por vía biliar como lo hacía prioritariamente antes. Este factor es muy importante y hay que tenerlo en cuenta en pacientes con insuficiencia renal (Klein, 1972; Jantsch, 1984-1985; Barceloux, 1999b; Oldenquist y Salem, 1999; Takeda y col., 2000; Franchitto y col., 2008).

1.2.5.- NIVELES DE COBRE Y BALANCE Cu/Zn EN PACIENTES CON INSUFICIENCIA RENAL. EFECTOS EN DICHS PACIENTES DE LA SUPLEMENTACIÓN DE CINC.

Los riñones son, en la mayoría de los casos, responsables de mantener el equilibrio externo de minerales. Así mismo, el impacto de la insuficiencia renal sobre el metabolismo de minerales traza es difícil de anticipar. La diálisis, así como las modificaciones dietéticas asociadas y el uso de medicamentos, son responsables a veces de deficiencias e intoxicaciones de minerales traza (Krachler y col., 1999; Krachler y Wimsberger, 2000; Kasama, 2010). Los pacientes sometidos a diálisis a largo plazo pueden sufrir deficiencias de minerales como resultado de una pobre ingesta, combinada con el proceso de diálisis (Krachler y col., 1999; Bozalioglu y col., 2005; Kiziltas y col., 2008). Por otra parte, la toxicidad puede resultar por causa de una excreción disminuida, una

excesiva suplementación dietética o por mecanismos iatrogénicos, incluyendo entre ellos equipos o soluciones de diálisis contaminadas. Actualmente, los nefrólogos se encuentran con una nueva preocupación, que es el creciente uso de “medicina alternativa” en la que se incluye suplementos sin valor nutricional claro. Casi todos los elementos de la tabla periódica se pueden encontrar en un suplemento u otro (Kasama, 2010).

Desde el principio de la historia de la diálisis, había gran preocupación por la toxicidad de algunos oligoelementos, que contribuían de forma potencial a la osteodistrofia renal, encefalopatía urémica y anemia (Hosokawa y col., 1990; Vanholder y col., 2004). Sin embargo, otros elementos como el Cu, fueron ignorados en pacientes en hemodiálisis (Kasama, 2010).

La hemodiálisis, mediante el equilibrio entre el plasma y el dializado, elimina principalmente toxinas urémicas. Este dializado es preparado cuidadosamente con cantidades reguladas de iones biológicamente esenciales como el potasio, sodio, bicarbonato y calcio. Otros oligoelementos, como el cobre, no se añaden habitualmente al dializado (Medicare Program, 1995; Tonelli y col., 2009), aunque no podemos descartar que vayan muy pequeñas cantidades incluidas como contaminante en el agua para la preparación de este, pues raramente son medidos los niveles de estas sustancias. La reciente mejora de la técnica de diálisis ha permitido evitar algunas complicaciones graves como resultado de estos cambios de oligoelementos, sin embargo, sigue habiendo problemas (Miura y col., 2002; Kiziltas y col., 2008). La falta de depuración renal del cobre mediante la hemodiálisis puede conducir a acumulación de este mineral en el paciente.

Los pacientes sometidos a hemodiálisis tienen diferentes concentraciones de oligoelementos biológicamente importantes en sangre respecto a los controles sanos. Así, estos pacientes tienen bajos niveles séricos de cinc (Miura y col., 1999; ; Ribeiro y col., 2004; Navarro-Alarcón y col., 2006; Sahin y col., 2009; Tonelli y col., 2009; Rucker y col., 2010) y elevados niveles séricos de cobre (Sondheimer y col., 1988; Kaminska-Galwas y col., 1993; Huang y col., 2000; Navarro-Alarcón y col., 2006; Tonelli y col., 2009; Ikee y col., 2012), por tanto su balance Cu/Zn se encuentra también elevado (Navarro-Alarcón y col., 2006; Tonelli y col., 2009; Koca y col., 2010; Rucker y col., 2010; Guo y col., 2011; Ikee y col., 2012; Guo y Wang, 2013). Por el contrario, otros autores (Komindr y col., 1996; Yilmaz y col., 2000) han encontrado una disminución de los niveles de Cu en pacientes sometidos a hemodiálisis.

Estos pacientes presentan también desnutrición (Sahin y col., 2009), un aumento del estrés oxidativo, inflamación y alteraciones inmunológicas (Guo y col., 2011b; Ozen y col., 2011).

Se sabe que el cinc tiene propiedades antioxidantes y antiinflamatorias y que la suplementación oral de Zn puede reducir la inflamación en pacientes con enfermedad renal sometidos a hemodiálisis (Rashidi y col., 2009).

Altos niveles de cobre, se postulan, como un factor de riesgo para la enfermedad cardiovascular (Kang, 2011), así como para procesos de inflamación crónica. La proporción de Cu/Zn es uno de los mejores indicadores de la inflamación y de determinadas complicaciones vasculares (Karahan y col., 2001; Barrera y col., 2003).

Los pacientes con enfermedad renal sometidos a diálisis tienen mayor relación Cu/Zn que los controles. Guo y col., (2011), habían divulgado recientemente, la relación entre el cociente Cu/Zn, el estrés oxidativo, la inflamación y las anormalidades inmunes en pacientes de diálisis peritoneal. Aunque el mecanismo de asociación sigue siendo dudoso, se ha observado que mayores ratios de Cu/Zn pueden producir un aumento del estrés oxidativo, una disminución de la capacidad antioxidante, así como a un aumento de la inflamación. También se sospecha que la relación Cu/Zn está positivamente asociada con la aterosclerosis carotídea. Los mecanismos posibles para esta asociación pueden ser el estrés oxidativo y la inflamación (Ari y col., 2011).

De acuerdo con estudios anteriores de pacientes sujetos a hemodiálisis, se ha asociado el aumento de los niveles de cobre en suero con el sexo masculino (Navarro-Alarcón y col., 2006; Ikee y col., 2012), con una mayor duración de la hemodiálisis (Locsey y Papp, 1983), con la disminución del volumen de orina (Veighey y col., 2011) y con el aumento de los niveles plasmáticos de colesterol total (Navarro-Alarcón y col., 2006). En el estudio de Ikee y col. (2012), se encuentra una correlación positiva entre los niveles séricos de cobre y los niveles plasmáticos de colesterol total y LDL-colesterol. Navarro-Alarcón y col. (2006), reportaron una asociación entre la diabetes mellitus y menores niveles séricos de cobre. La enfermedad cardiovascular se asoció con mayores niveles séricos de cobre en un estudio clínico en estos pacientes (Healy y col., 2000), pero ha sido asociada también con niveles de cobre inferiores en otro estudio (Navarro-Alarcón y col., 2006).

La administración de suplementos de cinc en pacientes en HD provocaron una considerable elevación de las concentraciones plasmáticas de Zn, la disminución de las concentraciones de Cu y por tanto proporciones de Cu/Zn más bajas (Chevalier y col., 2002; Rashidi y col., 2009), con lo cual la respuesta inflamatoria se vio disminuida, el estado nutricional mejoró, así como también el estado inflamatorio e inmunológico (Guo y col., 2013).

En estudios recientes, se ha podido ver como la administración de Sevelamer, ampliamente utilizado en el tratamiento de la hiperfosfatemia en pacientes con enfermedad renal crónica, lleva a una menor calcificación vascular, mejora los perfiles lipídicos (Chertow y col., 2002; Ikee y col., 2012), los efectos inflamatorios (Navarro-Gonzalez y col., 2011) y los efectos antioxidantes (Lin y col., 2011). Takagi y col. (2010) han demostrado que Sevelamer se une al Cu de forma particularmente fuerte a un pH ácido, disminuyendo los niveles séricos de este. Otros autores (Veighey y col., 2011) no encontraron diferencia entre los niveles séricos de Cu en pacientes usuarios de Sevelamer y los no usuarios. Sin embargo si vieron cómo la acidez gástrica podía influir en la absorción de este.

1.3.- ALUMINIO

1.3.1.- EL ALUMINIO EN LA NATURALEZA. MECANISMOS DE ASIMILACIÓN DE ALUMINIO.

El aluminio (Al) es un metal que fue considerado durante mucho tiempo inocuo para los seres humanos. Ya se usaba en el antiguo Egipto y en Babilonia en tintes vegetales y con fines medicinales. Era conocido en el mundo antiguo como "El metal de la arcilla".

Durante miles de años, la separación de sus aleaciones era tan costosa que se consideraba un metal precioso.

No fue hasta finales del siglo XIX cuando se consiguieron pequeñas muestras del metal en el laboratorio y así comenzó lo que se llamó "la era del aluminio". Durante el siglo XX, la química moderna de los compuestos organometálicos centró su atención en el empleo de reactivos de Al como catalizadores y en la preparación de materiales (Nesse y col., 2003).

El Al se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza. Una proporción natural del 8% de la superficie terrestre lo ubica en el primer lugar de abundancia relativa entre los metales y el tercero entre todos los elementos de la corteza.

Este elemento se obtiene principalmente de la Bauxita, un mineral muy abundante que fue descubierto en Le Baux, Francia, en el siglo XIX. Sin embargo, fue durante los últimos 100 años, cuando se produjo la mejora en los sistemas de separación del aluminio de los minerales con los que usualmente forma aleaciones la que llevó a un aumento notable en el uso de este mineral (Feketea y col., 2012).

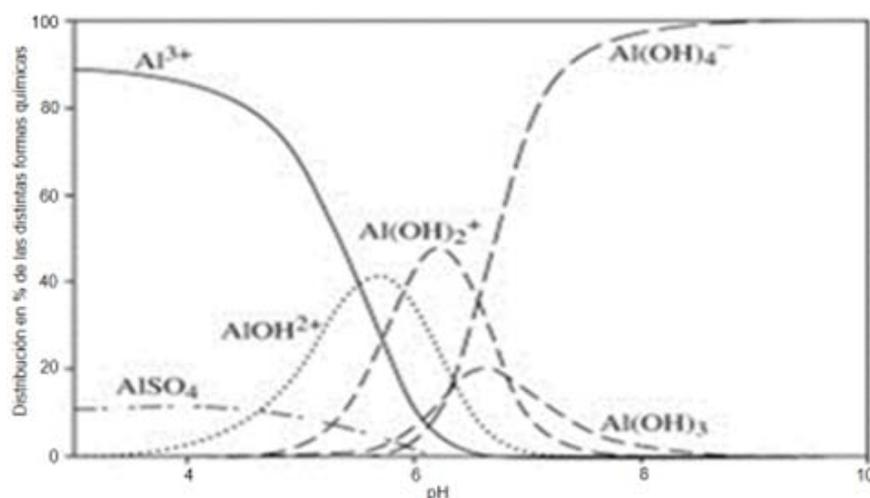
El Al es liviano, fuerte en aleación con otros metales y muy dúctil y maleable. Estas propiedades lo convierten en un elemento con numerosas aplicaciones, no existiendo en la naturaleza otro metal más adecuado para los numerosos usos que este tiene (Feketea y col., 2012). Desde el punto de vista industrial y comercial, se emplea cada vez más en la tecnología eléctrica, en la industria de transporte, embalaje y construcción, así como en utensilios domésticos y envasados. Los compuestos de aluminio se utilizan en el procesado,

el empaquetado y la conservación de alimentos y como aditivo alimentario (Nesse y col., 2003; Exley, 2003).

Por otro lado, podemos decir que el Al natural se encuentra en el suelo, formando parte de la estructura química de los aluminosilicatos presentes en muchos minerales y rocas. La acción combinada de factores atmosféricos promueve cambios físicos y químicos que producen la ruptura de las rocas superficiales. Así se originan minerales arcillosos que luego se transforman en óxidos e hidróxidos de Al, más solubles (Nesse y col., 2003).

En función del pH del suelo, el aluminio se solubiliza en agua dando distintas formas químicas, tal como podemos observar en la figura 3 aportada por Wilson (2011). A pH ácido predomina la forma catiónica Al^{3+} y a pH básico, las formas complejas de este elemento $[Al(OH)_4]^-$. Dichas formas actúan de forma muy distinta en el organismo, donde cabe destacar que el mayor efecto tóxico lo producen las especies catiónicas de Al^{3+} .

Figura 3. Distribución en % de las distintas formas químicas del Al en función del pH (Wilson, 2011).



Muchos vegetales absorben Al del suelo en el que son cultivados. Cuando el pH del suelo es menor de 5, este metal es solubilizado en el agua y absorbido por las raíces de las plantas. En los últimos años, como consecuencia de la actividad humana, la acidificación artificial y progresiva a la que se está viendo sometido el suelo, está provocando una mayor absorción y acumulación en los vegetales (Feketea y col., 2012).

Los alimentos que contribuyen en mayor proporción al Al dietario son cereales, quesos procesados y sal, ya que contienen compuestos de Al

agregados como aditivos. También se encuentra en gran cantidad en conservas de frutas, cerveza, hojas de té, etc. (Nesse y col., 2003).

Las latas de bebidas y los utensilios de cocina constituyen fuentes adicionales de Al en la dieta. Si bien la mayoría de los alimentos no presentan cantidades importantes del catión disueltos, tanto el calor suministrado durante la cocción como la adición de soluciones ácidas y salinas, aumentan considerablemente la disolución del mismo en alimentos.

La presencia de Al en el agua de bebida deriva de su fuente natural y de los métodos empleados para la potabilización, que incluyen una etapa de clarificación química con aluminato de sodio, aluminato de amonio o sulfato de Al (Nesse y col., 2003; Wu y col., 2012; Nookabkaena y col., 2013).

El Al se encuentra también en gran cantidad de productos cosméticos y de higiene personal, y aunque la absorción por la piel no es significativa, hay que tenerla también en cuenta (Nesse y col., 2003).

Por otro lado, la ingestión de compuestos de Al, muy utilizados en la industria farmacéutica como antiácidos, aspirinas tamponadas, suplementos de calcio, productos antidiarreicos, antihemorroidales, vacunas, soluciones intravenosas y parenterales y, en especial, ciertos compuestos de Al prescritos para contrarrestar la hiperfosfatemia que se produce en el estadio terminal de la enfermedad renal, así como la utilización de agua con elevado contenido de este metal en la hemodiálisis, nos proporcionan un aporte muy superior al Al recomendado (Nesse y col., 2003).

1.3.2.- EL ALUMINIO EN EL ORGANISMO HUMANO.

El aluminio (Al) es un elemento ubicuo no esencial que entra en el cuerpo principalmente por ingestión a través de los alimentos, el consumo de agua, y los productos farmacéuticos. Hasta ahora, a pesar de que este elemento es el más común de los metales de la corteza terrestre, no se ha demostrado que tenga ninguna función biológica esencial (Yang y col., 1994; Williams, 1996; Feketea y col., 2012).

La exposición excesiva a Al origina consecuencias negativas para la salud en personas con problemas de función renal, especialmente en hemodiálisis (Kruger y col., 2007).

El Al se absorbe principalmente en el intestino proximal temprano, con una tasa de absorción con el siguiente orden: duodeno > yeyuno > íleon (Froment y col., 1989; Wu y col., 2012)). Esto puede ser debido a que el pH del intestino proximal temprano es relativamente bajo, lo cual es beneficioso para la disolución del Al y la permanencia en estado soluble de las especies de este mineral, lo que facilita finalmente su absorción (Powel y col., 1993; Wu y col., 2012).

La absorción que se produce en el tubo digestivo, aunque a largo plazo, está equilibrada por la excreción renal, pero, en caso de insuficiencia renal, la administración de aluminio en forma de hidróxido puede provocar acumulación creciente en el organismo, depositándose sobre todo en el tejido pulmonar, el cerebro y los huesos (Olaizola y col.1990).

La absorción intestinal de Al nunca supera el 0,1% de la dosis ingerida, y está sujeta a una regulación por parte de muchos factores sistémicos y locales, como la formación de complejos y el pH gástrico. Parece ser que la concentración luminal de fosfato disminuye la absorción de Al, mientras que las sales de citrato la aumentan (Drueke, 2002), al igual que el glutamato (Wu y col., 2012).

En personas sanas, la carga total de aluminio es de 30-35 mg y en una dieta normal se ingieren de 2 a 3 mg diarios. Las cantidades de aluminio que se absorben a través del intestino son muy variables (15-30 µg/día), y la excreción entérica de aluminio es muy pequeña. El riñón es el órgano principal de excreción de aluminio. Sin embargo, dado que una gran fracción (85-90%) del aluminio en plasma se encuentra ligada a las proteínas del plasma, en particular a la transferrina y a la albúmina, aún cuando la función renal es normal, hacen falta meses y años para excretar una sobrecarga de aluminio recibida vía parenteral. Además, esta salida lenta del aluminio del organismo podría estar relacionada con su lenta liberación de su almacenamiento tisular (Moreno y col., 1999).

La Transferrina (Tf) es una proteína del grupo de las globulinas que capta el hierro de la dieta, lo acumula y transporta, constituyendo la principal proteína fijadora de hierro circulante. Esta glicoproteína, presente en los vertebrados y en algunos insectos, es capaz de unirse no sólo al hierro, sino también a una amplia variedad de di-, tri- y tetra- cationes (Harris, 1996), entre los que destaca el Al. A pesar de que no es esencial para el cuerpo humano, la actividad humana ha aumentado su biodisponibilidad y en la actualidad se detectan en los organismos vivos cantidades significativas, que continúan siendo trazas, de Al³⁺, lo cual pone en entredicho la toxicidad de este mineral (Mujika y col., 2011).

Se sabe que el 94% de Al^{3+} presente en el suero se une a especies de alto peso molecular, de las cuales el 60% está vinculado a la transferrina, el 34% a albúmina y el Al^{3+} restante se asocia con especies de bajo peso molecular como el citrato. Tanto la unión a proteínas como a moléculas pequeñas juegan un papel muy importante en el ser humano, por ejemplo, la especie Al-Tf (Al unido a la transferrina) tiene neurotoxicidad potencial, y la de Al-Cit (Al unido al citrato) puede atravesar la membrana celular, lo cual es importante en el proceso de envenenamiento por Al y es responsable de la acumulación en riñón, hueso e hígado (Mujika y col., 2011; Wu y col., 2012). Al igual que se une al citrato, también puede asociarse al glutamato, aminoácido no esencial que se usa como aditivo alimentario por su peculiar sabor. Dicha unión facilita la absorción a nivel intestinal y el transporte, ya que aumenta significativamente el nivel de Al en las células rojas de la sangre (Wu y col., 2012).

El transporte plasmático del aluminio en seres humanos sigue el mismo camino que el hierro, iniciándose mediante la unión a la transferrina, que a su vez interactúa con el receptor de la transferrina (TGF) (Pérez y col., 1999; Mujika y col., 2011). Mediante este mecanismo, el Al^{3+} sería capaz de acceder a las células en el sistema nervioso central interactuando con el receptor de ésta en condiciones fisiológicas normales (Mujika y col., 2011). Por el contrario, se ha observado en algunos experimentos que el aluminio unido a la transferrina no interactúa con el TGF (Hemadi y col., 2003; Ha-Duong y col. 2008), y que puede seguir caminos distintos para su entrada en el interior de la célula (Hemadi y col. 2003).

El Al^{3+} no es capaz de competir con el hierro en esa unión a la transferrina, pero puesto que sólo el 30% de ésta se encuentra saturada por el Fe^{3+} , los restantes sitios están disponibles para la unión con otros metales, tales como el Al^{3+} (Mujika y col. 2011).

La ruta principal de excreción del Al es a nivel renal. Los pacientes urémicos no dializados tienen una mayor carga de Al en el hígado (3 veces), bazo (12 veces), hueso (6,2 veces) y cerebro (1,7 veces) que en los individuos con función renal normal. Por lo tanto, los pacientes con insuficiencia renal son más susceptibles de toxicidad por Al (Azik y col. 2011).

En los pacientes con insuficiencia renal crónica terminal en hemodiálisis (si se asume que la excreción entérica es muy baja comparativamente con la renal) la única vía de excreción del aluminio es la diálisis. Ya que el 85-90% del Al plasmático se encuentra ligado a proteínas, sólo una pequeña cantidad de este

ción (10-15%) es difusible y ultrafiltrable durante la hemodiálisis (Douthat y col. 2006). El balance de aluminio durante la hemodiálisis depende del gradiente de aluminio difusible, del tipo de membrana de diálisis, de su superficie y grosor y de otros muchos factores como por ejemplo el pH del dializado. De todos los factores, sin duda, el más importante es la concentración de aluminio en los líquidos de diálisis (Moreno y col. 1999).

Estudios clínicos realizados sobre estos pacientes con insuficiencia renal demostraron que 5 años más tarde de ser expuestos al tratamiento de hemodiálisis todavía presentaban niveles plasmáticos mayores de Al, lo que sugiere una extensa distribución tisular (Christie y col. 2011).

Aunque las concentraciones de Al en suero de pacientes mostraron niveles altos, estos estaban por debajo del umbral que indican los niveles potencialmente tóxicos ($> 3,0$ mmol / L ó > 100 mg / L). Sin embargo, sabemos que el umbral de concentración basal sérica de aluminio que puede considerarse tóxica es difícil de determinar, ya que el aluminio puede ser secuestrado en el hueso (Peper y col, 2011).

La intoxicación aguda por Al es muy rara, sin embargo, las concentraciones sanguíneas elevadas de Al son siempre un importante factor de riesgo para la mortalidad en pacientes en hemodiálisis (Chih- Hung y col. 2011).

1.3.3.- NIVELES DE ALUMINIO EN ALIMENTOS Y SU APORTE A LA DIETA.

El aluminio está ampliamente distribuido en nuestra alimentación (cereales, queso, sal, hojas de té...), ya que se utiliza en numerosos procesos de elaboración. Se emplea por ejemplo como agente antiaglomerante en blanqueadores de sal, café, mezclas para pancakes y otros alimentos en polvo; como emulsionante y agente de fusión en quesos procesados; como sustancia clarificante en aguas, postres y otros alimentos procesados que pueden formar precipitados; como mordiente para colorantes en alimentos sólidos; como agente de decapado, en espesantes de confitados de frutas, como aglutinante de carne, salsa de carne y salsas en general; en polvos para hornear y productos de panadería; y finalmente como agente neutralizante y en almacenamiento temporal (Maha y col. 2011; Walton y col. 2012). Por otro lado, el sulfato de aluminio y potasio $[\text{AlK}(\text{SO}_4)_2]$, también conocido como alumbre de potasa, se utiliza como astringente y antiséptico en diversos procesos de preparación de alimentos, especialmente en los procesos de fermentación (Wu y col. 2012).

En condiciones naturales, las hojas de té tienen una elevada cantidad de aluminio. Si éste se toma además con limón, se ve favorecida la absorción de Al por el anión citrato (Nesse y col. 2003).

En la tabla siguiente, propuesta por Millor y col., (2011), podemos observar el contenido de Al en diferentes tipos de alimentos.

Tabla 6. Niveles de Al en los alimentos tal y como son consumidos.

Grupos de alimentos	Grupos productos	Media	Mínimo	Máximo
Cereales y productos de cereales	Pastelería	5.43	0.920	24.5
	Pan	2.60	1.30	3.75
	Cereales para desayuno	0.780	0.472	1.04
	Pasta	2.87	1.58	5.60
	Arroz y sémola	1.45	0.472	3.01
	Bollos, panes y repostería vienesa	3.45	1.52	6.36
	Galletas	2.77	0.236	10.5
	Total	3.18	0.236	24.5
Aperitivos y platos cocinados	Platos cocinados	2.67	0.236	7.38
	Sándwiches	3.06	0.595	10.4
	Postres	2.36	0.235	12.7
	Pizas, quiches y tartas saladas	3.40	0.581	7.60
	Total	2.51	0.236	12.7
Productos Lácteos	Leche	0.696	0.236	2.20
	Productos lácteos frescos	0.935	0.236	4.27
	Queso	0.627	0.236	2.63
	Total	0.835	0.236	4.27
Bebidas	Bebidas alcohólicas	0.761	0.236	1.69
	Café	0.654	0.236	2.32
	Bebidas calientes	3.08	0.595	10.4
	Agua	0.348	0.236	1.00
	Bebidas sin alcohol	0.948	0.236	3.59
	Total	1.14	0.236	10.4
Huevos y ovoproductos	Huevos y ovoproductos	0.884	0.236	3.90
Sustitutos de comidas	Sust. de alimentos en general	5.61	3.76	7.45
Grasas y aceites	Mantequilla	2.10	0.236	8.69
	Margarina	1.74	0.236	5.79
	Aceite	0.783	0.472	1.53
	Total	1.37	0.236	8.69
Pescado y productos del mar	Pescado	1.27	0.236	22.6
	Marisco	25.1	3.310	116
	Total	11.9	0.236	116
Frutas y hortalizas	Nueces	4.67	3.28	6.15
	Frutas	1.01	0.236	5.45
	Productos con patata	0.776	0.236	2.62
	Hortalizas	2.87	0.236	71.9
	Compotas de frutas	1.48	0.236	4.76
	Vegetales secos y semillas oleaginosas	6.72	1.50	14.7
	Total	2.45	0.235	71.9
Helados	Helados	4.90	4.87	4.92
Carnes y menudencias	Delicatesen	2.12	0.235	71.9
	Carnes	0.766	0.235	4.51
	Menudencias	0.584	0.235	1.15
	Aves de corral	0.863	0.235	6.24
	Total	1.27	0.235	21.8
Sales, especias, sopas y salsas	Sopas	3.08	0.595	10.4
	Condimentos y salsas	2.08	0.235	8.12
	Total	1.50	0.235	8.12
Edulcorantes, miel y confitería	Chocolate	15.6	1.77	54.1
	Azúcar y productos a base de azúcar	1.66	0.472	3.05
	Total	9.40	0.472	54.1

Podemos destacar los niveles de aluminio del pescado y sus derivados, con especial mención del marisco. Entre las frutas y verduras, son las semillas y los frutos secos los que presentan mayores concentraciones. El chocolate es otro

de los alimentos con mayor contenido de Al, así como los helados. Entre los cereales y sus derivados, los productos de pastelería son los que destacan. Por otro lado, los sustitutos de comidas, las sopas y las bebidas calientes, son también productos a tener en cuenta en cuanto a los niveles presentes de este elemento. Sin embargo, los productos que se toman a diario como leche, queso, huevos, carnes... no contienen una cantidad considerable de Al en su composición (Millor y col., 2011).

El agua potable puede contribuir también a la cantidad de aluminio de la dieta. La presencia de aluminio en el agua de bebida deriva de su fuente natural y también de los procesos de potabilización. La cantidad del metal que permanece en solución en el agua de la red urbana depende, no solo de la concentración residual, sino también de otras variables regionales como el pH y la coexistencia de otras sustancias (Nesse y col., 2003). Sin embargo se sabe que los alimentos contribuyen aproximadamente al 95% y el agua potable tan sólo a un 1,2% de la ingesta diaria total de Al (Maha y col. 2011).

Por todo lo indicado anteriormente, los alimentos son la principal fuente de ingesta de aluminio y, aunque las materias primas alimenticias podrían estar contaminadas por el suelo, el agua y el aire con partículas de aluminio (Nayak, 2002), su cantidad es baja, siendo los alimentos procesados, cuya cantidad puede provenir del embalaje, de los utensilios de cocina y en su mayor proporción de los aditivos, los que tienen mayor cantidad de este mineral (Who, 2003, 2007; Wonga y col. 2010; Deng y col. 2011). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2007), los aditivos alimentarios que contienen Al representan la principal vía de exposición para la población en general. Entre estos aditivos destaca el sulfato de Al y K usado como agente endurecedor en encurtidos; el sulfato de Al y Na, y el fosfato ácido de aluminio y sodio, aditivo que se utiliza como agente en panadería; el fosfato básico de aluminio y sodio, usado como emulsionante en el queso procesado; el silicato de aluminio y sodio, utilizado como un agente anti-aglomerante en la mezcla de materias primas en polvo; y otras sales de aluminio, utilizadas como colorantes en los dulces y revestimientos (Li y Hsieh, 2004; Saiyed y Yokel, 2005; Wonga y col. 2010).

Este mineral también puede incorporarse a los alimentos durante el proceso de almacenamiento procedente de latas, envoltorios y utensilios de cocina, por solubilización en el medio acuoso de restos del mineral (Nesse y col. 2003; Wilson, 2011; Feketea y col. 2012), proceso que se conoce con el nombre de lixiviación. Esta fuente potencial de exposición al Al es considerada por

algunos autores como insignificante (Trapp y Cannon, 1981; Lione, 1983; Greger, 1985, Muller y col. 1993; Ranau y col. 2001; Soni y col. 2001; Verissimo y col. 2006), si bien otras publicaciones la señalan como importante (Liukkonen-Lilja y Piepponen, 1992; Fimreite y col. 1997; Scancar y col. 2004; Al Mayouf y col. 2008; Frankova y col. 2009; Al Juhaiman, 2010), poniendo de manifiesto la clara controversia existente al respecto. No obstante, todos los estudios referidos anteriormente coinciden en el hecho de que el cocinado de alimentos ácidos en recipientes de aluminio sin revestimiento facilita la liberación de cantidades potencialmente importantes de Al.

Maha y col. (2011) pudieron apreciar cómo los niveles de Al en el queso fundido, envuelto en papel de Al eran significativamente mayores que los encontrados en las muestras envasadas en recipiente de vidrio. También describieron que las concentraciones de Al en las muestras de leche de granja a granel eran insignificantes frente a la leche del mercado ya procesada, que presentaba niveles elevados, e incluso en algunos casos por encima de los límites admisibles.

Este proceso de lixiviación puede verse afectado por distintos factores como son la variación de la temperatura, tiempo de contacto, pH y concentración salina (Feketea y col. 2012). A pesar de que hay detractores y seguidores de esta teoría, todos coinciden en que los materiales utilizados para preparación y conservación de alimentos, pueden liberar pequeñas cantidades de sus componentes químicos cuando entran en contacto con ciertos alimentos. Aparte de los utensilios de acero inoxidable, encontramos otros materiales como el vidrio, la cerámica y los objetos esmaltados, que pueden contener aluminio en su composición (Demont y col. 2012). A pesar de ello, en estos casos no se ha podido comprobar que la cesión sea significativa (Feketea y col. 2012).

En cuanto a las cantidades de Al que pueden ser incorporadas a través de las comidas y bebidas, existe una gran variabilidad en los estudios de su ingesta a partir de la dieta, habiéndose encontrado niveles entre 3 y 100 mg de Al/día (Nesse y col. 2003).

Debe hacerse una especial mención a la dieta de lactantes y niños pequeños. Al crecer, la leche materna por sí sola, no es suficiente para satisfacer las necesidades nutricionales del niño. Por lo tanto, los alimentos complementarios, tales como cereales, carnes, verduras, fórmulas para bebés y alimentos procesados, son administrados en la dieta normal de los niños, existiendo cierto riesgo de toxicidad si la cantidad de Al presente en éstos es

elevada (Nookabkaena y col. 2013). Es reseñable además que los niños tienen una absorción de este metal relativamente alta en comparación con la de adultos (Koletzko y col. 2005), hecho por el cual las concentraciones de Al en los alimentos consumidos por niños deben de mantenerse en los niveles más bajos posibles (Zand y col., 2012).

1.3.4.- PRINCIPALES FUENTES DE APORTE DE AL EN PACIENTES CON ENFERMEDAD RENAL SOMETIDOS A HEMODIÁLISIS.

En pacientes con insuficiencia renal crónica terminal sometidos a hemodiálisis, las fuentes de entrada de aluminio a su organismo pueden proceder tanto de la vía parenteral como de la vía enteral.

La fuente parenteral más importante es el agua de diálisis (Moreno y col. 1999, Douthat y col. 2006). Esto es debido al enorme volumen de agua a la que los pacientes hemodializados están expuestos, siendo esta cantidad aproximadamente de 360 L / semana (Bohrer y col. 2009). Otras fuentes de Al en estos pacientes son las soluciones de albúmina y otros constituyentes de soluciones intravenosas.

El dializado es una fuente potencialmente peligrosa, debido a que cuando los niveles de aluminio son superiores a los esperados de 2 $\mu\text{g/L}$, se produce la entrada de aluminio al paciente durante la hemodiálisis de una manera proporcional a la diferencia de concentración encontrada entre ambos (Douthat y col. 2006).

El agua de red puede estar cargada de impurezas y, aunque sea apta para el consumo humano, su utilización sin un adecuado control en la preparación de los líquidos de diálisis puede resultar potencialmente peligrosa. La cantidad de aluminio encontrada en el agua de red suele ser proporcional a la cantidad de impurezas que contiene el agua, debido a que la potabilización del agua para consumo humano requiere el agregado de sulfato de aluminio.

Para evitar ésto, es importante mantener un buen funcionamiento del sistema de tratamiento del agua, especialmente en los equipos de ósmosis inversa, los cuales se encargan de eliminar la mayor parte del aluminio del agua de red. Si la ósmosis inversa presenta un funcionamiento deficiente, como en el caso de la saturación de las membranas del sistema de ósmosis, se produce el paso de elementos como el aluminio hacia el dializado (Douthat y col. 2006).

Una causa menos relevante es el contenido de aluminio en las sales utilizadas para preparar el concentrado de diálisis. Si bien las publicaciones sobre contaminación por esta vía son escasas, no podemos descartar este factor a la hora de estudiar el problema, debido a las dificultades existentes para separar el aluminio de la sal, especialmente por la amplia distribución y la abundante cantidad de aluminio presente en la naturaleza (Douthat y col. 2006).

La absorción de las soluciones ácidas de diálisis es una de las principales fuentes de toxicidad de Al. Algunos investigadores han encontrado que el Al se distribuye por el suero si la concentración en la solución de diálisis es superior a 14 g / L (Huang y col. 2000; Elshamaa y col. 2010).

A pesar de los bajos niveles de Al existentes en el líquido de diálisis, la acumulación de Al se produce frecuentemente en estos pacientes (<2 g / l).

Algunos estudios cinéticos (Elshamaa y col. 2010), mostraron la liberación de algunos elementos traza a partir de bobinas de diálisis desechables y dializadores Kiil. En estas investigaciones, los autores afirmaron que los pacientes pueden acumular elementos traza del líquido de diálisis a través de diferentes grados de unión a proteínas.

Por otra parte, los inyectables producen una contaminación mucho mayor que las formulaciones orales, y teniendo en cuenta la forma de administración, su papel en el aumento del nivel de Al en la sangre del paciente puede ser significativo (Bohrer y col. 2009).

El nivel de Al en los pacientes que recibieron medicación como el hierro, la insulina y eritropoyetina (EPO) en forma de inyectables, tres de los medicamentos más importantes y ampliamente administrado para los pacientes de diálisis, es elevado en comparación con los pacientes que no reciben estos productos. Esto demuestra que estas formulaciones inyectables pueden suponer una contribución importante a los niveles más altos de Al en sangre, principalmente en el caso de aquellas que se administran por vía intravenosa, que, de igual forma que para el dializado, no se enfrentan a barreras para entrar en el sistema circulatorio del paciente (Bohrer y col. 2009).

Las vacunas son otra fuente de aporte de Al (Vecchi y col. 2012). En muchas vacunas se añaden coadyuvantes para aumentar su inmunogenicidad y eficacia. Se han utilizado mucho como adyuvantes las sales de aluminio (alumbre) y se consideran generalmente inocuas. Sin embargo, las propiedades adyuvantes de las sales de aluminio presentan limitaciones, estando actualmente en fase de

evaluación una amplia gama de adyuvantes nuevos para su uso en vacunas nuevas o mejoradas.

La fuente enteral más importante la constituye los captadores intestinales del fosfato que contienen aluminio y el uso de medicamentos que contienen en su composición Al.

Las limitaciones de la dieta y de la diálisis para controlar la sobrecarga de fosfatos de los pacientes en diálisis obligan a buscar alternativas para controlar la hiperfosfatemia. Durante las décadas de los '70 y los '80, el uso de captadores orales del fosfato que contienen aluminio fue una solución para este problema debido a la eficacia del aluminio para unirse con el fosfato de los alimentos a nivel intestinal y evitar su absorción. Las sales de aluminio son probablemente los más potentes captadores intestinales de fosfato (Molony y col. 2005; Douthat y col. 2006; Da Silva y col. 2010). Sin embargo, los problemas relativos a la acumulación, como la rigidez arterial y los efectos tóxicos del Al, incluyendo osteomalacia y encefalopatía, nos hacen pensar que los pacientes en HD no deben utilizar aglutinantes de fosfato a base de Al (Weng y col. 2009, Elshamaa y col. 2010). Así pues, se deben de usar otros medios para combatir la hiperfosfatemia como los aglutinantes a base de calcio (carbonato o acetato).

Tanto el carbonato como el acetato de calcio son eficaces para tal fin, tal como se ha demostrado en un estudio comparativo acerca de la eficacia de ambos medicamentos (Douthat y col. 2006). En ese estudio, el acetato de calcio demostró reducir los niveles de fosfato con igual eficacia pero con la mitad de dosis de calcio necesaria para controlar la hiperfosfatemia. Sin embargo, la cantidad de calcio necesario para controlar la hiperfosfatemia es sustancialmente elevada y supera los 2 g recomendados por las normas K/DOQI.

Una alternativa muy eficaz y menos peligrosa es la utilización de Sevelamer, un captador oral del fosfato libre de aluminio y calcio que ha mostrado ser eficaz para disminuir los niveles de fosfato sérico en la población con ERC en hemodiálisis, con el beneficio adicional de disminuir los niveles de colesterol total y LDL-colesterol, lo cual además bajaría el riesgo de enfermedad vascular aterosclerótica. El Sevelamer ha demostrado que puede reducir la progresión de las calcificaciones coronarias y valvulares de enfermos en hemodiálisis, y según informes preliminares, la supervivencia de pacientes en diálisis tratados con Sevelamer en comparación con los tratados con los compuestos en base a calcio, es mayor en la población mayor de 65 años y que lo utiliza por un periodo superior a 24 meses para el primer caso. De esta manera, las principales formas

de prevenir la intoxicación por aluminio de los pacientes de diálisis es limitar la cantidad ingerida y controlar los niveles del agua utilizada para diálisis (Douthat y col. 2006).

No obstante si se analiza el valor coste-beneficio, se ve favorecido claramente el acetato de calcio como tratamiento de primera línea de elección para la hiperfosfatemia en pacientes en diálisis (Nolan y col. 2005; Bohrer y col. 2009).

El conocimiento de su fisiopatogenia y la consecuente implementación de medidas preventivas como el reemplazo del hidróxido de aluminio como captor oral del fosfato y el control de los sistemas de tratamiento del agua han permitido disminuir la incidencia de la acumulación de Al. Sin embargo, existen evidencias de que el problema no está del todo superado, por lo que aún existe el riesgo de intoxicación aluminica. (Douthat y col. 2006).

En la ausencia de una función renal adecuada, la absorción a través de los alimentos o medicamentos parece ser otro determinante significativo en la acumulación de Al y ésta es mayor con la edad y la duración de la enfermedad antes de someter al paciente al tratamiento de diálisis (Hou y col. 2010).

En la actualidad, la mayor parte del Al en estos pacientes proviene de la dieta y del empleo de aglutinantes de fosfato. En el año 2000, estudios realizados por Robertson demostraron que los pacientes mayores y aquellos de mayor duración (> 5 años) en HD presentan un mayor riesgo de toxicidad del Al.

Entre los medicamentos que pueden afectar a la acumulación de Al, debemos citar en primer lugar el Sucralfato (Moreno y col. 1999), principio activo del Urbal®, ampliamente usado para el tratamiento de úlceras por su carácter protector de la mucosas. Es un derivado aluminico de la sacarosa, que contiene 207mg de Al/g. Su administración por vía oral, da lugar a la absorción de pequeñas cantidades de Al. Estas cantidades pueden verse aumentadas si se ingiere conjuntamente con medicamentos antiácidos.

Otros medicamentos a tener en cuenta son las formulaciones que contienen hierro y calcio (Da Silvaad y col. 2010). Estas presentan un nivel más alto de Al, seguido del calcitriol (vit.D) y de las vitaminas del complejo B (Bohrer y col.2009).

El hierro, además de ser una de las formulaciones más contaminadas con este metal, indirectamente puede mejorar la absorción de Al. El Fe puede ser

administrado junto con otros complementos como ácido ascórbico, ácido succínico y citrato, siendo este último también usado para prevenir las náuseas causadas por el hierro. Estos agentes usados para mejorar la absorción de las reservas de hierro también puede promover o mejorar la absorción de Al, ya que tienen el mismo efecto complejante sobre el Fe y el Al. Se ha demostrado que el citrato es un factor importante en la toxicidad del Al al administrarse por vía oral.

La HD normalmente se realiza sobre pacientes que llevan asociadas diferentes medicaciones, las cuales dificultan una evaluación clara de la influencia de esta terapia como fuente de Al en sangre de los pacientes. Además, otras fuentes tales como el agua potable y los productos alimenticios, pueden jugar un papel significativo cuando la ingesta de Al a través de la medicación no es tan alta.

Tras 15 años de seguimiento de los niveles de aluminio, se ha encontrado un descenso de la concentración en suero y líquidos de diálisis en todos los parámetros estudiados. Sin embargo, un porcentaje elevado de muestras de suero y líquidos, contienen concentraciones de aluminio por encima de los niveles recomendados (Douthat y col. 2006).

En la mayor parte de estos estudios, si bien se encontraron niveles elevados de Al en suero, ninguno de los pacientes presentaron niveles tóxicos de Al (> 100 mg/l) (Pepper y col. 2011).

1.3.5.- SITUACIONES PATOLÓGICAS ASOCIADAS A NIVELES ELEVADOS DE AL EN EL ORGANISMO.

Aunque hasta hace pocos años, el Al era considerado como un elemento biológicamente inerte (Muller y col. 1997; Krewski y col. 2007; Hellstrom y col. 2008), un número cada vez mayor de investigaciones indican que este elemento es tóxico en los fluidos del cuerpo para el ser humano (Ganrot 1986, Devoto y Yokel 1994; Darbre 2006; Exley y col. 2007;.. Krewski y col. 2007; Feketea y col. 2012). En este sentido, se ha indicado que un exceso de este mineral puede causar graves enfermedades neurodegenerativas, ya que se ha visto que interfiere en muchos procesos enzimáticos claves, que controlan las funciones celulares básicas del cerebro (Wu y col. 2012).

En estudios realizados en animales de experimentación se pudo observar que, aparte de afectar al sistema nervioso, el aluminio afectaba también al

sistema reproductivo, a unas dosis inferiores a las de la ingesta semanal tolerable provisional (ISTP). Por este motivo, en el año 2006, el comité mixto de la Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y el Comité de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) de la Organización Mundial de la Salud (OMS), seguido en 2008 por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), estimaron necesario la evaluación nuevamente de la seguridad del Al (OMS, 2007; EFSA 2008). Fue entonces cuando la ISPT fue reducida a 1 mg/kg de peso corporal, incluyéndose en esta cantidad los aditivos alimentarios (Feketea y col. 2012).

El Al es una potente neurotoxina si se administra de forma continuada a recién nacidos prematuros en soluciones parenterales, causándoles discapacidad mental a los 18 meses (Comité de Nutrición de 1996; Klein y col. 2004; Dabeka y col. 2011). Además, el exceso de Al en la sangre es incorporado de forma selectiva a los huesos de los bebés, dando lugar a un hueso debilitado en su estructura (Bernardo y col. 2010).

No obstante, el mecanismo tóxico del Al no está claro hasta ahora porque los efectos de toxicidad de este mineral no dependen solamente de su concentración total, sino también de las múltiples especies bajo las cuales este metal puede aparecer, y que presentan distintos grados de toxicidad (Chen y col. 2010; Wilson, 2011).

Hay abundantes evidencias de que el ion (Al^{3+}) puede penetrar en los tejidos del cuerpo a través de la piel, los pulmones y el tracto gastrointestinal, produciendo daño en los órganos diana (Sun y col. 2011).

El Al es un factor de riesgo bien conocido por aumentar la morbilidad y la mortalidad entre los pacientes hemodializados de todo el mundo. Los efectos a largo plazo de la exposición continuada a aluminio en pacientes con enfermedad renal en etapa terminal sometidos a hemodiálisis (ESRD), dan lugar a la absorción y el almacenamiento de aluminio, lo que conduce a toxicidad celular. La acumulación de aluminio en los tejidos de pacientes en hemodiálisis crónica puede causar disfunción de algunos órganos.

La acumulación de elementos traza en el hueso de pacientes con insuficiencia renal en fase terminal, y la influencia global en la formación de los trastornos óseos secundarios tales como osteodistrofia renal, se ha estudiado extensamente (Navarro y col. 1992; D'Haese y col. 1999).

Parsons y col. (1971) demostraron concentraciones anormalmente altas de aluminio en el hueso en pacientes en tratamiento crónico de HD. Aifrey y col. (1976) atribuyeron el síndrome de demencia producido en hemodializados a una elevación de la concentración de aluminio en el cerebro de estos pacientes. Posteriormente, se ha establecido una clara asociación entre el aumento de las concentraciones de aluminio en el cerebro y la encefalopatía de diálisis (Kruger y col. 2007; Gu y col. 2009; Maha y col. 2011), así como el aumento de la concentración de Al en hueso (Li y col. 2011) y el daño hepático producido por este mineral (Yokel y col. 2000; Kumar y Gill, 2009; Poole y col. 2010).

La evidencia más directa de una asociación causal entre la diálisis-osteomalacia y la acumulación de aluminio en el hueso ha sido indicada en los estudios experimentales también llevados a cabo en humanos por Elshamaa y col. (2010), al haber determinado las concentraciones de aluminio en los huesos y en los distintos tejidos óseos (Da Silvaad y col. 2010; Azik y col. 2011; Li y col. 2011).

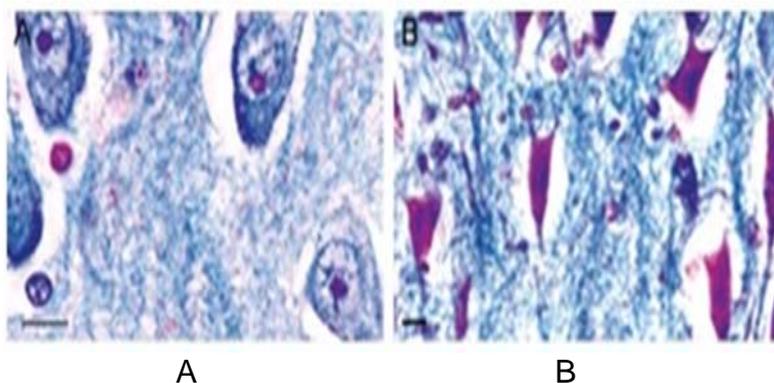
Las enfermedades óseas se producen por la inhibición de la mineralización ósea, por la formación ósea disminuida, por una menor masa ósea por causa de una disminución de la actividad osteoblástica, por la inhibición de la calcificación debido a la reducción de la síntesis de ADN por los osteoblastos, y/o por el efecto adverso en la síntesis de colágeno en la matriz de mineralización (Azik y col. 2011). Esta alteración del metabolismo mineral en el esqueleto está caracterizada por bajos niveles séricos de vitamina D y calcio, y por altos niveles de fósforo y hormona paratiroidea (PTH).

Esa acumulación en el cerebro y en el hueso puede causar en los pacientes en diálisis cuadros de encefalopatía, retraso del desarrollo neurológico y osteodistrofia renal. Los trastornos neurológicos conocidos como la demencia dialítica, responsable de numerosas muertes de pacientes en diálisis, son la razón por la cual se empezó a controlar los niveles de Al en pacientes sometidos a diálisis (Douthat y col. 2006).

La relación entre la exposición al Al y la enfermedad de Alzheimer (EA) en estos pacientes se ha debatido durante varias décadas (Ward y col. 2001; Campbell, 2002; Kruger y col. 2007; Maha y col. 2011), debido a la acumulación de Al en los ovillos neurofibrilares y las placas que se encuentran en los cerebros de estos sujetos. Se sabe que existen trazas de Al que atraviesan la barrera hematoencefálica acumulándose en las neuronas piramidales del hipocampo, la corteza y otras regiones vulnerables del cerebro, en la enfermedad de Alzheimer

(Walton y col. 2012). Se ha comprobado que, a lo largo de la vida, el aluminio se acumula en el cerebro en los mismos lugares donde este mineral se deposita normalmente durante la vejez, acumulación relacionada con los cambios celulares comparables a los que se dan durante el propio envejecimiento (Walton y col. 2012).

Figura 4. Corte histológico de las células piramidales del hipocampo cerebral de un sujeto con demencia (A) y de un sujeto en fase avanzada de Alzheimer (B), (Walton y col. 2012).



En la figura anterior podemos ver las células piramidales del hipocampo de dos cerebros humanos de la misma edad, teñidos los centros de acumulación del Al con magenta. En el corte histológico (A), perteneciente a un sujeto sin demencia, se ven teñidos algunos nucleolos que denotan la acumulación incipiente de Al característica de esta edad. Sin embargo, en el segundo corte histológico (B), perteneciente a un paciente con fase avanzada de Alzheimer, la tinción se produce en todo el núcleo y el citoplasma de las células piramidales, indicándonos el estadio avanzado de acumulación de este elemento.

Sin embargo, el papel preciso del Al en esta enfermedad no se conoce aún (Gupta y col. 2005; Walton y col. 2006). Sí se sabe que las personas con la enfermedad de Alzheimer y el síndrome de Down, tienen una mayor capacidad de absorción y de almacenamiento de Al (Wu y col. 2012). Por todo ello, el mecanismo tóxico de este elemento no ha sido aclarado hasta el momento, ya que los efectos biológicos y de toxicidad del Al no dependen solamente de su concentración total, sino también de las especies de éste existentes (Chen y col. 2010). Por lo tanto, la especiación de Al en fluidos corporales humanos, es de gran importancia en la química analítica y campos biomédicos, dada la diferente influencia de las distintas especies de este elemento en su biodisponibilidad y toxicidad.

La relación con la demencia que se produce en la diálisis (Gupta y col. 2005; Edwards, 2006) y con las enfermedades óseas graves si es indiscutible que está asociada a los niveles de aluminio y, por lo tanto, es necesario realizar mediciones en suero de Al para monitorizar los sujetos sometidos a hemodiálisis (Kruger y col. 2007).

Diversos estudios han confirmado que la utilización de altas dosis de aluminio por tiempo prolongado produce su acumulación en el sistema hematopoyético (Zhang y col. 2011) y paratiroideo, ocasionando severos trastornos clínicos como anemia microcítica e hipoparatiroidismo (Douthat y col. 2006).

La sobrecarga alumínica ha representado un serio problema para los pacientes en diálisis. El conocimiento de su fisiopatogenia ha permitido disminuir su incidencia. Sin embargo, el problema no está del todo superado, por lo que los controles deben seguir realizándose habitualmente.

Hay estudios que muestran que los niveles séricos de hormona paratiroidea tenían una correlación positiva con los niveles séricos de Al, lo que significa más osteítis tras la hemodiálisis de mantenimiento, que potencia la deposición de aluminio en los huesos y es un factor de riesgo para la osteítis fibrosa (Elshamaa y col. 2010).

Una sobrecarga de aluminio deprime la hematopoyesis y tiene un efecto inhibitor sobre varias enzimas importantes en el metabolismo del hierro en pacientes en diálisis, pero la gravedad de la anemia depende del grado de la sobrecarga de aluminio (Elshamaa y col. 2010; Sun y col. 2011).

Hay estudios que demuestran también efectos adversos sobre la función inmune, los niveles de hormona luteinizante (LH) y testosterona (T), inhibiendo el desarrollo testicular y la regulación de espermatogénesis (Sun y col. 2011).

Los trastornos del metabolismo de los minerales comienzan temprano en el curso de la insuficiencia renal crónica, y están asociados con la enfermedad cardiovascular y con una mayor mortalidad.

La enfermedad cardiovascular (ECV) es la principal causa de muerte en pacientes con ERC. La "American Heart Association" y el "National Cholesterol Education Adult Program-Treatment Panel III" han clasificado los pacientes sujetos a diálisis como de alto riesgo para enfermedades cardiovasculares. Además de los factores de riesgo CV tradicionales demostrados por el

“Framingham Heart Study” (por ejemplo, hipercolesterolemia, diabetes mellitus e hipertensión), los pacientes con enfermedad renal crónica en estadio 5 están expuestos a factores de riesgo no tradicionales, como la calcificación vascular y el aumento de la rigidez arterial, condiciones que puede contribuir a su perfil de riesgo CV (Kestenbaum y col. 2007).

El Al sistémico interfiere en la distribución de metales esenciales. Esto conduce a un aumento adicional del estrés oxidativo que, por consiguiente, afecta a la respuesta inflamatoria y a la función del sistema inmune a largo plazo.

Los pacientes en hemodiálisis a largo plazo tienen un estatus más alto de estrés oxidativo que los controles sanos y tienen un desequilibrio importante en las defensas antioxidantes, que se traduce en una disminución total de la capacidad antioxidante. Así, disminuyen significativamente los niveles de antioxidantes como la vitaminas C y E. Aunque el Al no tiene capacidad redox, puede desencadenar un aumento en los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS). Interacciones entre el Al y algunos metales traza esenciales como Fe, Zn y Se pueden interferir con las actividades de las enzimas. Los pacientes en hemodiálisis tienen una elevada concentración de PCR (“Polymerase Chain Reaction”) en la sangre, lo que refleja inflamación y desnutrición (Guo y Wang 2011).

En conclusión, las concentraciones significativamente elevadas de Al en pacientes hemodializados pueden ser responsables de disminuir la capacidad antioxidante de la sangre, de aumentar el estrés oxidativo y aumentar la inflamación (Guo y Wang 2011).

1.3.6.- NIVELES DE AL EN PACIENTES CON INSUFICIENCIA RENAL Y SU RELACIÓN CON OTROS FACTORES.

Las concentraciones en sangre de algunos metales raramente se miden en pacientes sometidos a diálisis. En particular, no se suelen realizar determinaciones de Al, ya que no se sabe que sea esencial para los procesos vitales y puede actuar como un tóxico. Aunque la intoxicación por Al puede ser evitada con la purificación del agua, los pacientes sometidos a hemodiálisis o diálisis peritoneal todavía tienen un aumento significativo en la sangre de las concentraciones de Al (Guo y Wang, 2011).

En los pacientes con insuficiencia renal se ha encontrado un aumento significativo de la concentración plasmática de Al, antes ($51,76 \pm 39,6$ mg / L) y después de la diálisis ($50,07 \pm 26,76$ g / l) en comparación con el grupo de control sano de voluntarios ($22,09 \pm 7,35$ mg / l) (Nenchev y col. 2007).

En cuanto a la relación con otros metales (Guo y Wang, 2011), se encontró que los pacientes tenían una fuerte asociación entre el aumento de la concentración de Al en plasma y una disminución de las concentraciones de Se y Zn. A largo plazo, los pacientes en hemodiálisis tenían significativamente menores concentraciones en sangre de Se o Zn. Tanto Se y Zn no se encuentran en los líquidos efluentes, aunque en estos estudios hay algunos resultados contradictorios.

Se han encontrado también bajos niveles de calcio. Sin embargo, hemos de tener en cuenta que el aluminio se encuentra en concentraciones elevadas en la mayoría de las fuentes de suplementos de calcio masticables (Da Silvaad y col. 2010).

Claramente se encontró una relación negativa entre los niveles séricos de Al y Fe, lo que sugiere interacciones que se producen entre el Al y metales traza esenciales en los pacientes en hemodiálisis.

En conclusión, las concentraciones significativamente elevadas de Al en pacientes hemodializados pueden ser responsables de interrumpir el estado de metales traza esenciales (Guo y col. 2011).

Hou y col. (2010) han indicado que los niveles séricos de Al en pacientes sometidos a hemodiálisis tienen una correlación significativa con la edad ($r = 0,148$, $p = 0,008$), el calcio sérico ($r = 0,224$, $p = 0,001$), y la preferencia de alimentos [(carne ($r = 0,18$, $p = 0,002$), vegetales y frutas ($r = -0,201$, $p = 0,012$)]. Curiosamente, el nivel sérico de Al tanto en pacientes hemodializados como en no hemodializados estuvo significativamente influenciado por transfusiones de sangre ($p < 0,05$), tratamiento con Epo ($p < 0,001$) y la administración de Vit D ($p < 0,001$), al igual que la duración de la enfermedad y nivel de creatinina sérica en los pacientes no hemodializados ($r = 0,412$, $p < 0,0001$, $r = 0,452$, $p < 0,001$, respectivamente) (Hou y col. 2010).

2.- OBJETIVOS.

El organismo humano es una máquina perfectamente regulada desde el punto de vista homeostático que se altera en determinadas condiciones, tales como pueden ser ciertas situaciones patológicas. Entre éstas, la insuficiencia renal crónica conlleva la necesidad de la hemodiálisis de forma regular con el fin de poder garantizar la viabilidad de estos enfermos y mantener ese equilibrio homeostático. Tanto la patología en sí, como la hemodiálisis a la que estos pacientes han de someterse, influyen en la regulación homeostática del organismo, alterando ciertos parámetros bioquímicos y nutricionales. Por todo lo expresado con anterioridad, en el presente estudio, pretendemos evaluar en qué medida los niveles séricos de Zn, Cu, la correlación Cu/Zn y de Al, se ven afectados por la patología, así como sus modificaciones durante un seguimiento longitudinal de 2 años.

Igualmente estudiaremos en estos pacientes con insuficiencia renal la incidencia de esta patología y de la terapia mediante hemodiálisis en los principales parámetros bioquímicos plasmáticos, así como la aparición de posibles alteraciones de éstos que pudieran estar relacionadas con el metabolismo del Zn, Cu, balance Cu/Zn y Al.

En el caso del Zn, son múltiples las referencias bibliográficas que indican que sus niveles séricos disminuyen en pacientes en hemodiálisis (Miura y col., 1999; Vanholder y col., 2002; Ribeiro y col., 2004; Hsieh y col., 2005; Navarro-Alarcón y col., 2006; Sahin y col., 2009; Tonelli y col., 2009; Rucker y col., 2010). Se sabe que la deficiencia en este elemento es una causa importante de enfermedad en los países en desarrollo (Shrimpton y col., 2005) y se asocia con retraso en la cicatrización (Prasad, 1998) y con deficiencias del sistema inmune, caracterizadas por una proliferación celular alterada, por la función anormal de las células T, por defectos en la fagocitosis y por la expresión anormal de citoquinas (Shankar y col., 1998; Rink y col., 2000), todo lo cual podría contribuir al exceso de riesgo de infección observada en pacientes en hemodiálisis (Collins y col., 2005; Ishani y col., 2005). La deficiencia de Zn también puede causar o contribuir a otras alteraciones comúnmente observadas en pacientes sujetos a hemodiálisis, como la anorexia (Halliwell, 1982), dispepsia (Markovits y col., 1990), y el deterioro de la función cognitiva (Ortega y col., 1997).

En cuanto al Cu, no existe unanimidad en cómo se alteran sus niveles séricos en pacientes en hemodiálisis, existiendo investigadores que indican la no alteración de éstos (Hosokawa y col., 1984; Zime y col., 1988), aunque en la

mayoría de los estudios se indica que se produce un incremento (Navarro-Alarcón y col., 2006; Ari y col., 2011; Ikee y col., 2012; Guo y Wang, 2013). Los niveles elevados de este mineral dan lugar a una acumulación en distintas células y tejidos como hígado, cerebro, riñones y córnea (Propst y col., 1995; El-Youssef, 2003; Franchitto y col., 2008), produciendo enfermedad hepática crónica y/o alteraciones neurológicas o psiquiátricas. La pérdida de la homeostasis de Cu puede conducir a la producción de especies reactivas de oxígeno que pueden provocar el desarrollo de distintas enfermedades (Evelyn Tiffany-Castiglioni y col., 2011).

Los pacientes con enfermedad renal sometidos a diálisis tienen mayor relación Cu/Zn que los controles (Guo y col., 2011). Estos autores han señalado recientemente, la relación entre el cociente Cu/Zn, el estrés oxidativo, la inflamación y las anomalías inmunes en pacientes de diálisis peritoneal. A pesar de que el mecanismo todavía se desconoce, las correlaciones Cu/Zn más elevadas pueden originar un incremento del estrés oxidativo e inflamación (Ikee y col., 2012). Por otro lado, se piensa que la relación Cu/Zn está asociada con la aterosclerosis en la arteria carótida (Ari y col., 2011).

Por último, en referencia al Al, no hay muchos estudios sobre cómo se ven afectados sus niveles séricos en pacientes sometidos a hemodiálisis, aunque los estudios existentes indican un incremento de las concentraciones, desconociéndose por el momento el origen del mismo (Nenchev y col., 2007; Bohrer y col., 2009; Pepper y col., 2011; Christie y col., 2011; Guo y col., 2011b). Se ha indicado que el Al en concentraciones elevadas se acumula en distintos órganos, pudiendo causar graves enfermedades neurodegenerativas (Wu y col., 2012), osteodistrofia (Elshamaa y col., 2010), anemia microcítica e hipoparatiroidismo (Douthat y col. 2006; Zhang y col. 2011). En otros estudios se ha referido que los altos niveles de este metal pueden ser responsables de disminuir la capacidad antioxidante en la sangre, aumentando el estrés oxidativo y la inflamación (Guo y col. 2011).

Adicionalmente, es importante establecer los requerimientos de micronutrientes en cada individuo para que éstos se ajusten a sus necesidades, como habría también de realizarse en pacientes en hemodiálisis. Este trabajo se enmarca dentro de un proyecto global en el que se están analizando los diferentes niveles de micronutrientes en pacientes hemodializados, con el objetivo de poder diagnosticar las alteraciones metabólicas y diseñar pautas nutricionales

adecuadas para paliar los desequilibrios nutricionales existentes en la población sujeta a hemodiálisis.

Por otra parte, la correcta monitorización de los niveles séricos de micronutrientes se dificulta por su elevado coste, falta de tecnología, y escasez de marcadores que reflejen su situación en el organismo.

Como **hipótesis de partida** del estudio y, considerando que la propia patología renal influye en los niveles séricos de sales minerales, pretendemos demostrar que la intervención mediante hemodiálisis en pacientes con insuficiencia renal altera el equilibrio sérico y la regulación homeostática del Zn, Cu, balance Cu/Zn y Al. Como **segunda hipótesis**, se establece que las complicaciones asociadas a la insuficiencia renal, la edad, el sexo, el trasplante renal y el uso de ciertos medicamentos empleados en el tratamiento de las patologías asociadas a la insuficiencia renal, pueden alterar igualmente la regulación homeostática corporal de los distintos minerales estudiados en el suero de los pacientes sometidos a hemodiálisis con insuficiencia renal.

Por todo ello, en el diseño del presente estudio nos planteamos los siguientes objetivos:

- 1.- Puesta a punto de las técnicas analíticas de espectrometría de absorción atómica (EAA) para la determinación de los niveles séricos de Cu y Zn por atomización a la llama (EAA-LL), y de los de Al por atomización con horno de grafito (EAA-HG) o atomización electro térmica.
- 2.- Determinación de los niveles séricos de Zn, Cu y Al en pacientes con insuficiencia renal sometidos a hemodiálisis y en los controles sanos seleccionados.
- 3.- Cálculo de los balances Cu/Zn en pacientes y controles sanos.
- 4.- Monitorización y estudio longitudinal durante 2 años (4 muestreos) de las variaciones de los niveles séricos de Zn, Cu, balance Cu/Zn, y de Al. Adicionalmente, se controlarán múltiples parámetros bioquímicos y nutricionales (n= 26) en pacientes hemodializados.
- 5.- Evaluación de la influencia de los factores edad, sexo, etiología de la insuficiencia renal, consumo de medicamentos y consumo de

suplementos, en los niveles séricos de Zn, Cu, balance Cu/Zn, y de Al en enfermos.

- 6.- Estudio de la correlación entre los niveles de los diferentes parámetros bioquímicos analizados con las concentraciones séricas de Cu, Zn, balance Cu/Zn y de Al en pacientes.

El objetivo final de este estudio debe dirigirse a conocer y profundizar sobre el metabolismo de estos minerales en pacientes hemodializados y poder proponer mejoras en los hábitos nutricionales de los enfermos, tales como la utilización de suplementos nutricionales o la formulación de dietas específicas para éstos.

3.- PARTE EXPERIMENTAL.

En la actualidad, podemos considerar la espectrometría de absorción atómica en sus diferentes modalidades de atomización como una de las técnicas analíticas más adecuadas por su sensibilidad, rapidez, exactitud y precisión para el análisis de elementos traza (Caurant, 1994). Sin embargo, la detección y cuantificación de los elementos en cantidades traza es muy delicada, debido a los riesgos de contaminación o de pérdidas existentes tanto durante el pretratamiento de la muestra, como durante el propio análisis (Navarro, 1991). Por estos motivos, el analista debe esforzarse en minimizar los errores a todos los niveles y asegurarse de la calidad de sus determinaciones con el uso de controles internos (muestras de referencia) y externos (ejercicios de calibración interlaboratorios). Por otro lado, en el propio laboratorio de análisis también deben realizar controles de carácter periódico en días diferentes, al objeto de comprobar si se producen o no cambios en las medidas de las características analíticas del método.

3.1.- MATERIAL.

3.1.1.- APARATOS Y MATERIAL.

APARATOS

- Sistema Milli-Q de obtención de agua de grado reactivo Waters, mod. R015 (Waters, Medford, USA).
- Placa de mineralización Multiplaces Selecta.
- Balanza de precisión Mettler AE-200.
- Estufa de desecación Selecta, mod. 210.
- Congelador Ariston.
- Espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer 1100 B equipado con una unidad de Horno de Grafito mod. HGA-700 con corrector de fondo continuo de deuterio Perkin-Elmer (Germany).
- Campana de gases Burdinola.
- Lámpara de cátodo hueco de Al Perkin Elmer.
- Lámpara de cátodo hueco de Zn Perkin Elmer.
- Lámpara de cátodo hueco de Cu, Perkin-Elmer.

MATERIAL

- Material de vidrio de calidad contrastada.
- Tubos de polietileno cristalino, provistos de cierre hermético.
- Recipientes de polietileno.
- Guantes desechables.

Todo el material empleado se lavó previamente varias veces con agua destilada, manteniéndose a continuación en una disolución de ácido nítrico al 30% durante 24 horas. Seguidamente se enjuagó abundantemente con agua desionizada y se secó a temperatura ambiente en el caso del material aforado o de polietileno, o bien en estufa a 90-100°C. Finalmente hasta el momento de su utilización, se almacenó en lugar limpio, seco y apartado de posibles contaminaciones (Jiménez y col., 1984; Laserna, 1985).

El agua empleada, que debe tener una resistividad inferior a 18 MΩ/cm, estuvo constantemente monitorizada. En todo momento, se usaron guantes desechables (Savory y Wills, 1992).

3.1.2.- REACTIVOS Y DISOLUCIONES.

REACTIVOS

Todos los reactivos utilizados han sido de calidad analítica:

- ▶ Agua bidestilada de grado reactivo (Milli-Q).
- ▶ Acido nítrico 65% p/v. Merck.
- ▶ Acido perclórico 60% p/v. Merck.
- ▶ Acido clorhídrico 25% p/v. Merck.
- ▶ Triton X-100. Merck.
- ▶ Nitrato magnésico. Merck.
- ▶ Patrón de referencia estándar con un contenido certificado en Zn y Cu (Certified Reference Material Human Serum Chengdu Shuyang Medicion Factory, Chengdu, China; National Research Center for CRM'1, Beijing, China; United Analysis and Measurement Center of Sichnan, Chengdu, China).
- ▶ Patrón de referencia estándar con un contenido certificado en Al [National Institute of Standards and Technology (NIST) standard reference material (SRM) 1598 (bovine serum)].

- ▶ Patrón de referencia certificado en Zn y Cu [Contox Trace Serum Metal Control A Level I, Kaulson Laboratories Inc. (NJ, USA)].

DISOLUCIONES

- ▶ Disolución estándar de Cu de 1000 mg/l (Tritisol, Merck).
- ▶ Disolución estándar de Zn de 1000 mg/l (Tritisol, Merck).
- ▶ Disolución estándar de Al de 1000 mg/l (Tritisol, Merck).

El resto de las disoluciones de estándares se prepararon por dilución a partir de éstas.

- ▶ Disolución de HNO₃-HClO₄ (4:1).

3.1.3.- MUESTREO Y TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS.

Las muestras de sangre y los sueros correspondientes fueron recogidas en un número de 116 para los pacientes con insuficiencia renal sometidos a hemodiálisis y 50 adultos sanos como controles, por el Servicio de Análisis Clínicos del centro hospitalario del área Nordeste de la provincia de Granada (Hospital de Guadix). Para los enfermos se realizaron 4 muestreos a lo largo del estudio longitudinal, practicado durante los años 2000 y 2001. Adicionalmente se recogieron 76 muestras correspondientes a pacientes que desgraciadamente fallecieron durante la realización del estudio longitudinal, por lo que no se consideraron a la hora de realizar el mismo. Previamente a proceder a la recogida de las muestras, se informó al Comité de Ética del Hospital de la realización del estudio, que procedió a la concesión del permiso necesario para la ejecución de éste.

Las muestras de sangre obtenidas para la patología objeto de este estudio fueron recogidas previa revisión de los diagnósticos clínicos, de los pacientes de ambos sexos, que acudieron al Laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital de Guadix.

De forma global en la tabla 7 se detallan los factores empleados como criterio de clasificación de las muestras de los enfermos con insuficiencia renal, tales como el muestreo, sexo, haber sido sometidos a trasplante, etiología, grupo de edad, y consumo de diferentes fármacos y suplementos. Se pretende estudiar

la posible influencia que los factores descritos pueden ejercer en los niveles de los minerales, pruebas bioquímicas y parámetros nutricionales determinados en las muestras sanguíneas de los enfermos considerados en el presente estudio.

TABLA 7. Factores y unidades incluidas en éstos, cuya influencia sobre las variables consideradas hemos estudiado en el presente trabajo.

FACTORES	UNIDADES
MUESTREO	1º, 2º, 3º, 4º
SEXO	Hombre, Mujer
TRASPLANTES	Sí, No, Deceso
GRUPO DE EDAD	<30 años, 30 a <40 años, 40 a <50 años, 50 a <60 años, 60 a <70 años, 70 a <80 años, 80 a <90 años
ETIOLOGÍA	Glomerulonefritis, Glomerulonefritis membranosa proliferativa, Nefritis intersticial, Nefroangioesclerosis, Vasculitis, Nefropatía gotosa, Nefropatía por analgésicos, Nefropatía por antibióticos, Nefropatía por carnitina, Nefropatía poliquística, Nefropatía por diabetes, Pielonefritis, Enfermedad de Good Pasture
CONSUMO DE MEDICAMENTOS Y SUPLEMENTOS	Antianémicos, Suplementos de K y P (anti K y P), Diuréticos, Gástrico, Vasodilatadores, Antihipertensivos, Psicotropos, Cortisona, Sangre, Cerebro, Plaquetas, Gota, Colesterol, Factor B-K, Corazón, Prevención de infartos.

3.1.3.1.- IDENTIFICACION Y CODIFICACION DE LAS MUESTRAS.

Para la identificación y cuantificación de las muestras de los individuos con insuficiencia renal, se confeccionó una ficha en una base de datos, en la que cada muestra tenía un código único que contaba de 9 dígitos en función de la información disponible.

a. Primer, segundo y tercer dígito.

Corresponden a las iniciales del nombre y apellidos

b. Cuarto dígito (sexo).

(0) Mujer

(1) Hombre

c. Quinto y sexto dígito (etiología de la insuficiencia renal).

(1) Glomerulonefritis

(2) Glomerulonefritis membranosa proliferativa

(3) Nefritis intersticial

(4) Nefroangioesclerosis

(5) Vascular

(6) Vasculitis

(7) Nefropatía gotosa

(8) Nefropatía por analgésicos

(9) Nefropatía por antibióticos

(10) Nefropatía por carnitina

(11) Nefropatía poliquística

(12) Nefropatía por diabetes

(13) Pielonefritis

(14) Enfermedad de Good Pasture

d. Séptimo, octavo y noveno dígito (orden de entrada en el estudio).

3.1.3.2.- EXTRACCION, CONSERVACION Y TRANSPORTE.

Las muestras de sangre fueron obtenidas en ayunas de más de 8 horas, a través de venopunción en las venas basílica y cefálica del antebrazo, en tubos sin anticoagulante, para obtener suero, con separador de gelosa y calibrados con vacío para obtener 5 c.c. de sangre total. Los tubos de extracción, después de que se produjera la coagulación espontánea de la sangre, fueron centrifugados a 3000 x g, durante 10 minutos. Para su conservación, se procedió a la obtención de una alícuota de 1 ml de suero aplicándole el código identificativo. Las muestras de suero fueron congeladas a -25°C hasta el momento del transporte al Departamento de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada. El transporte se realizó respetando el estado de conservación y sin que en ningún momento se perdieran las condiciones de almacenamiento antes mencionadas.

3.1.4.- MATERIAL INFORMÁTICO.

El procesador de textos usado ha sido el Microsoft Office Word.

El programa utilizado para el estudio estadístico de los resultados ha sido el SPSS 15.0 para Windows.

La impresión se ha llevado a cabo con una impresora Hewlett Packard LaserJet.

3.2.- MÉTODOS.

3.2.1.- CALIBRACIÓN.

Al igual que otras técnicas analíticas, la espectroscopia de absorción atómica (EAA) requiere un proceso de calibración.

En el presente trabajo, se ha comprobado la no existencia de interferencias de matriz para la determinación de los 3 minerales ensayados en las muestras, por lo que se ha empleado el procedimiento calibración lineal para cada una de ellas. Se ha comprobado que las pendientes de las ecuaciones de la recta correspondientes eran semejantes y no significativamente diferentes a las de la recta de calibración lineal obtenida a partir de las disoluciones estándares de los 3 minerales (Tabla 8).

TABLA 8. Valores de los parámetros de las ecuaciones de las rectas de calibración lineal y de adición calibración para la determinación de Zn, y Cu en muestras de suero: comparación estadística de las pendientes (Absorbancia: $a+b$ [Elemento]).

Elemento	Recta de calibración lineal		Recta de adición calibración		p
	a (ordenada en el origen)	b (pendiente)	a (ordenada en el origen)	b (pendiente)	
Zn (ppm)	-0.0024	0.2618	0.0533	0.2615	>0.05 (NS)
Cu (ppm)	-0.0012	0.0685	0.0138	0.0660	>0.05 (NS)
Al (ppb)	0.0002	0.0246	0.0004	0.0252	>0.05 (NS)

Para la medida de Cu y Zn, y ante la comprobación de la no existencia de interferencias de matriz en las muestras de suero (Tabla 8), se empleó el procedimiento de calibración lineal mediante el establecimiento de las

correspondientes rectas patrón de Cu y Zn, resultantes de la correlación de las lecturas de absorbancia obtenidas en el espectrofotómetro con las concentraciones de estos elementos respectivamente.

3.2.2.- PREPARACION DE LAS RECTAS DE CALIBRADO.

A partir de las disoluciones estándar de 1.000 ppm de los distintos elementos determinados (Cu, Zn y Al), se prepararon por diluciones sucesivas con agua bidestilada o HNO₃ al 1.0% (v/v) y en agua bidestilada para el Al las disoluciones de diferentes concentraciones en estos elementos.

Todas las disoluciones se prepararon en el momento de proceder a la medida. Asimismo, se midieron previamente los correspondientes blancos, que conteniendo todos los reactivos utilizados se sometieron a todo el procedimiento analítico empleado en las muestras.

En este procedimiento de calibración se representa la medida espectrofotométrica de la absorbancia expresada en altura de pico frente a la concentración del analito.

3.2.3.- APLICACIÓN DEL MÉTODO DE ADICIÓN DE PATRÓN.

Para comprobar el efecto de la matriz sobre las señales correspondientes al aluminio, cobre y cinc se aplicó, en las condiciones señaladas a continuación, el método de adición de patrón.

Para el Zn y el Cu, también se tomaron 5 alícuotas de 0,400 ml de suero, a las que se les adicionaron cantidades crecientes de las disoluciones patrón de Zn (1 ppm) y Cu (1 ppm) comprendidas entre 0,100-0,400 ppm para ambos elementos, antes de diluir al volumen final con agua bidestilada.

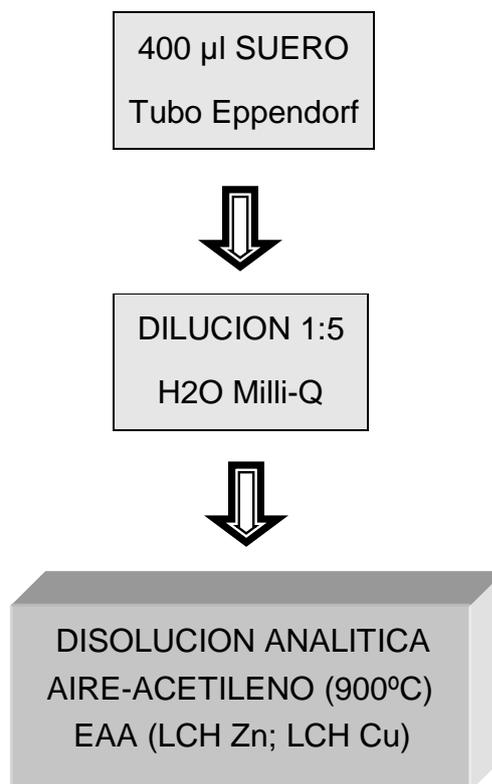
Para el Al, también se tomaron 5 alícuotas de 10 µl de suero, adicionándose en el modificador de matriz cantidades crecientes de la disolución patrón de Al (50 ppb) comprendidas entre 5-15 ppb, antes de ser el modificador de matriz inyectado en la muestra de suero dispuesta previamente en el interior del tubo de grafito.

3.2.4.- FASE PREINSTRUMENTAL.

3.2.4.1.- PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE SUERO PARA EL ANÁLISIS DE Zn Y Cu.

Para el Zn y el Cu (Figura 5), se tomaron 0,400 ml de suero en un tubo Eppendorf (Reyes-Pérez, 2001) que fueron diluidos a una proporción (1:5) con agua Milli-Q. Las disoluciones analíticas obtenidas fueron aspiradas de forma directa a la llama de aire-acetileno del EAA, la cual facilitó la atomización de los compuestos de los que forman parte el Zn y el Cu en la matriz biológica, para la obtención de estos elementos en su estado fundamental (Zn, Cu), los cuales se sitúan por encima de la cabeza del mechero absorbiendo parte de la radiación de la lámpara de cátodo hueco de estos elementos. Las absorbancias obtenidas las vamos a contrastar frente a las curvas de calibración lineal para ambos elementos obtenidas para diluciones patrón distintas de estos elementos comprendidas entre 0,1-0,8 ppm para el Zn, y entre 0,050 y 0,700 ppm para el Cu, diluidas en glicerina al 5% en agua Milli-Q.

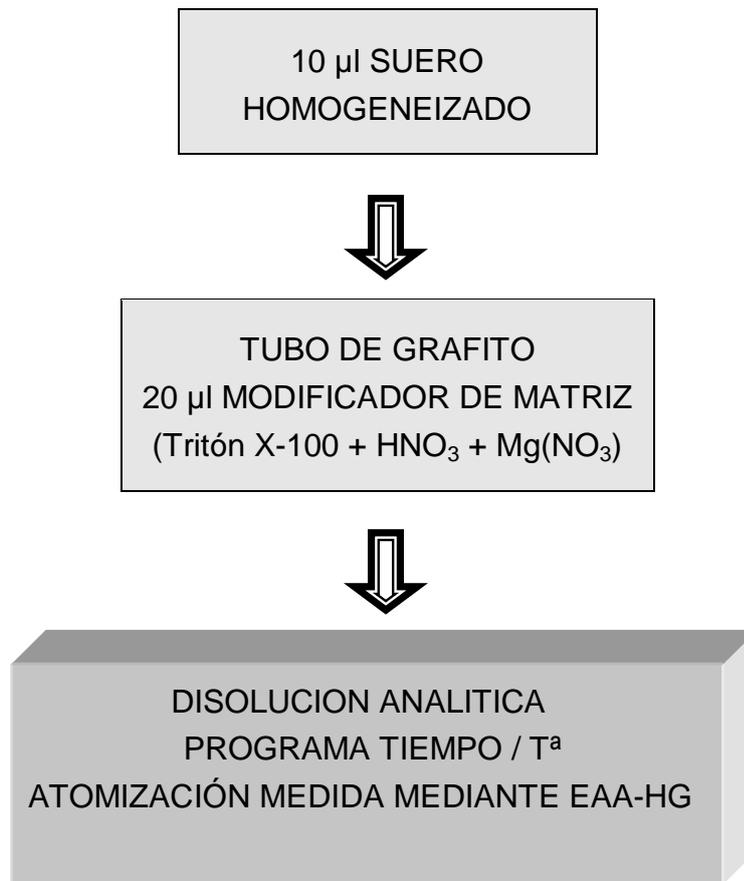
FIGURA 5.- Modelo operatorio para la determinación de Zn y Cu en muestras de suero.



3.2.4.2.- PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE SUERO PARA EL ANÁLISIS DE ALUMINIO.

Para la determinación de los niveles de Al (Figura 6), se tomaron 10 µl de suero que se inyectaron manualmente en el tubo de grafito del horno, para posteriormente inyectar el modificador de matriz constituido por 20 µl de Triton X-100 al 0,1% (v/v), HNO₃ al 0,2% (v/v) y Mg (NO₃) en una concentración de 1,15 g/l (m/v) (Kruger and Parsons, 2007).

FIGURA 6. Modelo operatorio empleado para la determinación del contenido en aluminio en muestras de suero humano.



3.2.4.3.- PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS SANGUINEAS PARA LA MEDIDA DE LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y NUTRICIONALES.

En los pacientes con insuficiencia renal se empleó una técnica de hemodiálisis convencional practicada con una frecuencia de 3 veces por semana, cada 48 horas aproximadamente. Sin embargo, durante el fin de semana el tiempo transcurrido hasta una nueva sesión de hemodiálisis fue de 72 h. El instrumento empleado a tal efecto fue de la marca comercial Fresenius. En la diálisis se empleó una disolución con una osmolaridad de 295 Ω /l con la siguiente composición: Na^+ (3218,6 mg/l), K^+ (58,6 mg/l), Mg^{2+} (12,2 mg/l), Cl^- (177,2 mg/l), HCO_3^- (2135,6 mg/l), $\text{H}_3\text{C-COOH}$ (240,2 mg/l), y glucosa (1000 mg/l), siendo el flujo de la diálisis de 800 ml/min.

3.2.5.- FASE INSTRUMENTAL.

3.2.5.1.- MEDIDA DE CINC y COBRE POR EAA A LA LLAMA, Y DE ALUMINIO POR EAA-HG.

Las condiciones instrumentales de medida se detallan en la siguiente tabla:

Tabla 9. Condiciones instrumentales de medida para Al, Zn y Cu.

PARÁMETROS	Al	Zn	Cu
Técnica	EAA con atomización electro térmica	EAA a la llama	EAA a la llama
Fuente de radiación: Lámpara de cátodo hueco	Al	Zn	Cu-Ni-Mn-Cr
Longitud de onda	309,3 nm	213,9 nm	324,7 nm
Resolución de rendija	0,7 nm	1,0 nm	1,0 nm
Intensidad de corriente de lámpara	25 mA	3 mA	5 mA
Lectura: Altura de pico (Abs/s)			
Nº de determinaciones / muestra	-	4	4
Retraso de aparición de señal		0,0 s	0,0 s
Tiempo de integración	6 s	1 s	1,0 s
Llama: aire-acetileno			
Flujo de aire	-	8,0 l/min	8,0 l/min
Flujo de acetileno	-	2,5 l/min	2,5 l/min
Temperatura de atomización		900°C	900°C
Flujo de argón	0-300 ml/min		

En la tabla 10, podemos ver el programa de tiempos y temperaturas empleados para la determinación de Al.

Tabla 10. Programa de tiempos y temperaturas optimizado para la determinación de Al mediante EAA-HG:

ETAPA	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO RAMPA (s)	TIEMPO MANTENIM. (s)	FLUJO ARGÓN (ml/min)
Secado	100	10	5	300
	120	5	45	300
Mineralización	800	10	5	300
	1200	1	25	300
Atomización	2400	0	5	0
Limpieza	2650	1	5	300
	20	5	5	300

3.2.5.2.- CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE CINC, COBRE Y ALUMINIO.

El estudio de las características analíticas permite evaluar la validez de los métodos empleados, y su puesta a punto para la matriz problema. Incluye:

- a) Sensibilidad.
- b) Selectividad.
- c) Límite de detección.
- d) Exactitud.
- e) Precisión.

a) Sensibilidad.

Se define como la concentración absoluta del elemento que produce un 1% de absorción y equivale a 0,0044 unidades de absorbancia. Es la denominada "concentración característica" y delimita la zona de trabajo al preparar la línea de calibrado. Se deduce a partir de medidas repetitivas de la absorbancia producida por un patrón de concentración determinada.

Para expresar la sensibilidad como masa característica (m_c), es decir, la masa del analito en nanogramos que genera una señal de 0,0044 unidades basta con aplicar la siguiente fórmula:

$$m_c = \frac{V \times C \times 0,0044}{A}$$

siendo:

V = volumen de la alícuota.

C = concentración de analito en la solución problema.

A = medida de absorbancia obtenida.

Los valores de sensibilidad obtenidos en nuestro estudio se indican en tabla 11.

TABLA 11. Valores de sensibilidad para las determinaciones de Cu, Zn y Al en suero humano.

ELEMENTO	SENSIBILIDAD EXPRESADA COMO M_c
Cinc	15 ng
Cobre	77 ng
Aluminio	12 pg

b) Selectividad.

La selectividad de los métodos de determinación de Cu, Zn y Al ha sido comprobada mediante el método de adición de patrón (método de adición-calibración).

Para los 3 minerales determinados Zn, Cu y Al, las ecuaciones de la recta correspondientes a la adición de estos elementos en las muestras problema y las obtenidas para los correspondientes patrones en medio acuoso, determinan que los valores de las pendientes son muy próximos y no estadísticamente diferentes entre sí lo que establece la no existencia de interferencias de matriz (Tabla 8).

c) Límite de detección.

El concepto de *límite de detección*, fundamentado en el tratamiento estadístico del análisis del blanco o disoluciones de referencia, fue adoptado por la I.U.P.A.C. en 1975 (IUPAC, 1978) y por el ACS en el año 1980 (ACS, 1980).

El límite de detección de un procedimiento analítico se puede definir como la menor concentración C_L , o cantidad q_L , que puede ser detectada en una disolución problema con una seguridad razonable, y se calcula utilizando la expresión:

$$C_L = \frac{K \times S_{BL}}{m}$$

en donde:

m = Sensibilidad analítica o pendiente de la recta de calibrado.

S_{BL} = Desviación Standard de las medidas de absorbancia de al menos siete disoluciones de referencia preparadas siguiendo el mismo procedimiento analítico.

K = Coeficiente que da la probabilidad de que una medida de la absorbancia sea debida a la presencia del analito en la disolución problema, y no a fluctuaciones del blanco ($A_L > S_{med} (BL) + K \cdot S_{BL}$), siendo A_L la absorbancia límite y $A_{med_{BL}}$ la absorbancia media del blanco. Un valor de $K=3$ permite un nivel de confianza del 99,86% (Long y Winefordner, 1983).

También se suele usar el concepto de *Límite de cuantificación*, que corresponde a una cantidad superior, de forma que el error debido al ruido de fondo del aparato o técnica sea mínimo; se establece como diez veces la desviación estándar.

Para calcular el límite de detección en las medidas, se prepararon 10 blancos, según el procedimiento recomendado (Long y Winefordner, 1983), y se midieron sus absorbancias (Tabla 12).

TABLA 12. Valores del límite de detección para las determinaciones de Cu, Zn y Al en suero humano.

ELEMENTO	LÍMITE DE DETECCIÓN
Cinc	11,6 ppb
Cobre	3,1 ppb
Aluminio	1,5 ppb

d) Estudio de la exactitud del método.

La exactitud se define como la proximidad entre el valor obtenido y el valor verdadero. Su cálculo nos permite comprobar que no se producen pérdidas ni contaminaciones durante el proceso seguido. Su determinación se puede llevar a cabo mediante:

d.1. El empleo de patrones con contenidos de analitos certificados por estudios de calibración interlaboratorios.

d.2. Estudios del porcentaje de recuperación de muestras, tras la adición de cantidades conocidas del elemento a determinar desde una disolución patrón de Zn, Cu o de Al, a varias fracciones iguales de una misma muestra y posterior sometimiento al procedimiento analítico completo. De esta forma, las cantidades de Zn, Cu o de Al determinadas en las muestras adicionadas se comparan con los valores resultantes de la suma de los niveles medios de Zn, Cu o de Al en la muestra sin adicionar y de las cantidades absolutas añadidas. Así pues:

$$\% \text{ Recuperación} = (A/B) \times 100$$

en donde:

A = cantidad (mg) del elemento determinada en las muestras adicionadas con analito a partir de una disolución patrón de éste.

B = cantidad (mg) del elemento presente correspondiente al contenido de las muestras más la cantidad adicionada.

d.3. La comparación de métodos, que es una herramienta para la investigación de la exactitud, donde los análisis de muestras independientes se comparan entre un método y otro considerado de referencia (Poppe y Baklok, 1989).

d.1. Contraste con un patrón certificado.

En el presente trabajo se han realizado estudios con los tres materiales de referencia, certificados en Cu, Zn y Al, anteriormente indicados.

Una vez reconstituidos los sueros, se prepararon 10 fracciones de igual volumen de los estándares certificados y se sometieron a los procedimientos analíticos de mineralización y determinación de Zn, Cu y Al. El valor medio así obtenido para cada determinación, se comparó con el correspondiente valor certificado (Tabla 13).

TABLA 13. Evaluación de la exactitud del método mediante el empleo de diversos patrones certificados para la determinación de Zn, Cu, y Al en suero.

ELEMENTO	MATERIAL DE REFERENCIA		
	NIST SRM 1598 bovine serum	Serum metal control A level I	CRM human serum Chengdu Suyang China
Cinc (mg/l)			
Determinado	-	0,789 ± 0,042	1,028 ± 0,283
Certificado	-	0,800 ± 0,060	1,030 ± 0,230
Cobre (mg/l)			
Determinado	-	0,916 ± 0,016	1,032 ± 0,075
Certificado	-	0,900 ± 0,075	1,050 ± 0,090
Aluminio (µg/l)			
Determinado	3,9 ± 1,5	-	-
Certificado	3,8 ± 0,9	-	-

d.2. Cálculo del porcentaje de recuperación.

Para su realización, se eligieron al azar dos muestras para cada uno de los minerales. Se les adicionaron cantidades crecientes de los elementos desde las soluciones patrón de trabajo y se sometieron al procedimiento analítico empleado. Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 14 y 15.

TABLA 14. Cálculo del porcentaje de recuperación para la determinación de Zn y Cu en dos muestras de suero humano.

ELEMENTO	CANTIDAD PRESENTE (mg)	CANTIDAD ADICIONADA (mg)	CANTIDAD ENCONTRADA (mg)	% RECUPERACIÓN MEDIO ± DE
Cinc	0,422	0,000-0,600	0,422-1,026	100,18 ± 0,21
	0,334	0,000-1,000	0,334-1,412	102,6 ± 4,30
Cobre	0,253	0,000-0,200	0,253-0,450	99,35 ± 0,63
	0,288	0,000-0,200	0,286-0,495	98,87 ± 0,85

TABLA 15. Cálculo del porcentaje de recuperación para la determinación de Al en dos muestras de suero humano.

ELEMENTO	CANTIDAD PRESENTE (ng)	CANTIDAD ADICIONADA (ng)	CANTIDAD ENCONTRADA (ng)	% RECUPERACIÓN MEDIO ± DE
Aluminio	9,3	0,00-20,00	9,2-28,9	99,33 ± 1,01
	35,4	0,00-20,00	35,2-55,9	100,15 ± 0,95

d.3. Estudio de precisión del método.

El término precisión hace referencia al grado de convergencia de los resultados generados por el método analítico. En él se incluyen los conceptos de repetitividad o precisión intralaboratorio, referida a la precisión cuando se realizan repeticiones en idénticas condiciones, y el de reproducibilidad o precisión interlaboratorio, si las repeticiones lo son en condiciones diferentes. Por lo tanto, la mayor concordancia entre determinaciones repetidas sobre una misma muestra evitará la posibilidad de errores aleatorios.

Para evaluar la repetitividad o precisión intralaboratorio, se eligieron al azar dos muestras de cada grupo y se efectuaron 10 preparaciones con 300 mg de

cada una de ellas. Todas ellas fueron sometidas al procedimiento de mineralización y a los procedimientos de medida descritos para cinc, cobre y aluminio en cada grupo de muestras.

Los datos obtenidos en cada serie de observaciones han sido sometidos a un tratamiento estadístico (Reyes Castañeda, 1980; Martín y Luna, 1989), a fin de establecer la media (X_m) y la desviación estándar (S) correspondiente a cada una de las muestras y para cada una de las determinaciones realizadas.

De esta forma, se pudo calcular el coeficiente de variación (CV) o desviación estándar relativa (RSD) y el intervalo del 95% de confianza, que expresa que el verdadero valor medio con un 95% de probabilidad se encontrará comprendido entre sus límites.

Se calculó también la desviación estándar media (S_m), y a partir de ella, el correspondiente error relativo (E.R.), mediante las siguientes expresiones matemáticas:

Desviación estándar media:

$$S_m = \frac{S}{V_n}$$

Coeficiente de variación:

$$C.V. = \frac{S}{X_m} \cdot 100$$

Error relativo:

$$E.R. = \frac{S_m \cdot t}{X_m} \cdot 100$$

El E.R. y el C.V., como medidas de dispersión, dan idea de la distribución de los datos de un análisis. Para un intervalo del 95% de confianza ($p= 0,05$), el valor verdadero medio con un 95% de probabilidad se encontrará entre los límites:

$$X_m \pm S_m \cdot t$$

Para $n = 10$ y un alfa = 0,05 el coeficiente "t" (Student) tiene un valor de 2,262.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio para las 10 medidas efectuadas en las diferentes muestras elegidas, se indican para los elementos estudiados en la tabla 16.

TABLA 16. Cálculo de la repetitividad del método en la determinación de Zn, Cu y Al en 2 muestras de suero humano.

ELEMENTO	MUESTRA 1		MUESTRA 2	
	X ± D.E.	C.V.	X ± D.E.	C.V.
Zn (ppm)	1,050 ± 0,027	2,57	0,788 ± 0,041	5,20
Cu (ppm)	1,129 ± 0,020	1,77	0,915 ± 0,015	1,64
Al (ppb)	10,7 ± 0,82	7,66	35,2 ± 2,3	6,53

3.2.6.- MEDIDA DE LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y NUTRICIONALES EN MUESTRAS SANGUÍNEAS.

La medida de los parámetros bioquímicos y nutricionales de las muestras sanguíneas obtenidas durante la diálisis de los pacientes fue realizada inmediatamente tras la recogida, en el laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital de Guadix mediante el empleo de un Analizador automático Hitachi 717 (Boeringher Mannheim, Germany).

4.- RESULTADOS Y ESTUDIO ESTADÍSTICO.

4.1.- RESULTADOS DEL ANALISIS DE LAS MUESTRAS.

En la tabla 17 se recogen los valores de concentración de Zn, Cu, correlación Cu/Zn y Al obtenidos al aplicar el método analítico propuesto a todas las muestras de suero analizadas pertenecientes a individuos sanos del grupo control y enfermos con insuficiencia renal sometidos a hemodiálisis.

TABLA 17. Concentraciones medias, desviaciones estándar, rangos y medianas de los niveles séricos de Zn, Cu, correlación Cu/Zn, y Al, determinados en pacientes sometidos a hemodiálisis y sujetos sanos como grupo control.

ELEMENTO	<i>n</i>	GRUPO	MEDIA ± DE	RANGO	MEDIANA
Zn (ppm)	464	Enfermos	0,727 ± 0,182	0,340-1,400	0,700
	50	Controles	1,212 ± 0,206	0,850-1,990	1,188
Cu (ppm)	464	Enfermos	1,022 ± 0,266	0,190-1,973	1,002
	50	Controles	1,084 ± 0,197	0,675-1,740	1,069
Correlación Cu/Zn	464	Enfermos	1,511 ± 0,596	0,360-4,930	1,389
	50	Controles	0,915 ± 0,207	0,540-1,510	0,905
Al (ppb)	464	Enfermos	39,54 ± 23,13	9,00-156,00	33,0
	50	Controles	9,57 ± 6,23	2,55-24,28	9,23

En la tabla 18 se incluyen los valores de los diferentes parámetros bioquímicos y nutricionales obtenidos al aplicar el método analítico propuesto a todas las muestras sanguíneas analizadas pertenecientes a enfermos con insuficiencia renal sometidos a hemodiálisis.

TABLA 18. Concentraciones medias, desviaciones estándar y rangos de los niveles sanguíneos de los parámetros bioquímicos y nutricionales determinados en pacientes sometidos a hemodiálisis.

PARÁMETRO	N	RANGO	MEDIANA	MEDIA ± DE
Glucosa (mg/dl)	464	52-185	88	120 ± 48
Creatinina (mg/dl)	464	2,3-64	96	9,8 ± 3,6
Urea (mg/dl)	464	37-264	145	147 ± 37
Ácido úrico (mg/dl)	464	2-73	72	7,8 ± 6,0
Triglicéridos (mg/dl)	464	13-481	106	123 ± 69
Colesterol total (mg/dl)	464	78-292	165	167 ± 43
Colesterol HDL (mg/dl)	464	8-106	41	44,4 ± 15,1
Colesterol LDL (mg/dl)	464	25-214	95,8	101,5 ± 36,0
GOT (U/l)	464	2-128	17	20,9 ± 15,8
GPT (U/l)	464	5,2-179	16	22,7 ± 22,2
Fosfatasa alcalina (U/l)	464	24-961	259	292 ± 172
P (mg/dl)	464	0,004-26	5,7	5,9 ± 2,1
He (g/dl)	464	0,9-21,9	6,0	6,56 ± 3,09
Proteínas (g/dl)	464	0,007-11,9	6,8	6,8 ± 0,9
Ca (mg/dl)	464	2,8-12,7	9,7	9,7 ± 1,0
Bilirrubina (mg/dl)	464	0,09-6,7	0,53	0,63 ± 0,59
GGT (U/l)	464	6,0-330	21	34,6 ± 41,0
CPK (U/l)	464	10-357	54	64,6 ± 47,4
LDH ((U/l)	464	17-1641	307	329 ± 129
Amilasa (U/l)	464	25-268	114	119,7 ± 50,9
Na (mEq/l)	464	126-146	139	139 ± 3,4
K (mEq/l)	464	3,5-100	5,3	6,1 ± 8,6
Cl (mEq/l)	464	76-242	97	97,0 ± 10,4
Ferritina (ng/ml)	464	10-1031	297	314 ± 238
PTH (pg/ml)	464	5-2775	274	444 ± 439

4.2.- ESTUDIO ESTADISTICO DE LAS CONCENTRACIONES DE CINCO, COBRE, CORRELACIÓN DE Cu/Zn Y ALUMINIO.

El estudio estadístico de los datos obtenidos en el presente trabajo, ha sido establecido a partir de los valores de las concentraciones de los minerales analizados (Zn, Cu y Al), de las correlaciones Cu/Zn, de los parámetros bioquímicos y los nutricionales, como variables de respuesta experimental determinados en las muestras sanguíneas y sueros de los enfermos con insuficiencia renal sometidos a hemodiálisis, con el fin de determinar la existencia o no de diferencias significativas para los distintos factores considerados (estudio longitudinal, sexo, etiología, grupo de edad, diagnóstico, trasplantes, deceso, consumo de suplementos y tipo de tratamiento) sobre dichas variables.

El paquete estadístico empleado a tal efecto ha sido el SPSS 15.0 para Windows, del que hemos utilizado el análisis estadístico de la varianza (ANOVA) unifactorial, habiéndose empleado el test de la t de Student para los métodos paramétricos con un nivel de significancia del 95% ($p < 0,05$) y el test de Kruskal-Wallis para los no paramétricos, con un nivel de significancia también de 95% ($p < 0,05$).

Previamente a la aplicación de un modelo paramétrico o no paramétrico para el análisis de la varianza se establecieron las características propias de los resultados experimentales obtenidos para la variable de respuesta. En primer lugar, se comprobó la normalidad de la distribución de los datos por el Test de Kolmogorov-Smirnov con un nivel de significancia del 5% ($p > 0,05$), y en segundo lugar, se determinó la homogeneidad de las varianzas mediante el Test de Levene para un nivel de significancia también del 5% ($p > 0,05$).

También se han realizado análisis de regresión entre las diferentes variables experimentales a fin de establecer la existencia o no de algún tipo de correlación significativa entre las mismas. Para ello, tras la comprobación de la distribución normal o no de los resultados mediante el test de Kolmogorov-Smirnov, se procedió a la ejecución del análisis de regresión mediante el test de Pearson ($p < 0,05$) para los métodos paramétricos, y el test de Spearman ($p < 0,05$) para los métodos no paramétricos.

En los minerales objeto de estudio, para los parámetros respecto a los cuales se observó la existencia de una correlación significativa en el análisis de regresión se indicó el tipo de regresión que facilitó un nivel de significancia y un coeficiente de correlación más adecuados.

4.2.1.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA VARIANZA PARA LOS NIVELES DE Zn, Cu Y Al, Y DE LA CORRELACIÓN Cu/Zn DE LOS CONTROLES SANOS FRENTE A LOS PACIENTES CON INSUFICIENCIA RENAL SOMETIDOS A HEMODIÁLISIS.

Tras la ejecución del test de Kolmogorov-Smirnov ($p= 0,000$ para el Zn; $p= 0,385$ para el Cu; $p= 0,022$ para el Al; y $p= 0,001$ para la correlación Cu/Zn) y el test de Levene ($p= 0,407$ para el Zn; $p= 0,007$ para el Cu; $p= 0,312$ para el Al; y $p= 0,000$ para la correlación Cu/Zn), en relación a la normalidad de distribución de los resultados y la homogeneidad de las varianzas, respectivamente, se aplicó el análisis de varianza correspondiente a los niveles séricos de los minerales y la correlación citados en los pacientes con respecto a los controles sanos, por métodos no paramétricos para el Zn, Cu, Al y correlación Cu/Zn (Tabla 19). Se comprobó que los niveles séricos de Zn eran significativamente superiores en los controles sanos. Por el contrario los de Al y las correlaciones Cu/Zn fueron estadísticamente superiores en los enfermos.

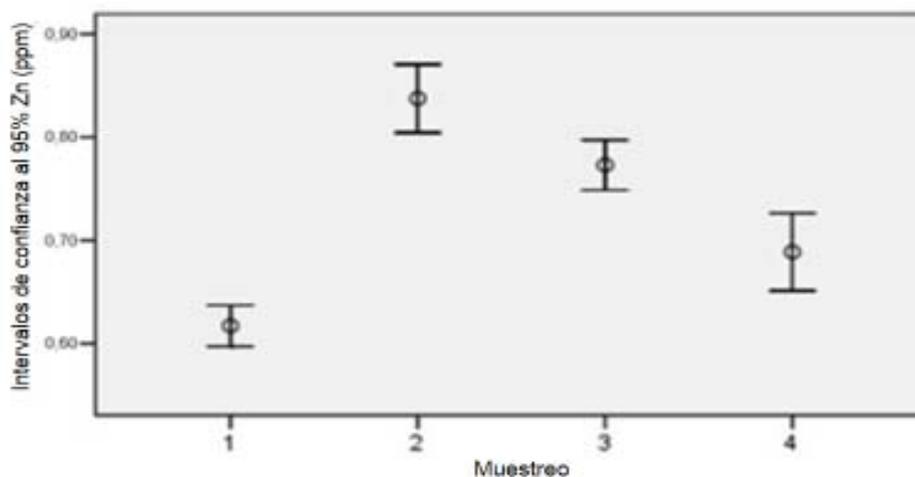
TABLA 19. Comparación de los niveles séricos medios \pm DE de Cu, Zn y Al en pacientes con insuficiencia renal frente a los controles sanos.

MINERAL	SIGNIFICANCIA	TEST	ENFERMOS (Media \pm DE, $n= 464$)	CONTROLES (Media \pm DE, $n= 50$)
Zn (ppm)	0,009	NP	0,728 \pm 0,182	1,211 \pm 0,206
Cu (ppm)	0,059	NP	1,022 \pm 0,266	1,084 \pm 0,196
Correlac Cu/Zn	0,000	NP	1,511 \pm 0,596	0,914 \pm 0,207
Al (ppb)	0,000	NP	39,54 \pm 23,13	9,57 \pm 6,23

4.2.2.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS NIVELES DE CINC, COBRE Y ALUMINIO, Y DE LA CORRELACIÓN Cu/Zn EN EL SUERO DE LOS PACIENTES EN EL ESTUDIO LONGITUDINAL.

Los resultados obtenidos mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de las varianzas ($p < 0,05$ para los 3 minerales) reflejaron la necesidad del empleo del test no paramétrico de Kruskal-Wallis (K-W) en el análisis de la varianza para los 3 elementos ensayados así como para la correlación Cu/Zn ($p < 0,05$). El test de K-W expresó la existencia de diferencias estadísticamente significativas en el estudio longitudinal para los 3 minerales y también para la correlación Cu/Zn. Concretamente los niveles de Zn en los 4 muestreos fueron significativamente inferiores a los determinados en los controles sanos ($p < 0,001$; Tabla 12); además en la evolución temporal los niveles de Zn fueron significativamente inferiores en el 1^{er} muestreo con un descenso significativo desde el 2^o muestreo hasta el 4^o muestreo (Figura 7).

FIGURA 7. Diagrama de representación lineal [media \pm intervalos de confianza del 95% sobre las desviaciones estándar de las concentraciones de Zn (ppm)] en el suero de los pacientes hemodializados en el estudio longitudinal (4 muestreos realizados durante 2 años).



Para el Cu y la correlación Cu/Zn, en el estudio longitudinal, se observaron niveles séricos significativamente inferiores en el 2º muestreo respecto a los otros 3 muestreos restantes, y también respecto al grupo control (Tabla 20). Además los niveles del 1^{er} y 4º muestreos fueron significativamente mayores a los del 2º y 3º muestreos (Figuras 8 y 9).

FIGURA 8. Diagrama de representación lineal [media \pm intervalos de confianza del 95% sobre las desviaciones estándar de las concentraciones de Cu (ppm)] en el suero de los pacientes hemodializados en el estudio longitudinal (4 muestreos realizados durante 2 años).

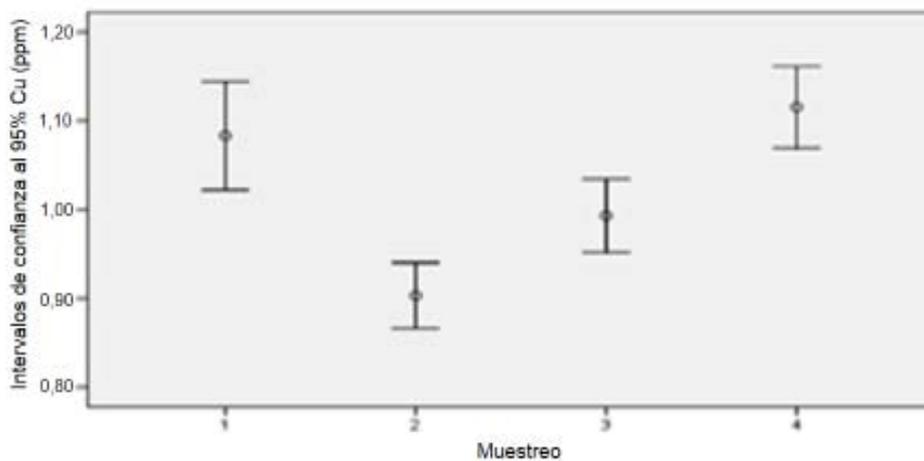
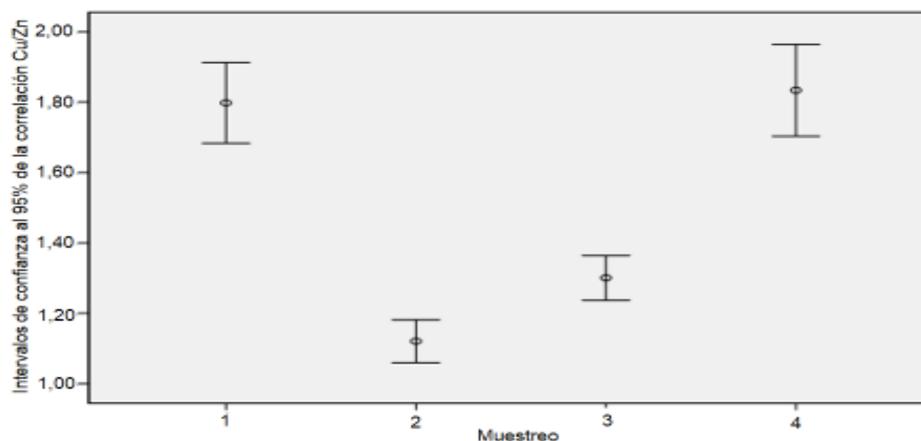


FIGURA 9. Diagrama de representación lineal [media \pm intervalos de confianza del 95% sobre las desviaciones estándar de las correlaciones de Cu/Zn] en el suero de los pacientes hemodializados en el estudio longitudinal (4 muestreos realizados durante 2 años).



En el caso del Al en el estudio longitudinal (Figura 5) se apreció un descenso significativo de las concentraciones séricas en el 3^{er} y 4^o muestreos respecto al 1^{er} y al 2^o muestreos realizados ($p < 0,001$). Sin embargo, no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas entre los niveles determinados en el 1^{er} y el 2^o muestreos, ni entre los encontrados en el 3^{er} y 4^o muestreos (Figura 10, Tabla 20).

FIGURA 10. Diagrama de representación lineal [media \pm intervalos de confianza del 95% sobre las desviaciones estándar de las concentraciones de Al (ppb)] en el suero de los pacientes hemodializados en el estudio longitudinal (4 muestreos realizados durante 2 años: 1, 2, 3, 4).

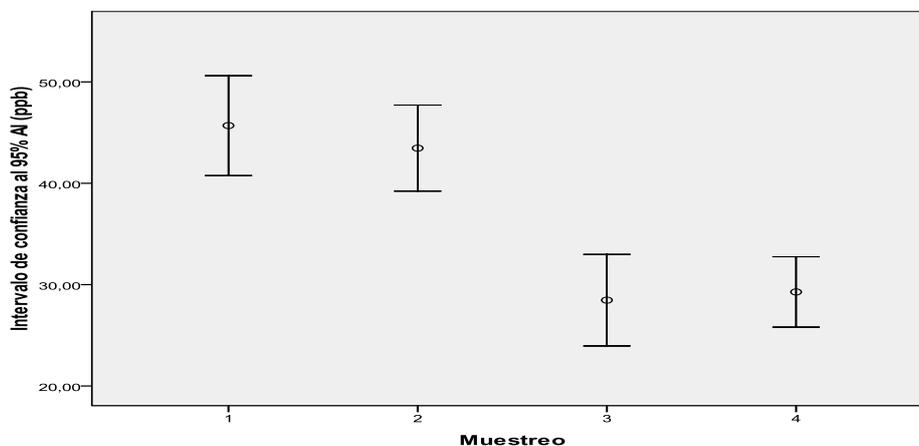


TABLA 20. Comparación de los niveles séricos medios \pm DE de Zn, Cu y Al, y de la correlación Cu/Zn en pacientes con insuficiencia renal en el estudio longitudinal (según el muestreo) frente a los controles sanos.

ELEMENTO	GRUPO		n	MEDIA \pm DE	SIGNIFICANCIA
Zn (ppm)	Pacientes	1 ^{er} muestreo	116	0,617 \pm 0,109	0,000
		2 ^o muestreo	116	0,837 \pm 0,178	
		3 ^{er} muestreo	116	0,773 \pm 0,128	
		4 ^o muestreo	116	0,689 \pm 0,209	
	Controles		50	1,212 \pm 0,206	
Cu (ppm)	Pacientes	1 ^{er} muestreo	116	1,083 \pm 0,334	0,000
		2 ^o muestreo	116	0,903 \pm 0,198	
		3 ^{er} muestreo	116	0,943 \pm 0,220	
		4 ^o muestreo	116	1,115 \pm 0,230	
	Controles		50	1,084 \pm 0,196	
Correlaciones Cu/Zn	Pacientes	1 ^{er} muestreo	116	1,798 \pm 0,624	0,000
		2 ^o muestreo	116	1,121 \pm 0,327	
		3 ^{er} muestreo	116	1,301 \pm 0,331	
		4 ^o muestreo	116	1,834 \pm 0,664	
	Controles		50	0,914 \pm 0,207	
Al (ppb)	Pacientes	1 ^{er} muestreo	116	45,69 \pm 26,90	0,000
		2 ^o muestreo	116	43,46 \pm 22,36	
		3 ^{er} muestreo	116	28,47 \pm 15,39	
		4 ^o muestreo	116	29,28 \pm 13,54	
	Controles		50	9,57 \pm 6,23	

4.2.3.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS NIVELES DE CINC, COBRE Y ALUMINIO, Y DE LA CORRELACIÓN Cu/Zn EN EL SUERO DE LOS PACIENTES SEGÚN EL SEXO.

Los resultados de la homogeneidad de las varianzas ($p= 0,371$ para el Zn; $0,178$ para el Cu; $p= 0,131$ para el Al; y $p= 0,430$ para la correlación Cu/Zn) y los del test de K-S ($p < 0,05$ para el Cu, el Al y la correlación Cu/Zn; y $p > 0,05$ para el Zn) reflejaron la necesidad de emplear en el análisis de la varianza un test no paramétrico para el Cu y el Al, y la correlación Cu/Zn. Para los 3 minerales y la

correlación Cu/Zn se observó la no influencia significativa del sexo en sus valores en pacientes hemodializados ($p > 0,05$).

TABLA 21. Comparación de los niveles séricos medios \pm DE de Zn, Cu, Cu/Zn y Al en pacientes con insuficiencia renal en función del sexo.

ELEMENTO	<i>n</i>	SEXO	MEDIA \pm DE	SIGNIFICANCIA
Zn (ppm)	229	Hombre	0,741 \pm 0,175	0,052
	235	Mujer	0,714 \pm 0,188	
Cu (ppm)	229	Hombre	1,044 \pm 0,276	0,083
	235	Mujer	1,001 \pm 0,254	
Correlaciones Cu/Zn	229	Hombre	1,498 \pm 0,587	0,680
	235	Mujer	1,524 \pm 0,605	
Al (ppb)	229	Hombre	38,41 \pm 24,24	0,100
	235	Mujer	40,60 \pm 22,06	

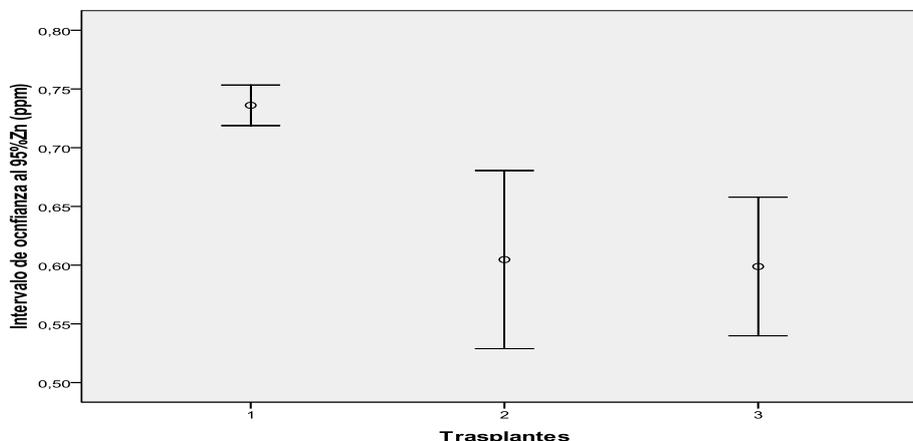
4.2.4.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS NIVELES DE CINC, COBRE Y ALUMINIO, Y DE LA CORRELACIÓN Cu/Zn EN EL SUERO DE LOS PACIENTES SEGÚN HAYAN O NO SIDO TRASPLANTADOS O HAYAN FALLECIDO.

El test de Levene mostró la existencia de homogeneidad de las varianzas sólo para el Al ($p > 0,05$). El test de K-S mostró que sólo para el Cu había una distribución normal de los valores. El test de Kruskal-Wallis demostró que para el Cu había una tendencia a la significancia estadística (Tabla 14). Concretamente y al aplicar el ANOVA de 2 colas, hemos comprobado que los niveles séricos de Zn son significativamente inferiores en pacientes trasplantados y fallecidos respecto a los no trasplantados ($p = 0,000$) (Figura 11). Para el Cu no se ha observado la existencia de diferencias significativas ($p = 0,106$) por el test de K-W. Para el Al y para la correlación Cu/Zn, el test de K-W manifestó la no influencia de haber sido trasplantados o haber fallecido en las concentraciones de estos elementos en pacientes hemodializados (Tabla 22).

TABLA 22. Comparación de los niveles séricos medios \pm DE de Zn, Cu, Correlaciones Cu/Zn y en pacientes con insuficiencia renal en función de que hayan sido sometidos o no a trasplantes o hayan fallecido.

ELEMENTO	n	GRUPO	MEDIA \pm DE	SIGNIFICANCIA
Zn (ppm)	464	No trasplantados	0,727 \pm 0,182	0,000
	11	Trasplantados	0,605 \pm 0,112	
	76	Fallecidos	0,599 \pm 0,122	
Cu (ppm)	464	No trasplantados	1,022 \pm 0,266	0,061
	11	Trasplantados	0,875 \pm 0,307	
	76	Fallecidos	1,041 \pm 0,391	
Correlaciones Cu/Zn	464	No trasplantados	1,511 \pm 0,596	0,227
	11	Trasplantados	1,505 \pm 0,599	
	76	Fallecidos	1,764 \pm 0,725	
Al (ppb)	464	No trasplantados	38,9 \pm 23,0	0,142
	11	Trasplantados	42,2 \pm 19,9	
	76	Fallecidos	48,6 \pm 25,7	

FIGURA 11. Diagrama de representación lineal [media \pm intervalos de confianza del 95% sobre las desviaciones estándar de las concentraciones de Zn (ppm)] en el suero de los pacientes hemodializados según hayan sido o no trasplantados o hayan fallecido [(1): no trasplantados; (2): trasplantados; (3): fallecidos].



4.2.5.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS NIVELES DE CINC, COBRE Y ALUMINIO, Y DE LA CORRELACIÓN Cu/Zn EN EL SUERO DE LOS PACIENTES SEGÚN EL GRUPO DE EDAD.

Con el objeto de realizar el contraste correspondiente a esta variable se definieron 6 grupos de edad: <30 años, de 30 a <40 años, de 40 a <50 años, de 50 a <60 años, de 60 a <70 años, de 70 a <80 años, y de 80 a <90 años. El test de Levene ($p > 0,05$ para los 3 minerales, y para la correlación Cu/Zn) y el de K-S ($p < 0,05$) para el Zn y el Al así como para la correlación Cu/Zn, y ($p > 0,05$ para el Cu) expresaron la necesidad de emplear el test de la t-Student para el Cu, y el de K-W para el Zn, el Al, y para la correlación Cu/Zn. Los niveles séricos de Cu se correlacionaron significativamente con el grupo de edad considerado ($p = 0,002$). Concretamente en los enfermos con edades entre 30 y <40 años y entre 70 y <80 años las concentraciones determinadas fueron significativamente inferiores a las encontradas en los que tenían una edad comprendida entre 50 y <60 años (Figura 13).

Para el Zn ($p = 0,056$) (Figura 12) se apreció una tendencia a la significancia estadística.

En el caso de la correlación Cu/Zn, esta no se vio significativamente afectada por la edad de los sujetos ($p = 0,104$) (Figura 14).

Para el Al ($p = 0,026$) el grupo de edad, según el test de Kruskal-Wallis influyó significativamente en sus niveles séricos; concretamente hemos apreciado

que los valores de Al en el grupo de edad entre 80 y <90 años eran significativamente inferiores a los grupos de edad comprendida entre 60 y <70 y 70 y <80 años, al igual que ocurre con los correspondientes al grupo de edad comprendido entre 40 y < 50 años, en los que también son inferiores, respecto a los establecidos en los grupos con edades entre 60 y < 70 años, y el de 70 y < 80 años.

FIGURA 12. Diagrama de representación lineal [media \pm intervalos de confianza del 95% sobre las desviaciones estándar de las concentraciones de Zn (ppm)] en el suero de los pacientes hemodializados según el grupo de edad considerado [(1): <30 años; (2): 30 a <40 años; (3): 40 a <50 años; (4): 50 a <60 años; (5): 60 a <70 años; (6): 70 a <80 años; (7): 80 a <90 años)].

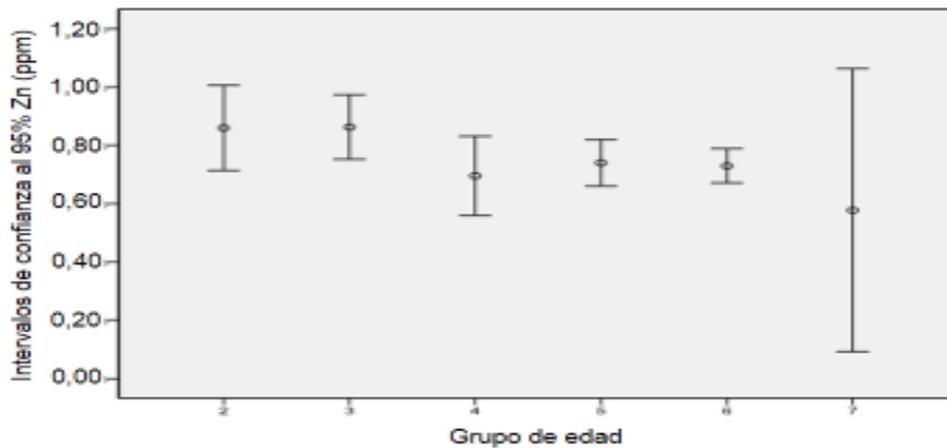


FIGURA 13. Diagrama de representación lineal [media \pm intervalos de confianza del 95% sobre las desviaciones estándar de las concentraciones de Cu (ppm)] en el suero de los pacientes hemodializados según el grupo de edad considerado [(1): <30 años; (2): 30 a <40 años; (3): 40 a <50 años; (4): 50 a <60 años; (5): 60 a <70 años; (6): 70 a <80 años; (7): 80 a <90 años)].

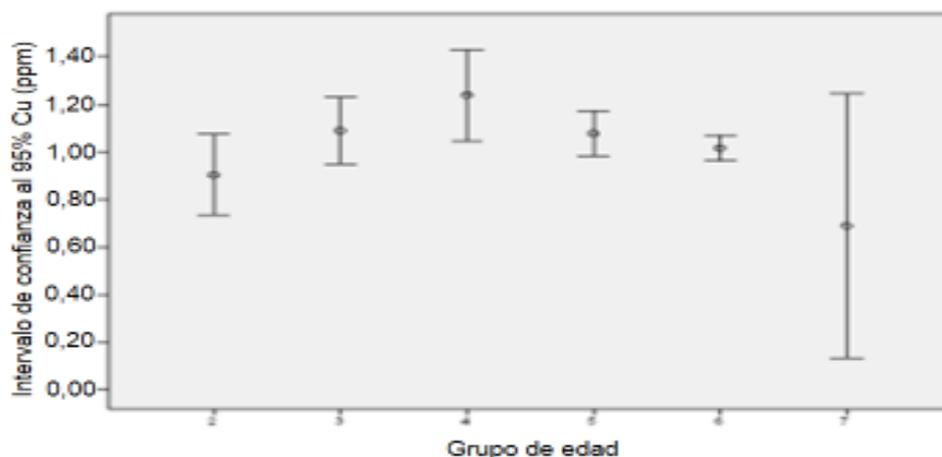


FIGURA 14. Diagrama de representación lineal [media \pm intervalos de confianza del 95% sobre las desviaciones estándar de las correlaciones de Cu/Zn en el suero de los pacientes hemodializados según el grupo de edad considerado [(1): <30 años; (2): 30 a <40 años; (3): 40 a <50 años; (4): 50 a <60 años; (5): 60 a <70 años; (6): 70 a <80 años; (7): 80 a <90 años)].

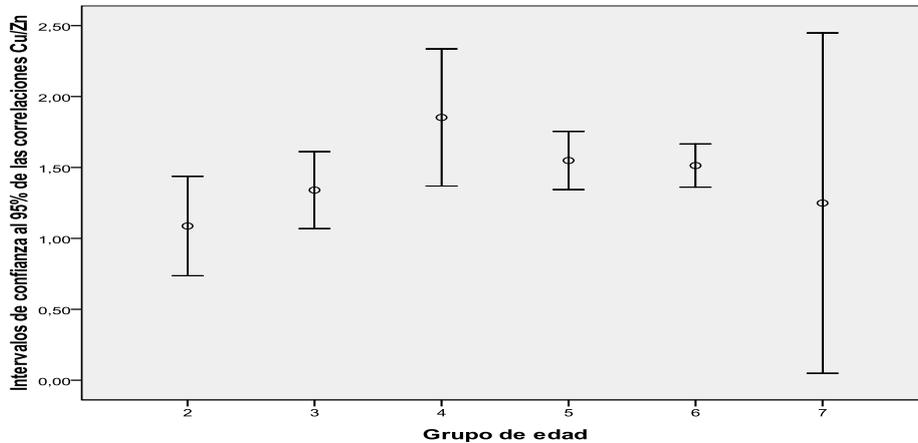
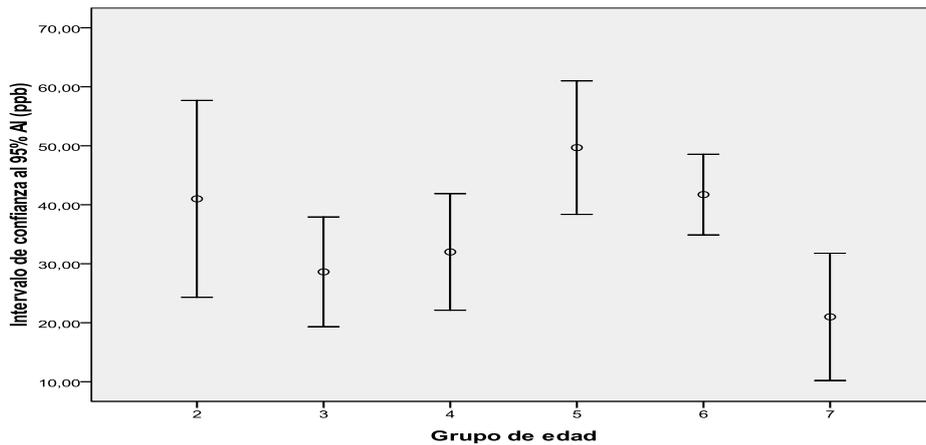


FIGURA 15. Diagrama de representación lineal [media \pm intervalos de confianza del 95% sobre las desviaciones estándar de las concentraciones de Al (ppb)] en el suero de los pacientes hemodializados según el grupo de edad considerado [(1): <30 años; (2): 30 a <40 años; (3): 40 a <50 años; (4): 50 a <60 años; (5): 60 a <70 años; (6): 70 a <80 años; (7): 80 a <90 años)].



4.2.6.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS NIVELES DE CINC, COBRE Y ALUMINIO, Y DE LA CORRELACIÓN Cu/Zn EN EL SUERO DE LOS PACIENTES SEGÚN LA ETIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD.

En los enfermos analizados, la etiología de la insuficiencia renal pudo ser debida a 14 causas diferentes, dando lugar a 14 grupos de análisis: glomerulonefritis, glomerulonefritis membranosa proliferativa, nefritis intersticial, nefroangioesclerosis, vascular, vasculitis, nefropatía gotosa, nefropatía por analgésicos, nefropatía por antibióticos, nefropatía por carnitina, nefropatía poliquística, nefropatía por diabetes, pielonefritis, enfermedad de Good Pasture.

El test de la t-Student expresó la existencia de diferencias estadísticamente significativas según la etiología de la enfermedad en los pacientes estudiados para los niveles séricos de Cu ($p= 0,002$). Concretamente las concentraciones en enfermos cuya etiología de enfermedad fue la nefropatía por diabetes fueron significativamente superiores a aquellos pacientes cuya etiología fue la glomerulonefritis, glomerulonefritis membranosa proliferativa, nefroangioesclerosis, nefropatía gotosa, nefropatía por analgésicos, nefropatía por carnitina, y nefropatía poliquística (Figura 17). Sin embargo, los niveles séricos de Zn, de la correlación Cu/Zn y del Al no se vieron afectados por dicho factor (Tabla 23), aunque los de Zn manifestaron una tendencia a la significancia estadística ($p= 0,053$).

Al realizar el análisis de varianza de 2 colas hemos comprobado que los niveles de Zn de los pacientes cuya etiología era la glomerulonefritis eran significativamente menores que los correspondientes a nefropatía por diabetes (Figura 16).

En el caso del Al también mediante el análisis de varianza de 2 colas, se ha observado que los pacientes cuya etiología es debida a problemas vasculares tienen niveles significativamente inferiores a los que presentaban una etiología de glomerulonefritis, nefropatía por analgésicos y nefropatía por diabetes ($p<0,05$). Además los pacientes con etiología de nefropatía poliquística tenían unos niveles séricos de Al inferiores a los que su etiología era nefropatía por diabetes, glomerulonefritis o nefropatía por analgésicos ($p<0,05$) (Figura 18).

FIGURA 16. Diagrama de representación lineal [media \pm intervalos de confianza del 95% sobre las desviaciones estándar de las concentraciones de Zn (ppm)] en el suero de los pacientes hemodializados según la etiología de la enfermedad [(1): Glomerulonefritis; (2): Glomerulonefritis membranosa proliferativa; (4): Nefroangioesclerosis; (5): Vascular; (7): Nefropatía gotosa; (8): Nefropatía por analgésicos; (10): Nefropatía por antibióticos; (11) Nefropatía por carnitina; (12) Nefropatía poliquistica; (13) Nefropatía por diabetes; (14) Pielonefritis; (15) Enfermedad de Good Pasture].

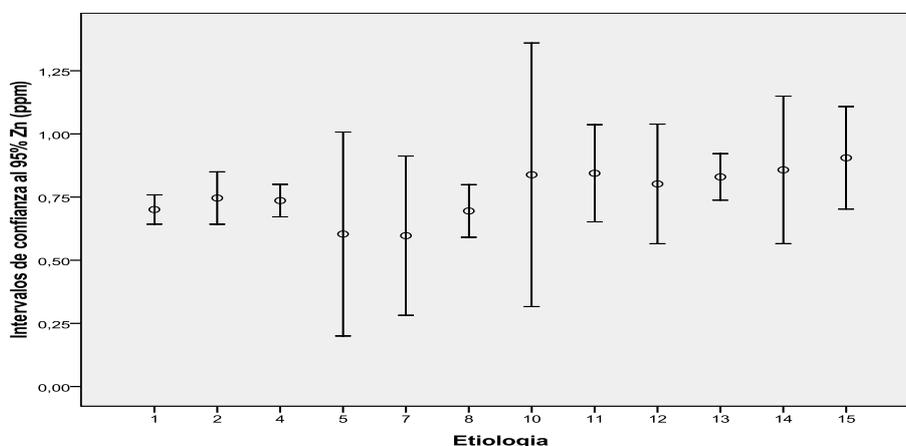


FIGURA 17. Diagrama de representación lineal [media \pm intervalos de confianza del 95% sobre las desviaciones estándar de las concentraciones de Cu (ppm)] en el suero de los pacientes hemodializados según la etiología de la enfermedad [(1): Glomerulonefritis; (2): Glomerulonefritis membranosa proliferativa; (4): Nefroangioesclerosis; (5): Vascular; (7): Nefropatía gotosa; (8): Nefropatía por analgésicos; (10): Nefropatía por antibióticos; (11) Nefropatía por carnitina; (12) Nefropatía poliquistica; (13) Nefropatía por diabetes; (14) Pielonefritis; (15) Enfermedad de Good Pasture].

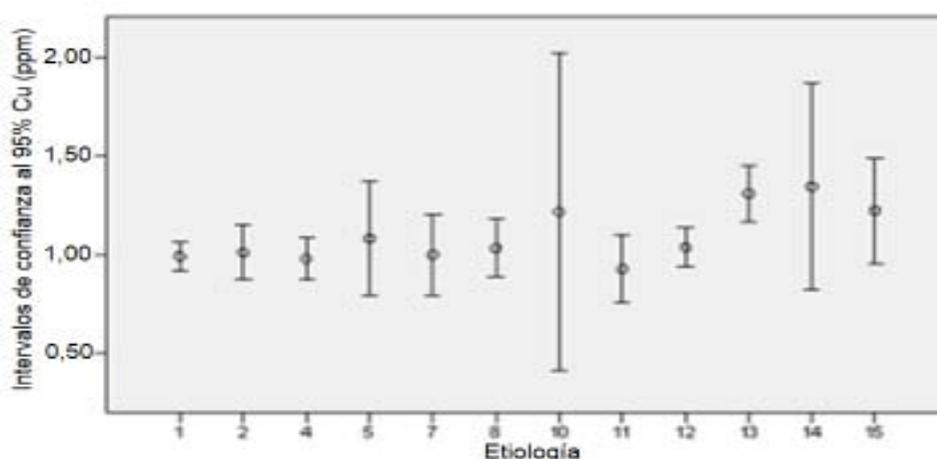


FIGURA 18. Diagrama de representación lineal [media \pm intervalos de confianza del 95% sobre las desviaciones estándar de las concentraciones de Al (ppb)] en el suero de los pacientes hemodializados según la etiología de la enfermedad [(1): Glomerulonefritis; (2): Glomerulonefritis membranosa proliferativa; (4): Nefroangioesclerosis; (5): Vascular; (7): Nefropatía gotosa; (8): Nefropatía por analgésicos; (10): Nefropatía por antibióticos; (11) Nefropatía por carnitina; (12) Nefropatía poliquística; (13) Nefropatía por diabetes; (14) Pielonefritis; (15) Enfermedad de Good Pasture].

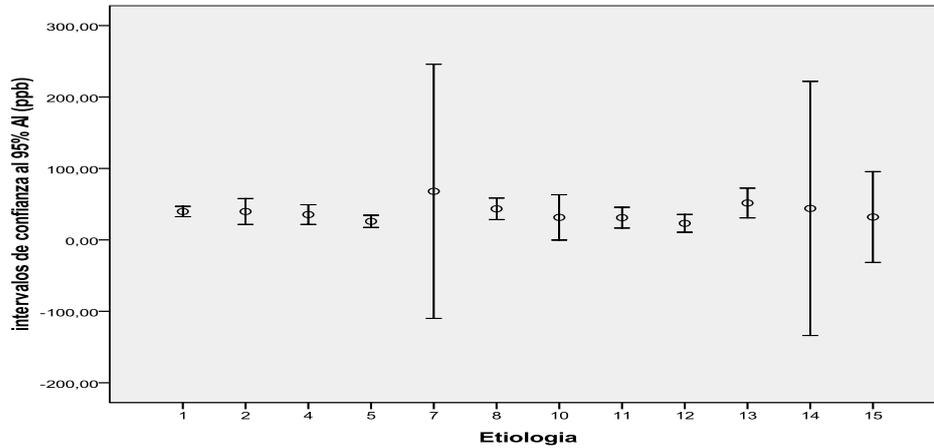


TABLA 23. Comparación de los niveles séricos medios \pm DE de Zn, Cu, balance Cu/Zn y Al en pacientes con insuficiencia renal según la etiología de la insuficiencia renal.

ETIOLOGÍA	Zn (ppm)		Cu (ppm)		Cu/Zn ratios		Al (ppb)	
	<i>n</i>	Media \pm DE ^a	<i>n</i>	Media \pm DE ^b	<i>n</i>	Media \pm DE	<i>N</i>	Media \pm DE
Glomerulonefritis	165	0,701 \pm 0,198	165	0,992 \pm 0,254	165	1,517 \pm 0,552	165	47,7 \pm 51,8
Glomerulonefritis membranosa proliferativa	39	0,746 \pm 0,155	39	1,011 \pm 0,204	39	1,432 \pm 0,504	39	39,7 \pm 21,6
Nefroangioesclerosis	54	0,736 \pm 0,116	54	0,980 \pm 0,197	54	1,380 \pm 0,421	54	35,5 \pm 22,8
Vascular	14	0,604 \pm 0,162	14	1,082 \pm 0,179	14	1,790 \pm 0,507	14	26,0 \pm 5,4
Nefropatía gotosa	14	0,597 \pm 0,198	14	1,000 \pm 0,127	14	1,785 \pm 0,503	14	68,0 \pm 19,8
Nefropatía por analgésicos	39	0,695 \pm 0,155	39	1,032 \pm 0,216	39	1,598 \pm 0,612	39	43,5 \pm 18,0
Nefropatía por antibióticos	11	0,838 \pm 0,210	11	1,217 \pm 0,322	11	1,460 \pm 0,177	11	31,5 \pm 3,5
Nefropatía por carnitina	29	0,844 \pm 0,230	29	0,928 \pm 0,203	29	1,182 \pm 0,444	29	31,3 \pm 17,4
Nefropatía poliquística	32	0,802 \pm 0,307	32	1,038 \pm 0,117	32	1,521 \pm 0,401	32	23,2 \pm 10,0
Nefropatía por diabetes	39	0,829 \pm 0,137	39	1,309 \pm 0,216	39	1,655 \pm 0,521	39	51,67 \pm 24,9
Pielonefritis	14	0,858 \pm 0,183	14	1,344 \pm 0,330	14	1,654 \pm 0,674	14	44,0 \pm 19,8
Enfermedad de Good Pasture	14	0,905 \pm 0,127	14	1,222 \pm 0,166	14	1,390 \pm 0,359	14	32,0 \pm 7,1

^ap= 0,053.

^bp= 0,002.

^cp= 0,150

4.2.7.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS NIVELES DE CINC, COBRE Y ALUMINIO, Y DE LA CORRELACIÓN Cu/Zn EN EL SUERO DE PACIENTES SEGÚN CONSUMO DE DISTINTOS MEDICAMENTOS.

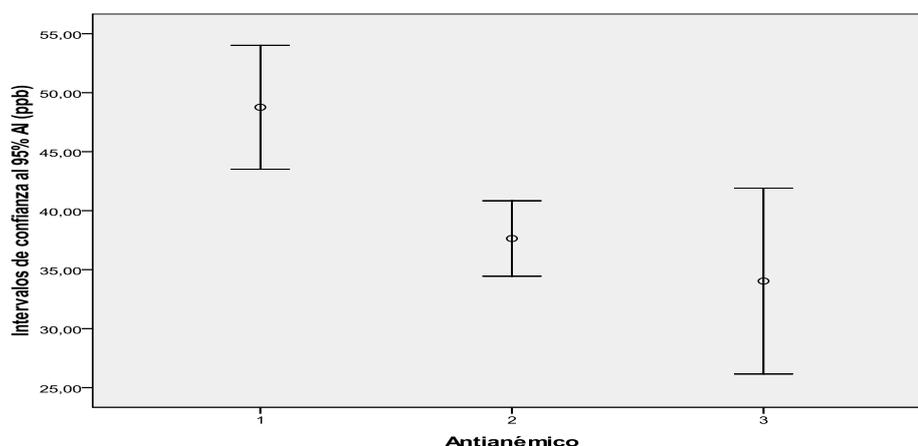
4.2.7.1.- Antianémicos.

Se comprobó la existencia de homogeneidad de las varianzas ($p > 0,05$) para los 3 minerales. Para el Zn y las correlaciones Cu/Zn no hubo distribución normal de los datos. Los correspondientes ANOVAs no manifestaron que el consumo de los Antianémicos [Tardyferon[®], Ferrogradumed[®]] influyese significativamente en los niveles de Zn, Cu y en la correlación Cu/Zn al contrastarlos con pacientes que no los tomaban (Tabla 24). Sin embargo los niveles séricos de Al fueron significativamente mayores en los pacientes que consumieron un antiánémico frente a los que no consumieron o consumieron varios (Figura 19).

TABLA 24. Comparación de los niveles séricos medios \pm DE de Zn, Cu y Al, y de la correlación Cu/Zn en pacientes con insuficiencia renal según el consumo de antianémicos.

ELEMENTO	<i>n</i>	GRUPO	MEDIA \pm DE	SIGNIFICANCIA
Zn (ppm)	173	1 antianémico	0,747 \pm 0,170	0,060
	255	No antianémicos	0,713 \pm 0,179	
	36	Varios antianémicos	0,769 \pm 0,159	
Cu (ppm)	173	1 antianémico	1,051 \pm 0,270	0,644
	255	No antianémicos	1,005 \pm 0,271	
	36	Varios antianémicos	1,036 \pm 0,258	
Correlación Cu/Zn	173	1 antianémico	1,491 \pm 0,578	0,636
	255	No antianémicos	1,512 \pm 0,631	
	36	Varios antianémicos	1,413 \pm 0,487	
Al (ppb)	173	1 antianémico	48,8 \pm 26,6	<0,001
	255	No antianémicos	37,6 \pm 21,2	
	36	Varios antianémicos	34,0 \pm 15,8	

FIGURA 19. Diagrama de representación lineal [media \pm intervalos de confianza del 95% sobre las desviaciones estándar de las concentraciones de Al (ppb)] en el suero de los pacientes hemodializados según el consumo de antianémicos [(1): 1 antianémico; (2): no antianémicos; (3): varios antianémicos].



4.2.7.2.- Antipotásémicos y fosfatémicos.

Se comprobó la existencia de homogeneidad de las varianzas ($p > 0,05$) para el Zn y el Cu ($p > 0,05$) y una distribución normal de los resultados sólo para el Cu ($p > 0,05$). Para el Cu, Cu/Zn y el Al los niveles séricos fueron estadísticamente distintos al comparar los resultados obtenidos en los pacientes según el consumo de 1, varios o no consumo de anti K y P.

Para el Cu y la correlación Cu/Zn, específicamente los enfermos que consumieron varios anti K y P manifestaron concentraciones significativamente mayores ($p < 0,05$) que los que tomaron 1 sólo antipotásémico y fosfatémico (Tabla 25, Figuras 20 y 21), Asimismo, se observó la existencia de una tendencia a la significancia estadística entre los que no consumieron dicho medicamento frente a los que consumieron varios ($p = 0,088$ y $p = 0,055$, respectivamente).

Para el Al, los niveles séricos en pacientes que tomaban varios anti K y P fueron significativamente superiores a los que no tomaban ninguno (Tablas 25, Figura 22).

TABLA 25. Comparación de los niveles séricos medios \pm DE de Zn, Cu y Al, y la correlación Cu/Zn en pacientes con insuficiencia renal según el consumo de anti hiperpotásémicos y fosfatémicos (anti K y P).

ELEMENTO	<i>n</i>	GRUPO	MEDIA \pm DE	SIGNIFICANCIA
Zn (ppm)	173	1 anti K y P	0,741 \pm 0,171	0,286
	255	No anti K y P	0,733 \pm 0,159	
	36	Varios anti K y P	0,714 \pm 0,186	
Cu (ppm)	173	1 anti K y P	0,985 \pm 0,264	0,005
	255	No anti K y P	1,010 \pm 0,281	
	36	Varios anti K y P	1,086 \pm 0,265	
Correlación Cu/Zn	173	1 anti K y P	1,423 \pm 0,616	0,002
	255	No anti K y P	1,444 \pm 0,552	
	36	Varios anti K y P	1,624 \pm 0,580	
Al (ppb)	173	1 anti K y P	40,8, \pm 26,7	0,021
	255	No anti K y P	37,3 \pm 18,7	
	36	Varios anti K y P	43,8 \pm 20,4	

FIGURA 20. Diagrama de representación lineal [media \pm intervalos de confianza del 95% sobre las desviaciones estándar de las concentraciones de Cu (ppm)] en el suero de los pacientes hemodializados según el consumo de 1 (1), ninguno (2) ó varios (3) anti K y P.

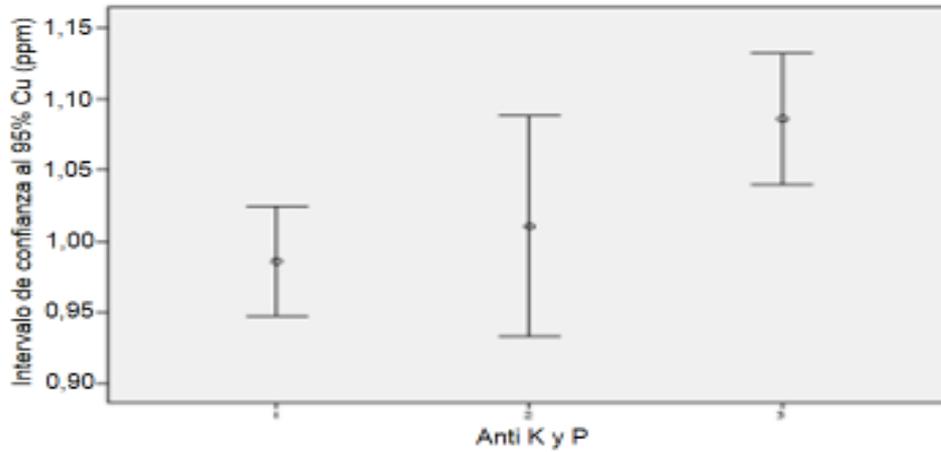


FIGURA 21. Diagrama de representación lineal [media \pm intervalos de confianza del 95% sobre las desviaciones estándar de las correlaciones de Cu/Zn en el suero de los pacientes hemodializados según el consumo de 1 (1), ninguno (2) ó varios (3) anti K y P.

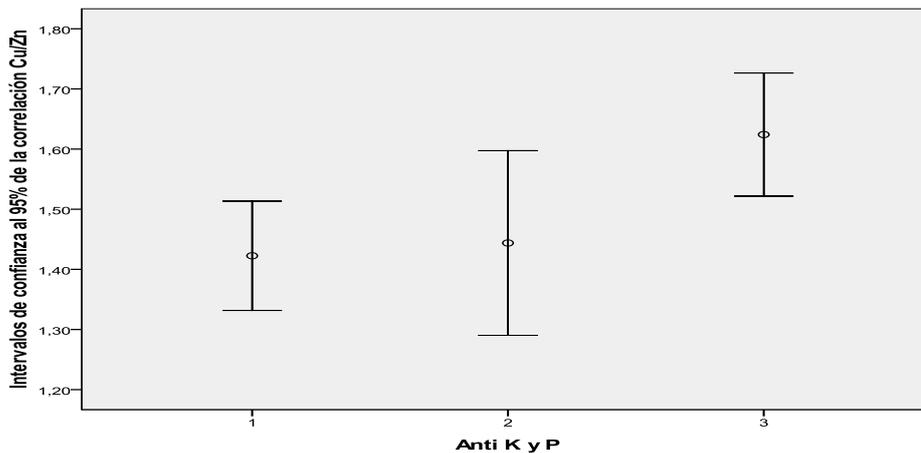
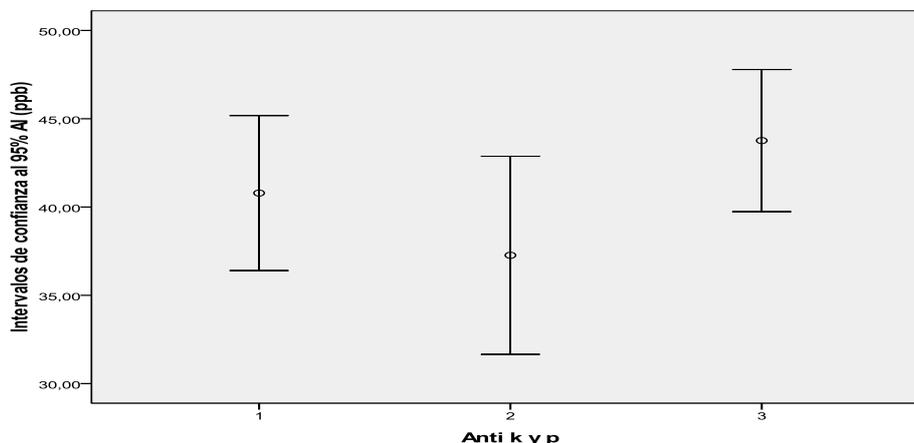


FIGURA 22. Diagrama de representación lineal [media \pm intervalos de confianza del 95% sobre las desviaciones estándar de las concentraciones de Al (ppb)] en el suero de los pacientes hemodializados según el consumo de 1 (1), ninguno (2) ó varios (3) anti K y P.



4.2.7.3.- Suplementos de calcio.

En el caso de los pacientes que consumieron suplementos de Calcio, sólo para el Al se comprobó la no existencia de homogeneidad de las varianzas ($p < 0,05$).

El test de la t-Student manifestó que los niveles séricos de Cu aumentaron significativamente en los pacientes que tomaron uno o varios suplementos de Ca frente a los enfermos sometidos a hemodiálisis que no los consumieron (Tabla 26, Figura 23) ($p < 0,01$).

En relación a las correlaciones Cu/Zn comprobamos la existencia de una distribución anormal de los valores, por lo que aplicamos, en el estudio estadístico, el test no paramétrico de Kruskal-Wallis, comprobando igualmente que estos valores aumentaron significativamente en los pacientes que tomaron 1 o varios suplementos de Ca (Tabla 26, Figura 24) ($p < 0,05$).

Para el aluminio, el consumo de varios hipercalcemiantes aumentó significativamente los niveles séricos de este elemento en estos enfermos respecto a los no consumidores ($p < 0,05$) (Tabla 26, Figura 25).

TABLA 26. Comparación de los niveles séricos medios \pm DE de Zn, Cu y Al, y la correlación Cu/Zn en pacientes con insuficiencia renal según el consumo de hipercalcemiantes.

ELEMENTO	N	GRUPO	MEDIA \pm DE	SIGNIFICANCIA
Zn (ppm)	215	1 hipercalcemiante	0,722 \pm 0,168	0,806
	100	No suplemento	0,740 \pm 0,185	
	149	Varios hipercalcemiantes	0,736 \pm 0,178	
Cu (ppm)	215	1 hipercalcemiante	1,029 \pm 0,238	0,004
	100	No suplemento	0,941 \pm 0,281	
	149	Varios hipercalcemiantes	1,073 \pm 0,294	
Correlación Cu/Zn	215	1 hipercalcemiante	1,512 \pm 0,540	0,014
	100	No suplemento	1,382 \pm 0,709	
	149	Varios hipercalcemiantes	1,550 \pm 0,601	
Al (ppb)	215	1 hipercalcemiante	41,9 \pm 25,3	0,012
	100	No suplemento	36,8 \pm 23,8	
	149	Varios hipercalcemiantes	43,7 \pm 20,2	

FIGURA 23. Diagrama de representación lineal [media \pm intervalos de confianza del 95% sobre las desviaciones estándar de las concentraciones de Cu (ppm)] en el suero de los pacientes hemodializados según el consumo de 1, ninguno o varios hipercalcemiantes.

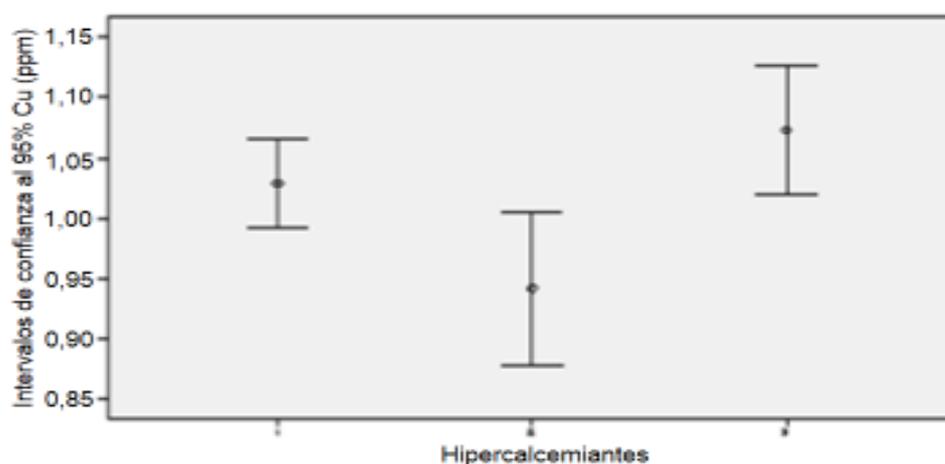


FIGURA 24. Diagrama de representación lineal [media \pm intervalos de confianza del 95% sobre las desviaciones estándar de las correlaciones de Cu/Zn] en el suero de los pacientes hemodializados según el consumo de 1, ninguno o varios hipercalcemiantes.

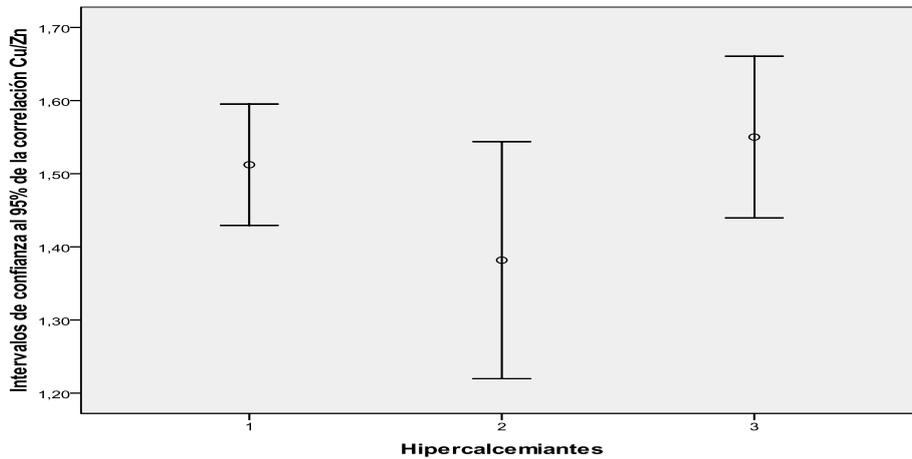
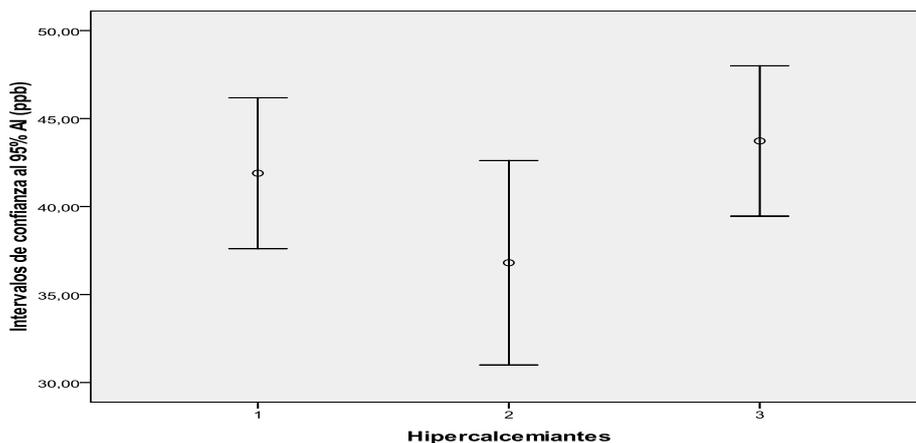


FIGURA 25. Diagrama de representación lineal [media \pm intervalos de confianza del 95% sobre las desviaciones estándar de las concentraciones de Al (ppb)] en el suero de los pacientes hemodializados según el consumo de 1, ninguno o varios hipercalcemiantes.



4.2.7.4.- Diuréticos.

Para los pacientes que consumieron diuréticos, se comprobó la existencia de homogeneidad de las varianzas ($p > 0,05$) para los 3 minerales ($p > 0,05$). El test de la t-Student manifestó que los niveles séricos de Cu fueron significativamente diferentes según el consumo de diuréticos ($p = 0,001$) (Tabla 27). Concretamente las concentraciones de Cu, Cu/Zn y Al fueron significativamente inferiores en los que consumieron diuréticos (Tabla 27, Figuras 26, 27 y 28).

TABLA 27. Comparación de los niveles séricos medios \pm DE de Zn, Cu y Al, y la correlación Cu/Zn en pacientes con insuficiencia renal según el consumo de diuréticos.

ELEMENTO	<i>n</i>	GRUPO	MEDIA \pm DE	SIGNIFICANCIA
Zn (ppm)	167	Si diuréticos	0,751 \pm 0,189	0,159
	297	No diuréticos	0,718 \pm 0,166	
Cu (ppm)	167	Si diuréticos	0,964 \pm 0,253	0,002
	297	No diuréticos	1,058 \pm 0,274	
Correlación Cu/Zn	167	Si diuréticos	1,371 \pm 0,535	0,003
	297	No diuréticos	1,567 \pm 0,625	
Al (ppb)	167	Si diuréticos	33,2 \pm 20,5	<0,001
	297	No diuréticos	46,3 \pm 24,0	

FIGURA 26. Diagrama de representación lineal [media \pm intervalos de confianza del 95% sobre las desviaciones estándar de las concentraciones de Cu (ppm)] en el suero de los pacientes hemodializados según el consumo o no de diuréticos.

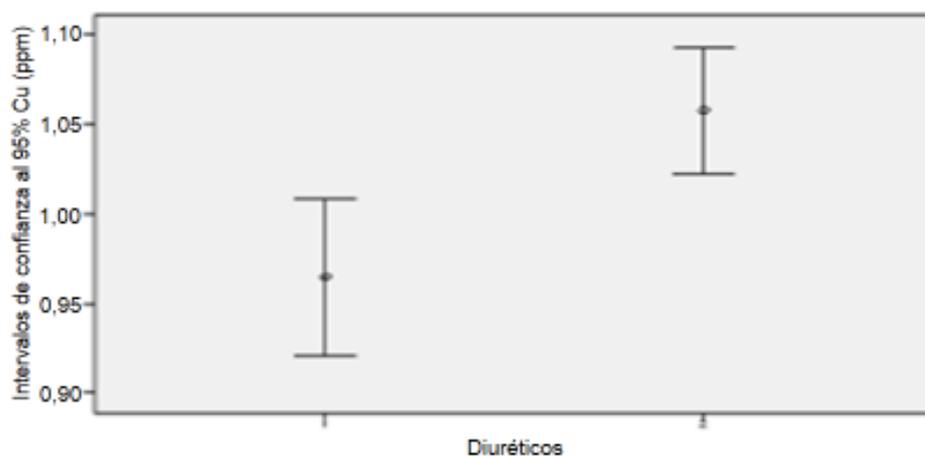


FIGURA 27. Diagrama de representación lineal [media \pm intervalos de confianza del 95% sobre las desviaciones estándar de las correlaciones de Cu/Zn] en el suero de los pacientes hemodializados según el consumo o no de diuréticos.

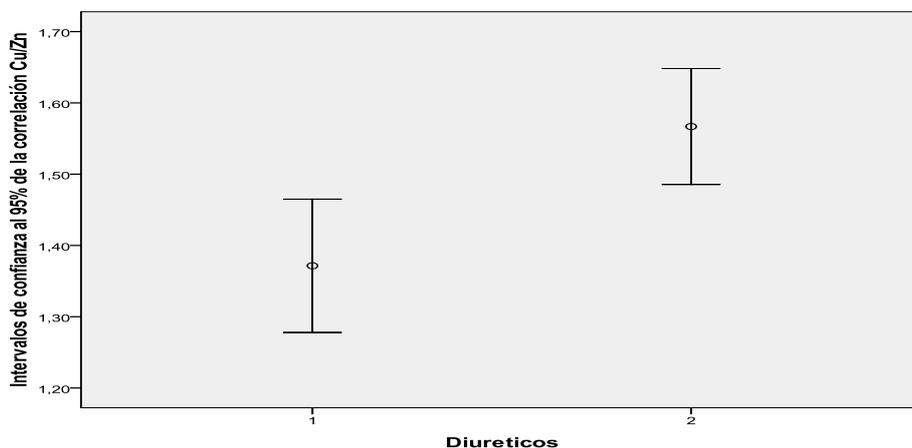
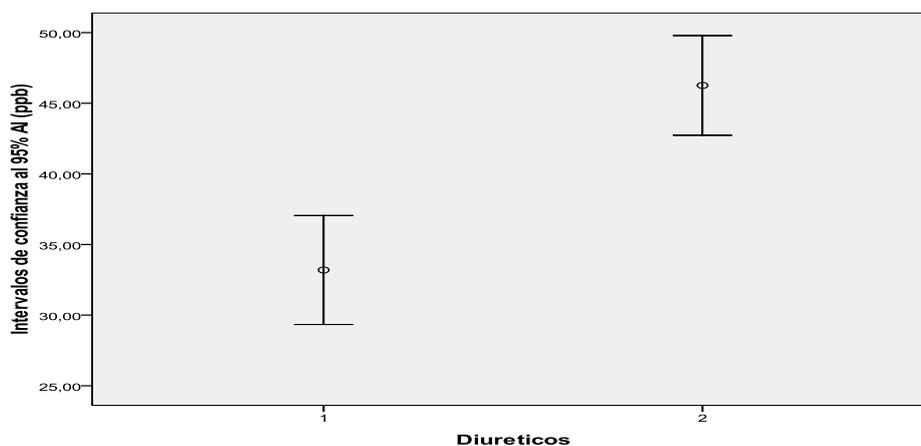


FIGURA 28. Diagrama de representación lineal [media \pm intervalos de confianza del 95% sobre las desviaciones estándar de las concentraciones de Al (ppb)] en el suero de los pacientes hemodializados según el consumo o no de diuréticos.



4.2.7.5.- Protectores gástricos.

Para este grupo de pacientes, se comprobó la existencia de homogeneidad de las varianzas ($p > 0,05$) para los 3 minerales ($p > 0,05$). Lo niveles séricos de ninguno de los 3 elementos ensayados así como de las correlaciones Cu/Zn se modificaron significativamente con el consumo de 1 o varios protectores gástricos (Tabla 28).

TABLA 28. Comparación de los niveles séricos medios \pm DE de Zn, Cu y Al, y la correlación Cu/Zn en pacientes con insuficiencia renal según el consumo de protectores gástricos.

ELEMENTO	<i>n</i>	GRUPO	MEDIA \pm DE	SIGNIFICANCIA
Zn (ppm)	260	1 protector gástrico	0,724 \pm 0,169	0,859
	83	No protectores	0,740 \pm 0,185	
	121	Varios protectores	0,738 \pm 0,181	
Cu (ppm)	260	1 protector gástrico	1,033 \pm 0,280	0,588
	83	No protectores	1,033 \pm 0,217	
	121	Varios protectores	1,000 \pm 0,282	
Correlación Cu/Zn	260	1 protector gástrico	1,524 \pm 0,635	0,762
	83	No protectores	1,470 \pm 0,452	
	121	Varios protectores	1,458 \pm 0,617	
Al (ppb)	260	1 protector gástrico	42,5 \pm 25,7	0,175
	83	No protectores	43,0 \pm 20,3	
	121	Varios protectores	37,3 \pm 20,6	

4.2.7.6.- Vasodilatadores.

Solo para el Al se comprobó la no existencia de homogeneidad de las varianzas ($p < 0,05$). También para este elemento, se demostró que el consumo de vasodilatadores originaba significancia estadística, con descenso en los niveles séricos en los consumidores de estos fármacos (Tabla 29).

TABLA 29. Comparación de los niveles séricos medios \pm DE de Zn, Cu y Al, y la correlación Cu/Zn en pacientes con insuficiencia renal según el consumo de vasodilatadores.

ELEMENTO	<i>n</i>	GRUPO	MEDIA \pm DE	SIGNIFICANCIA
Zn (ppm)	48	Si vasodilatadores	0,731 \pm 0,163	0,859
	416	No vasodilatadores	0,730 \pm 0,176	
Cu (ppm)	48	Si vasodilatadores	0,956 \pm 0,243	0,588
	416	No vasodilatadores	1,032 \pm 0,272	
Correlación Cu/Zn	48	Si vasodilatadores	1,406 \pm 0,568	0,285
	416	No vasodilatadores	1,507 \pm 0,604	
Al (ppb)	48	Si vasodilatadores	36,7 \pm 26,4	0,042
	416	No vasodilatadores	41,9 \pm 23,2	

4.2.7.7.- Otros grupos de medicamentos.

Los test utilizados pusieron de manifiesto que de los otros grupos de fármacos consumidos por los enfermos con insuficiencia renal, no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles séricos de Zn y Cu para los pacientes que tomaron antihipertensivos, psicotropos, cortisona, medicamentos para regular la sangre, para regular el cerebro, para controlar el factor B-K, y para controlar el corazón, al contrastarlos frente a los que no los tomaron ($p > 0,05$, Tabla 30).

Sólo en los pacientes que consumieron medicamentos para la prevención de infartos se apreciaron niveles séricos de Cu significativamente superiores ($p = 0,001$) [1,110 \pm 0,252 ppm en pacientes que tomaron el fármaco, frente a 0,999 \pm 0,271 ppm en los que no lo consumieron.

En el caso del Al sólo para los pacientes que consumían antihipertensivos o consumían cortisona se apreció la existencia de diferencias estadísticamente significativas. Concretamente los pacientes que tomaban 1 sólo antihipertensivo se encontraron niveles significativamente inferiores (Tabla 30). Adicionalmente en los pacientes consumidores de fármacos para el cerebro o el corazón se encontró una tendencia a la significancia estadística (Tabla 30).

TABLA 30. Comparación de los niveles séricos medios \pm DE de Zn, Cu y Al, y la correlación Cu/Zn en pacientes con insuficiencia renal según el consumo de otros medicamentos.

MEDICAMENTO	SIGNIFICANCIA			
	Zn	Cu	Correlación Cu/Zn	Al
Antihipertensivos	0,532	0,209	0,197	0,031 ^b
Psicotropos	0,070	0,460	0,519	0,838
Cortisona	0,461	0,766	0,533	0,003 ^c
Sangre	0,180	0,224	0,846	0,367
Cerebro	0,364	0,451	0,124	0,127
Plaquetas	0,325	0,673	0,838	0,191
Gota	0,800	0,371	0,671	0,202
Colesterol	0,269	0,243	0,259	0,355
Factor B-K	0,374	0,146	0,446	0,058
Corazón	0,903	0,928	0,899	0,091
Prevención de infartos	0,436	0,001 ^a	0,052	0,123

^a Los niveles de Cu en el suero de los pacientes que tomaban medicamentos para la prevención de infartos ($1,110 \pm 0,252$ ppm) fueron significativamente superiores a los que no tomaban este medicamento ($0,999 \pm 0,271$ ppm).

^b Los niveles de Al en el suero de los pacientes que tomaban 1 antihipertensivo ($36,7 \pm 21,2$ ppb) son significativamente inferiores a los que no lo tomaban ($43,2 \pm 21,9$ ppb) así como frente a los que tomaban varios antihipertensivos ($43,1 \pm 26,6$ ppb). Por otro lado las correlaciones Cu/Zn en los pacientes que tomaban medicamentos para la prevención de infartos manifestaron una tendencia a la significancia estadística, concretamente a ser superiores.

^c Para los pacientes que tomaban cortisona ($p= 0,003$) [$18,2 \pm 5,3$ ppb en pacientes que tomaron el fármaco, frente a los que no tomaron $41,7 \pm 23,6$ ppb).

4.3.- ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LOS VALORES OBTENIDOS PARA LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS, HEMATOLÓGICOS Y NUTRICIONALES SEGÚN LOS DISTINTOS FACTORES CONSIDERADOS.

4.3.1.- CONTRASTE DE PARAMETROS BIOQUIMICOS DETERMINADOS EN ENFERMOS FRENTE A CONTROLES SANOS.

De igual manera a como se realizó previamente para los niveles séricos de Zn, Cu y Al, y de la correlación Cu/Zn, se procedió con los parámetros bioquímicos analizados. En primer término se contrastaron los niveles medios determinados en los enfermos frente a los medios en los controles sanos, pero sólo para aquellos parámetros bioquímicos de los que se realizaron las determinaciones en los controles sanos. Previamente se comprobó la homogeneidad de las varianzas y la distribución normal de los resultados, procediéndose posteriormente al análisis paramétrico o no paramétrico dependiendo del cumplimiento previo o no de las premisas descritas, respectivamente.

De todos los parámetros bioquímicos analizados, se observó la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre enfermos y controles para la creatinina, urea, ácido úrico, triglicéridos, colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, GOT y GPT ($p < 0,05$, Tabla 31).

Es destacable la modificación de la regulación hemostática establecida en el metabolismo lipídico en los pacientes pues disminuyen significativamente sus niveles de colesterol total, colesterol LDL y colesterol HDL ($p < 0,001$). Sin embargo los niveles de triglicéridos determinados en los controles sanos fueron significativamente superiores.

TABLA 31. Comparación de los niveles séricos medios \pm DE de distintos parámetros bioquímicos determinados en pacientes con insuficiencia renal frente a los medidos en controles sanos.

PARÁMETRO	CONTROLES		ENFERMOS		MODELO	p
	n	MEDIA \pm DE	n	MEDIA \pm DE		
Glucosa	50	90,8 \pm 11,5	464	120 \pm 448	NP	0,392
Creatinina	50	13,6 \pm 14,1	464	9,76 \pm 3,62	NP	0,000
Urea	50	36,8 \pm 8,9	464	147 \pm 36,5	NP	0,000
Ácido úrico	50	4,90 \pm 1,34	464	7,83 \pm 6,03	NP	0,000
Triglicéridos	50	92,1 \pm 48,7	464	123 \pm 69,0	NP	0,000
Colesterol total	50	209,8 \pm 36,5	464	166,6 \pm 42,7	P	0,000
Colesterol HDL	50	66,3 \pm 44,9	464	44,4 \pm 15,1	NP	0,000
Colesterol LDL	50	141,2 \pm 36,0	464	101,9 \pm 97,2	NP	0,000
GOT	50	23,6 \pm 6,1	464	20,9 \pm 15,8	NP	0,000
GPT	50	22,8 \pm 9,6	464	22,7 \pm 22,2	NP	0,012
Bilirrubina	50	2,5 \pm 6,9	464	6,33 \pm 5,92	NP	0,178

4.3.2.- CONTRASTE DE ANALISIS BIOQUIMICOS SEGÚN EL TIPO DE MUESTREO EN EL ESTUDIO LONGITUDINAL.

De igual forma a lo descrito previamente para los niveles séricos de Zn, Cu y Al, se contrastaron las concentraciones medias determinadas en los enfermos según el muestreo en el estudio longitudinal practicado durante 2 años. Previamente se comprobó la homogeneidad de las varianzas y la distribución normal de los resultados, procediéndose posteriormente al análisis paramétrico o no paramétrico dependiendo del cumplimiento previo o no de las premisas descritas, respectivamente (Tabla 32).

TABLA 32. Comparación de los niveles séricos medios \pm DE de los diferentes parámetros bioquímicos y nutricionales analizados en el estudio longitudinal (4 muestreos) en pacientes con insuficiencia renal.

PARÁMETRO	p	1 ^{er} MUESTREO	2 ^o MUESTREO	3 ^{er} MUESTREO	4 ^o MUESTREO
Glucosa (mg/dl)	0,148	99,1 \pm 41,8	97,6 \pm 44,9	89,2 \pm 19,2	93,8 \pm 25,0
Creatinina (mg/dl)	0,065	10,2 \pm 5,5	9,9 \pm 2,3	9,5 \pm 2,3	9,13 \pm 1,81
Urea (mg/dl)	0,061	153,1 \pm 34,5	140,9 \pm 36,3	145,2 \pm 38,8	148,8 \pm 36,8
Ácido úrico (mg/dl)	0,000	8,5 \pm 7,8	7,40 \pm 1,46	7,47 \pm 4,39	7,72 \pm 7,91
Triglicéridos (mg/dl)	0,570	125,2 \pm 68,5	125,4 \pm 78,9	108,9 \pm 51,2	126,1 \pm 66,3
Colesterol total (mg/dl)	0,000	181,7 \pm 44,6	165,0 \pm 40,3	152,9 \pm 38,2	155,6 \pm 39,8
Colesterol HDL (mg/dl)	0,000	45,8 \pm 14,7	47,3 \pm 15,9	37,0 \pm 13,6	43,7 \pm 13,8
Colesterol LDL (mg/dl)	0,000	111,01 \pm 35,4	94,5 \pm 31,12	94,4 \pm 32,3	87,4 \pm 32,7
GOT (U/l)	0,307	22,5 \pm 15,7	18,9 \pm 12,6	21,0 \pm 19,2	21,3 \pm 17,1
GPT (U/l)	0,628	23,9 \pm 26,4	21,2 \pm 18,8	22,6 \pm 22,0	23,0 \pm 20,1
Fosfatasa alcalina (U/l)	0,056	311,0 \pm 172	275,4 \pm 175,8	300,9 \pm 195,9	366,4 \pm 330,1
P (mg/dl)	0,000	6,5 \pm 1,8	5,7 \pm 1,6	6,1 \pm 3,3	4,9 \pm 1,3
He (g/dl)	0,804	6,31 \pm 3,31	6,48 \pm 2,68	6,08 \pm 2,83	7,40 \pm 3,25
Proteínas (g/dl)	0,001	7,1 \pm 0,8	6,6 \pm 0,86	6,7 \pm 0,7	6,8 \pm 1,0
Ca (mg/dl)	0,035	9,6 \pm 8,1	9,8 \pm 0,83	9,6 \pm 0,83	9,8 \pm 1,36
Bilirrubina (mg/dl)	0,002	0,56 \pm 0,54	0,59 \pm 0,25	0,63 \pm 0,27	0,80 \pm 1,04
GGT (U/l)	0,883	35,6 \pm 43,7	31,3 \pm 29,3	43,6 \pm 64,5	37,6 \pm 35,4
Colinesterasa (U/l)	0,282	7809 \pm 2401	8186 \pm 6476	6939 \pm 2378	7539 \pm 2901
CPK (U/l)	0,363	64,3 \pm 50,4	67,8 \pm 47,7	52,4 \pm 27,5	59,4 \pm 29,6
LDH ((U/l)	0,760	329 \pm 97,5	329 \pm 129	317 \pm 78,3	325 \pm 82,3
Amilasa (U/l)	0,331	124,5 \pm 51,9	114,4 \pm 49,8	117,6 \pm 56,4	119,6 \pm 53,9
Na (mEq/l)	0,048	139,4 \pm 3,6	138,0 \pm 3,1	138,0 \pm 2,3	137,9 \pm 3,4
K (mEq/l)	0,079	6,1 \pm 0,89	6,2 \pm 0,89	5,8 \pm 0,81	5,8 \pm 0,85
Cl (mEq/l)	0,173	96,7 \pm 4,8	97,6 \pm 4,6	95,4 \pm 3,10	95,9 \pm 5,10
Ferritina (μ g/l)	0,000	227,4 \pm 229,2	440 \pm 299	446,2 \pm 322,8	450,2 \pm 295,8
PTH (pg/ml)	0,896	438 \pm 372	419 \pm 386	450 \pm 494	495 \pm 570

Se observaron diferencias estadísticamente significativas para los parámetros bioquímicos de ácido úrico, colesterol total, colesterol HDL, colesterol LDL, P, proteínas, Ca, bilirrubina, Na y ferritina (Tabla 32, Figuras 29).

Es destacable en el estudio longitudinal el descenso significativo con los muestreos del colesterol total (del 1º al 2º, y del 2º al 3er muestreo) y del colesterol LDL (del 3er y 4º muestreos respecto al 1º. Para el colesterol HDL se aprecia un descenso significativo en el 3er muestreo respecto a los otros tres muestreos (Figura 29).

FIGURA 29. Diagrama de representación lineal [media \pm intervalos de confianza del 95% sobre las desviaciones estándar] de algunos de los parámetros bioquímicos, en pacientes hemodializados según el muestreo, para los que se han obtenido diferencias estadísticamente significativas (1: 1^{er} muestreo; 2: 2º muestreo; 3: 3^{er} muestreo; 4: 4º muestreo).

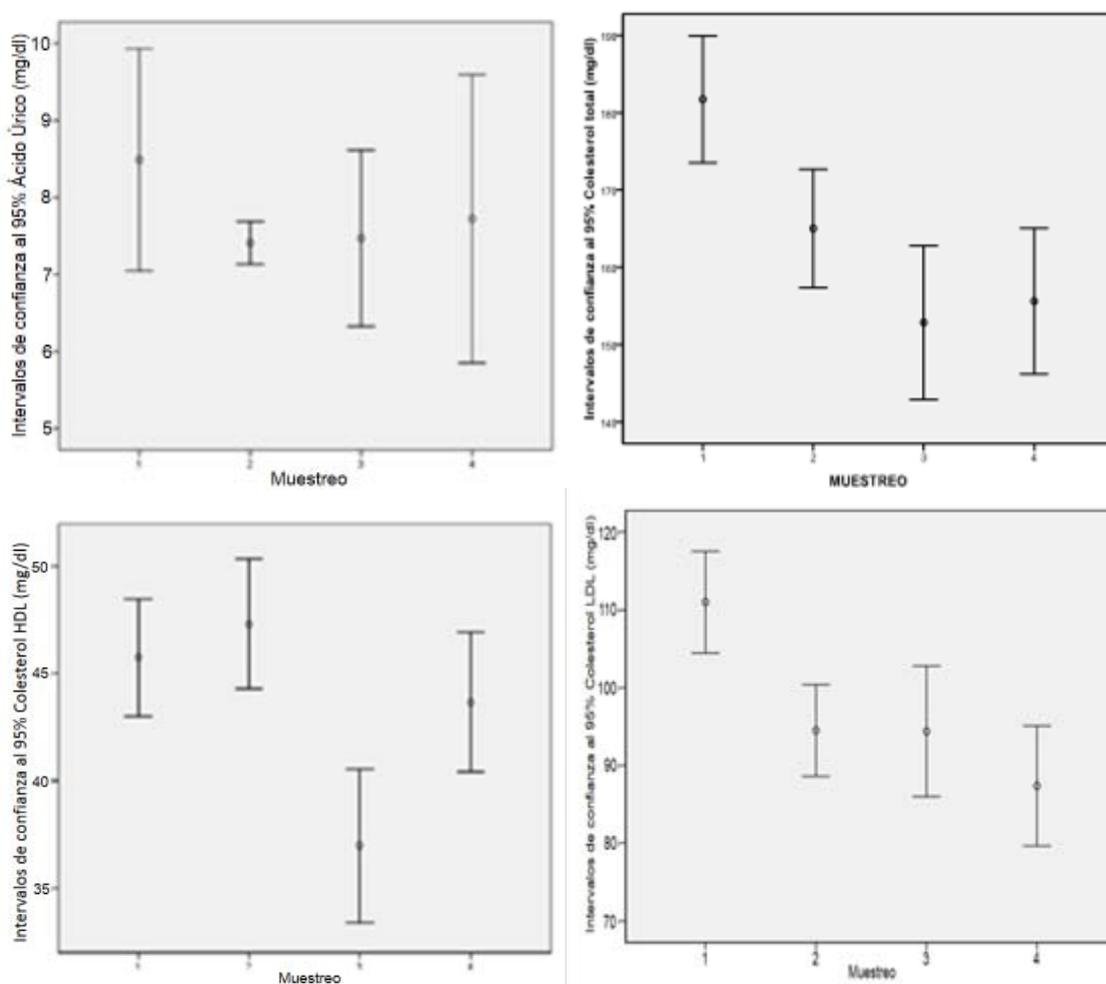
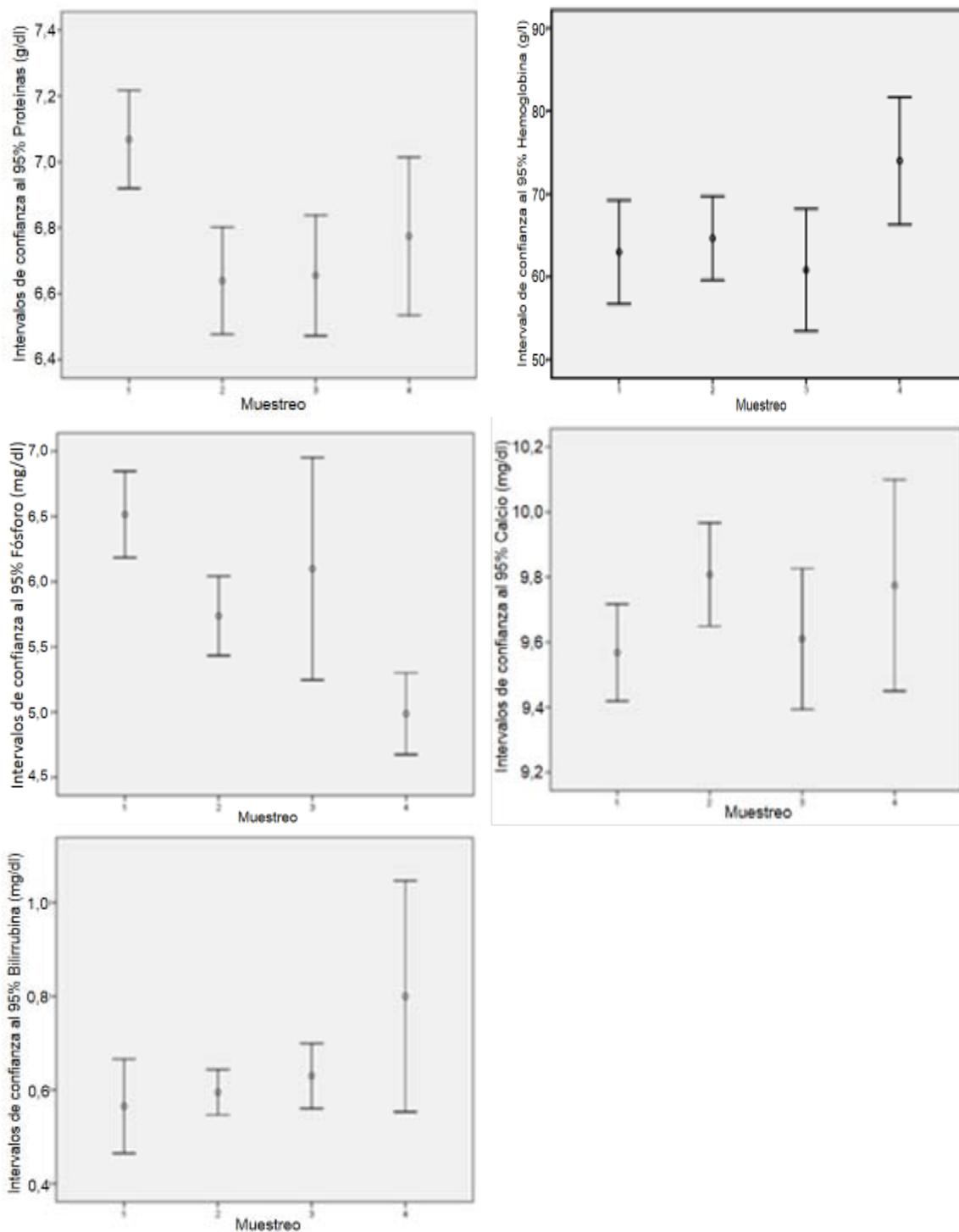


FIGURA 29 (Continuación). Diagrama de representación lineal [media \pm intervalos de confianza del 95% sobre las desviaciones estándar] de algunos de los parámetros bioquímicos, en pacientes hemodializados según el muestreo, en los que se han obtenido diferencias estadísticamente significativas (1: 1^{er} muestreo; 2: 2^o muestreo; 3: 3^{er} muestreo; 4: 4^o muestreo).



4.3.3.- RESULTADO DE PARAMETROS BIOQUIMICOS PLASMATICOS SEGÚN EL SEXO DE LOS PACIENTES.

En la tabla 33 apreciamos los niveles medios medidos para los parámetros bioquímicos en pacientes según el sexo, para los que se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) tales como creatinina, triglicéridos, colesterol total, HDL y LDL, GPT, fosfatasa alcalina, bilirrubina, GGT, colinesterasa, CPK, Na y ferritina.

TABLA 33. Niveles de significancia, y concentraciones medias para los distintos parámetros bioquímicos, hematológicos, y nutricionales estadísticamente significativos según el sexo en pacientes con insuficiencia renal.

PARÁMETROS	SIGNIFICANCIA	HOMBRES (Media \pm DE)	MUJERES (Media \pm DE)
Creatinina	0,000	9,14 \pm 4,63	10,3 \pm 2,26
Triglicéridos	0,002	133,4 \pm 74,1	113,3 \pm 62,8
Colesterol total	0,000	175,2 \pm 43,2	169,0 \pm 40,9
Colesterol HDL	0,010	46,3 \pm 14,6	42,6 \pm 15,2
Colesterol LDL	0,021	101,7 \pm 36,7	102,0 \pm 129,3
GPT	0,000	18,6 \pm 14,9	26,4 \pm 26,6
Fosfatasa alcalina	0,026	426 \pm 710	301 \pm 225
Bilirrubina	0,000	0,62 \pm 0,81	0,64 \pm 0,28
Colinesterasa	0,018	8533 \pm 6071	7266 \pm 2505
CPK	0,003	55,3 \pm 35,8	73,2 \pm 54,8
Na	0,004	138,3 \pm 3,60	139,5 \pm 3,10
Ferritina	0,004	396 \pm 325	270,9 \pm 220,6

4.3.4.- RESULTADOS SEGÚN PACIENTES SUJETOS A TRASPLANTE Y DECESO.

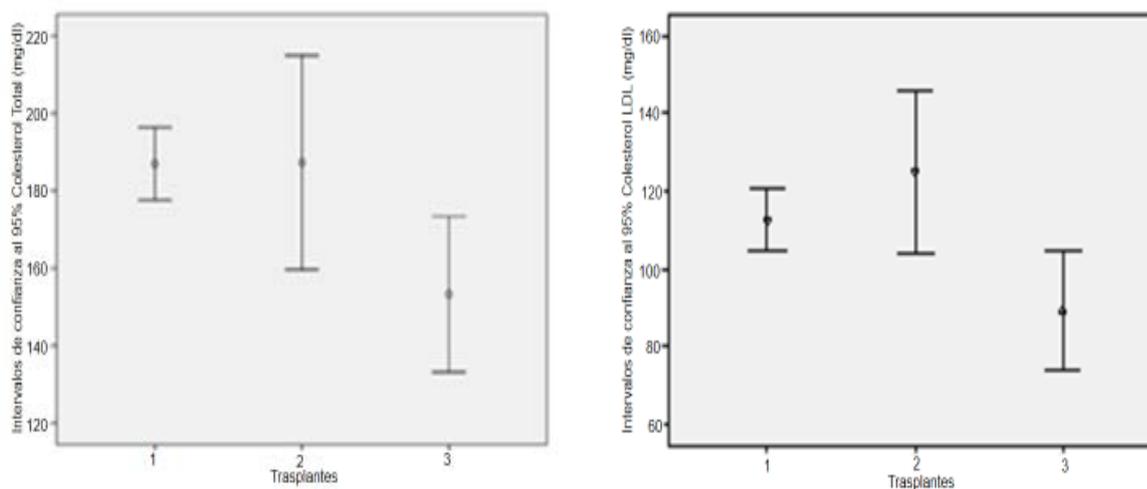
En la tabla 34 apreciamos los niveles medios medidos para los parámetros bioquímicos en pacientes según hayan sido sometidos a 1, varios trasplantes o hayan fallecido, para los que se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) tales como urea, ácido úrico, colesterol total y LDL, Ca y CPK.

Es destacable el hecho de que en los sujetos con insuficiencia renal sometidos a hemodiálisis que se produjo la muerte, se estableció una alteración aun más acusada (descenso estadísticamente significativo) de la regulación del metabolismo lipídico sustentada en una disminución significativa en los niveles plasmáticos de colesterol total y LDL (Tabla 34, Figura 30).

TABLA 34. Niveles de significancia, y concentraciones medias para los distintos parámetros bioquímicos, hematológicos, y nutricionales estadísticamente significativos según trasplante o deceso en pacientes con insuficiencia renal.

PARÁMETROS	<i>p</i>	NO TRASPLANTE		SI TRASPLANTE		DECESO	
		<i>N</i>	Media ± DE	<i>n</i>	Media ± DE	<i>n</i>	Media ± DE
Urea	0,006	412	153,5±35,5	52	175,7±22,5	76	136,9±28,1
Ácido úrico	0,041	412	8,1±0,61	52	13,8±18,7	76	7,1±0,97
Colesterol total	0,012	412	186,9±44,0	52	187,3±41,1	76	153,3±40,4
Colesterol LDL	0,009	412	112,5±37,3	52	125,0±29,4	76	89,1±30,9
Ca	0,041	412	9,6 ±0,71	52	9,5 ±1,6	76	9,3 ±0,58
CPK	0,031	412	62,5±40,6	52	112,4±103,7	76	43,3±22,7

FIGURA 30. Diagrama de representación lineal [media \pm intervalos de confianza del 95% sobre las desviaciones estándar] del colesterol total y LDL en pacientes hemodializados según hayan sido sometidos a trasplantes (2) o no (1) o hayan fallecido (3).



4.3.5.- RESULTADOS DE PARAMETROS BIOQUIMICOS SEGÚN GRUPO DE EDAD DE LOS ENFERMOS.

En la tabla 35 apreciamos los niveles medios medidos para los parámetros bioquímicos en pacientes según el grupo de edad considerado, para los que se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) tales como glucosa, colesterol total, HDL y LDL, triglicéridos, GPT, GOT, fosfatasa alcalina, proteínas bilirrubina, GGT, colinesterasa, amilasa, K y Al (Tabla 35).

TABLA 35. Niveles de significancia, y concentraciones medias para los distintos parámetros bioquímicos, hematológicos, y nutricionales estadísticamente significativos según grupo de edad en pacientes con insuficiencia renal.

PARÁMETRO	P	PARÁMETRO	P	PARÁMETRO	P
Glucosa	0,002	GOT	0,017	GGT	0,020
Colesterol Total	0,005	GPT	0,002	Colinesterasa	0,001
Colesterol HDL	0,007	Fosfatasa alcalina	0,000	Amilasa	0,001
Colesterol LDL	0,004	Proteínas	0,021	K	0,044
Triglicéridos	0,001	Bilirrubina	0,028	Al	0,027

De forma global se aprecia que para la glucosa y la colinesterasa, los niveles sanguíneos aumentan y disminuyen significativamente con la edad de los pacientes, respectivamente (Figura 31). Por el contrario para el metabolismo

lipídico en función de los grupos de edad considerados, al aumentar la edad de forma significativa se disminuyen los niveles de colesterol total y LDL, así como de triglicéridos (Figura 32).

FIGURA 31. Diagrama de representación lineal [media \pm intervalos de confianza del 95% sobre las desviaciones estándar] de los niveles de glucosa y colinesterasa en pacientes hemodializados según el grupo de edad (1: <30 años; 2: 30 a <40 años; 3: 40 a <50 años; 4: 50 a <60 años; 5: 60 a <70 años; 6: 70 a <80 años; 7: 80 a <90 años).

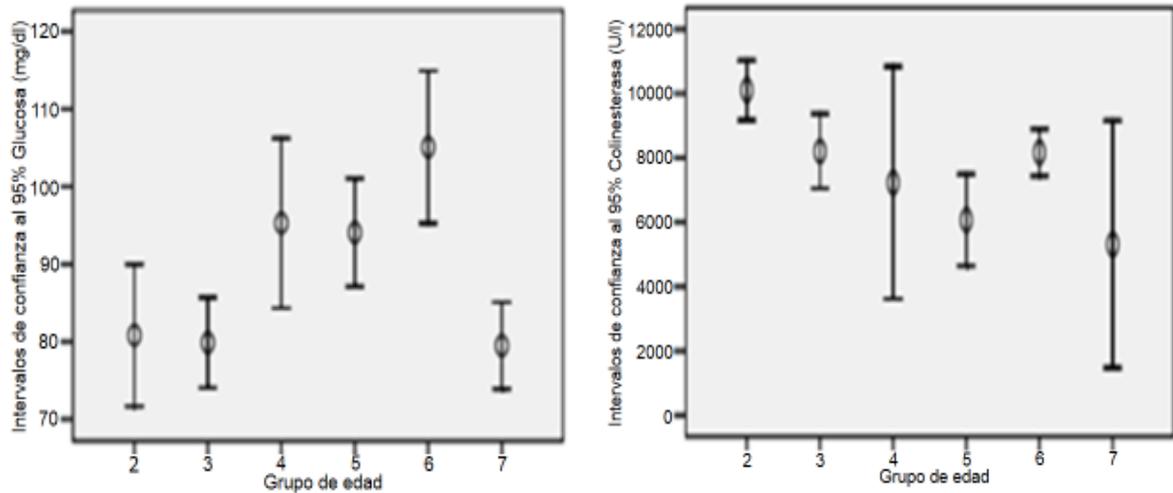
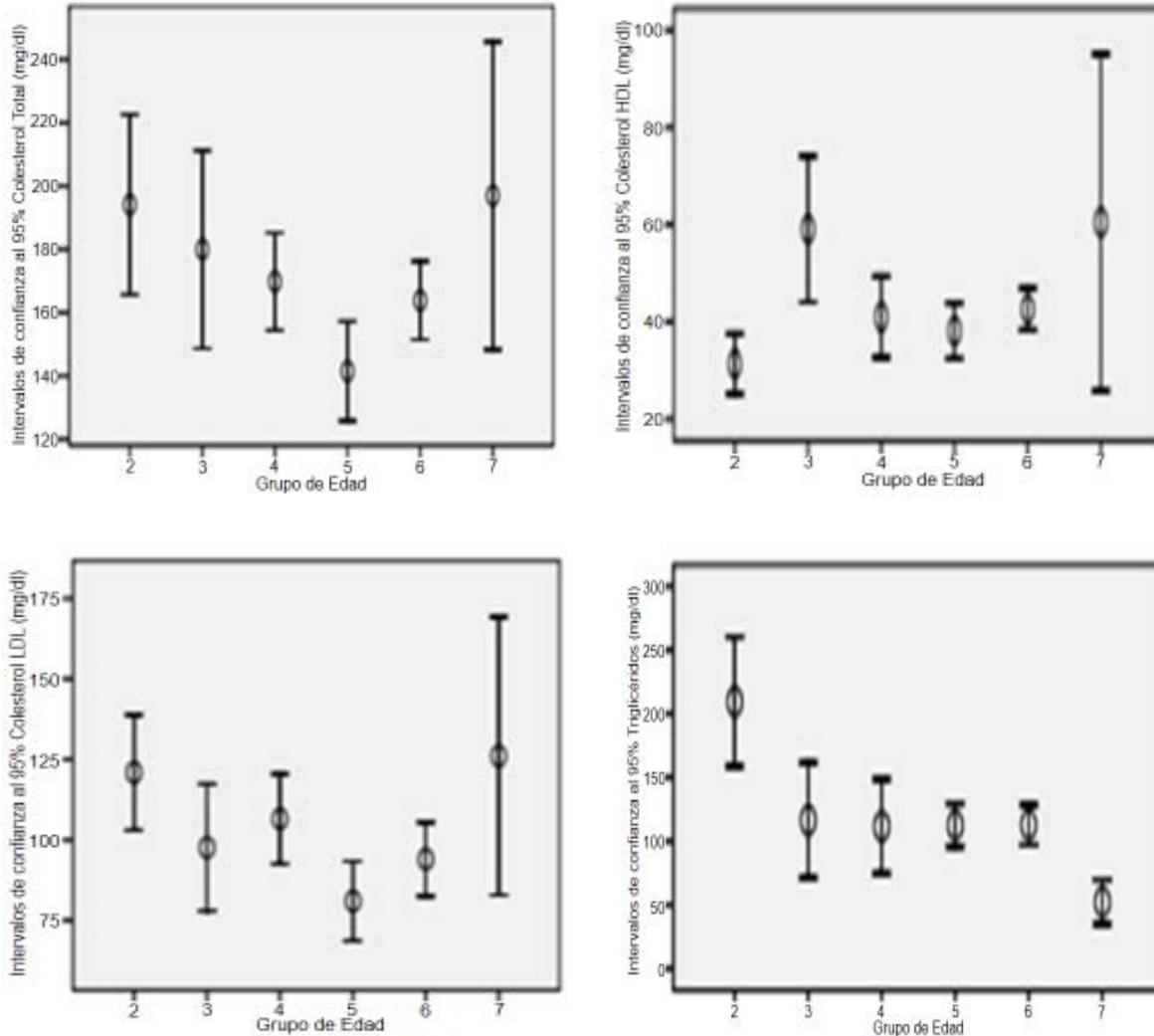


FIGURA 32. Diagrama de representación lineal [media \pm intervalos de confianza del 95% sobre las desviaciones estándar] del colesterol total, HDL y LDL y de triglicéridos en pacientes hemodializados según el grupo de edad (1: <30 años; 2: 30 a <40 años; 3: 40 a 50 años; 4: 50 <60 años; 5: 60 a <70 años; 6: 70 a <80 años; 7: 80 a <90 años).



4.3.6.- RESULTADOS EN PACIENTES SEGÚN LA ETIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD.

En la tabla 36 apreciamos los niveles medios medidos para los parámetros bioquímicos en pacientes según la etiología de la enfermedad, para los que se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) tales como glucosa, creatinina, triglicéridos, colesterol HDL y LDL, GPT, Ca, bilirrubina, GGT, colinesterasa, CPK, LDH, K y Cl.

En la figura 33 se detallan las media \pm intervalos de confianza del 95% sobre las desviaciones estándar de estos parámetros bioquímicos según la etiología de la insuficiencia renal.

TABLA 36. Niveles de significancia, y concentraciones medias para los distintos parámetros bioquímicos, hematológicos, y nutricionales estadísticamente significativos según la etiología de la enfermedad de pacientes con insuficiencia renal.

PARÁMETRO	P	PARÁMETRO	p	PARÁMETRO	P
Glucosa	0,027	GPT	0,041	CPK	0,001
Creatinina	0,007	Ca	0,003	LDH	0,017
Triglicéridos	0,017	Bilirrubina	0,039	K	0,021
Colesterol HDL	0,001	GGT	0,036	Cl	0,020
Colesterol LDL	0,015	Colinesterasa	0,013		

FIGURA 33. Diagrama de representación lineal [media \pm intervalos de confianza del 95% sobre las desviaciones estándar] de glucosa, creatinina, colesterol HDL, Ca y CPK en pacientes hemodializados según la etiología de la insuficiencia renal.

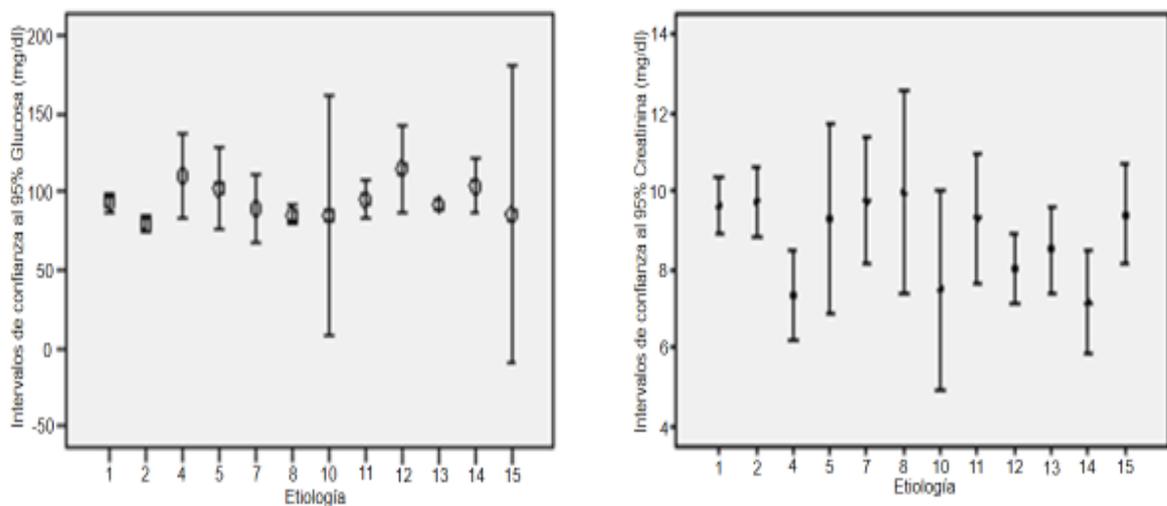
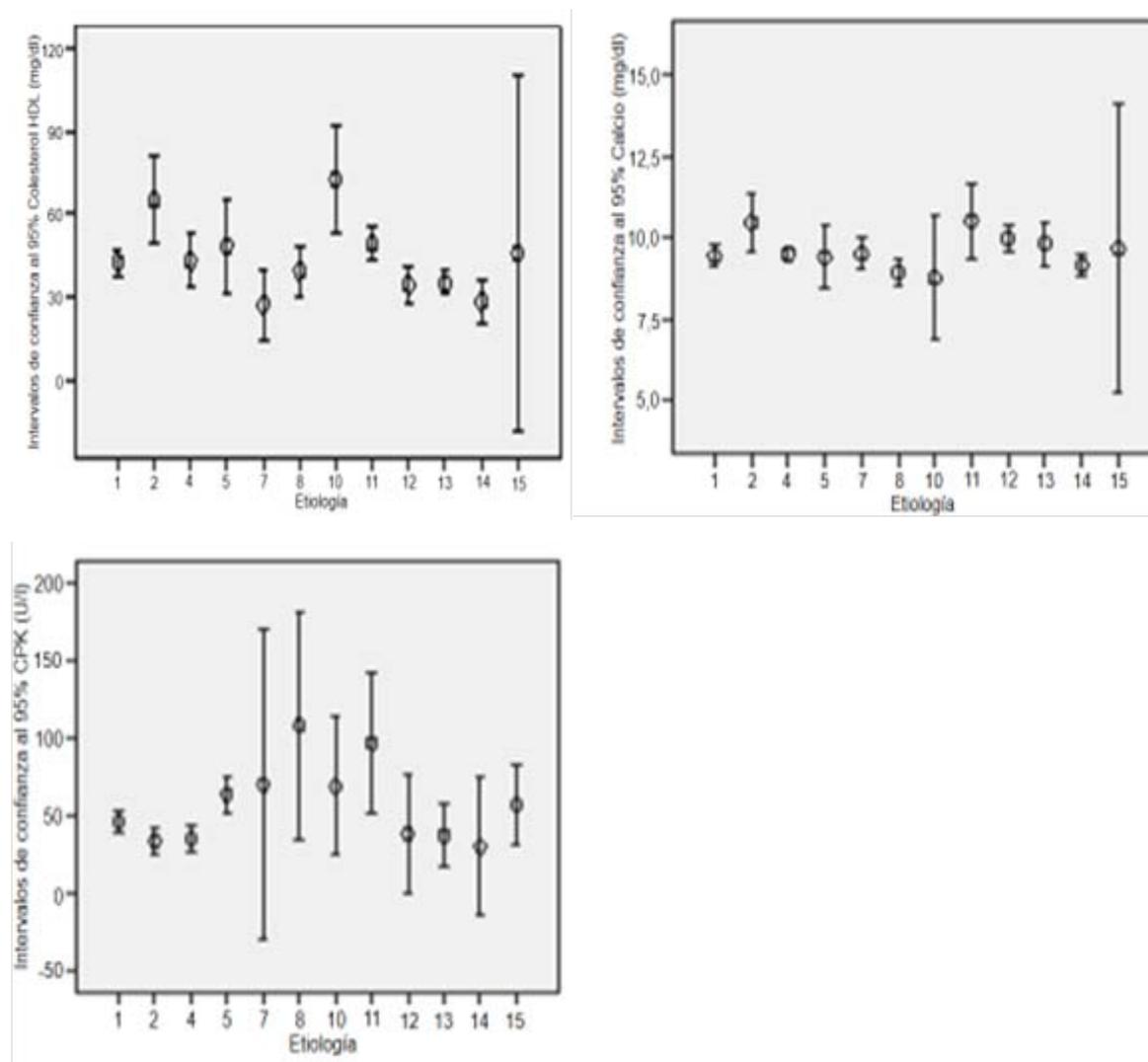


FIGURA 33 (Continuación). Diagrama de representación lineal [media \pm intervalos de confianza del 95% sobre las desviaciones estándar] de glucosa, creatinina, colesterol HDL, Ca y CPK en pacientes hemodializados según la etiología de la insuficiencia renal.



4.3.7.- RESULTADOS DE ANALISIS BIOQUIMICOS EN LOS DIFERENTES GRUPOS SEGÚN EL CONSUMO DE MEDICAMENTOS PARA CONTROL DE PATOLOGÍAS ASOCIADAS Y SUPLEMENTOS.

En la tabla 37 podemos observar los resultados medidos para los parámetros bioquímicos en pacientes según el consumo de diferentes medicamentos y suplementos, para los que se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) así como la explicación de los grupos entre los que se establecieron tales diferencias.

TABLA 37. Estudio estadístico referente a la influencia del consumo de suplementos y diferentes medicamentos en los diferentes parámetros bioquímicos analizados en los pacientes estudiados.

MEDICAMENTO O SUPLEMENTO	PARÁMETRO	p	DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS
ANTIANEMICOS	Colesterol total	0,024	Los niveles en el grupo que consumió varios antianémicos fueron significativamente superiores frente a los que tomaron sólo 1 o ninguno.
	Triglicéridos	0,049	Los niveles de los que tomaron antianémicos fueron significativamente menores a los que no tomaron.
	Fosfatasa alcalina	0,015	Los niveles de los que tomaron varios antianémicos fueron significativamente menores a los que no tomaron.
	PTH	0,019	Los niveles en el grupo que tomaba antianémicos fueron significativamente mayores.
ANTI K y P	Urea	0,018	Los niveles de los que tomaron varios anti K y P fueron significativamente mayores que los que toman 1 o ninguno.
	Colesterol HDL	0,004	Los niveles de los que tomaron 1 anti K y P fueron significativamente mayores que los que toman varios o ninguno.
	Fosfatasa alcalina	0,015	Los niveles de los que no tomaron anti K y P fueron significativamente inferiores.
	Ca	0,010	Los niveles de los que tomaron 1 anti K y P fueron significativamente mayores que los que toman varios.
HIPERCALCEMIANTES	P	0,022	Niveles significativamente menores en los que tomaban 1 hipercalcemiante.
	Ca	0,000	Niveles significativamente mayores en los que tomaban hipercalcemiantes.
	PTH	0,003	Niveles significativamente menores en los que tomaban varios hipercalcemiantes.
	Amilasa	0,009	Niveles significativamente mayores en los que no tomaban hipercalcemiantes.
	Urea	0,037	Niveles significativamente menores en los que no tomaban hipercalcemiantes frente a los que tomaban varios.
DIURÉTICOS	Creatinina	0,000	Niveles significativamente menores en consumidores.
	Urea	0,007	Niveles significativamente menores en consumidores.
	Colesterol total	0,000	Niveles significativamente mayores en consumidores.
	LDL	0,000	Niveles significativamente mayores en consumidores.
	Fosfatasa alcalina	0,048	Niveles significativamente mayores en consumidores.
	Ca	0,000	Niveles significativamente mayores en consumidores.
	GGT	0,028	Niveles significativamente menores en los consumidores.
	Colinesterasa	0,000	Niveles significativamente mayores en los consumidores de diuréticos.
Ferritina	0,042	Niveles significativamente menores en los consumidores de diuréticos.	
GÁSTRICO	Triglicéridos	0,007	Niveles significativamente menores en los que no tomaron.
	Fosfatasa alcalina	0,003	Niveles significativamente menores en los que no tomaron.
	Ca	0,002	Niveles significativamente menores en los que tomaron varios, respecto a los que tomaron 1 o ninguno.
	Colinesterasa	0,010	Niveles significativamente mayores en los que no tomaron.
	PTH	0,005	Niveles significativamente mayores en los que tomaron varios.
Colesterol total	0,000	Niveles significativamente mayores en los que tomaron varios.	

MEDICAMENTO O SUPLEMENTO	PARÁMETRO	<i>p</i>	DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS
VASODILATADORES	Colesterol LDL	0,007	Niveles significativamente mayores en los que tomaron vasodilatadores.
	Proteínas	0,022	Niveles significativamente menores en los que tomaron vasodilatadores.
	Colesterol total	0,046	Niveles significativamente mayores en los que tomaron vasodilatadores.
ANTIHIPERTENSIVOS	Glucosa	0,010	Niveles significativamente menores en los que tomaron 1 antihipertensivo.
	Colesterol HDL	0,044	Niveles significativamente menores en los que tomaron varios antihipertensivos.
	GOT	0,002	Niveles significativamente mayores en los que no tomaron antihipertensivos.
	GPT	0,009	Niveles significativamente menores en los que no tomaron antihipertensivos frente a los que tomaron varios.
	Proteínas	0,036	Niveles significativamente menores en los que tomaron varios antihipertensivos.
	Colinesterasa	0,013	Niveles significativamente menores en los que tomaron varios antihipertensivos.
	Colesterol total	0,05	Niveles significativamente mayores en los que tomaron 1 antihipertensivo.
	Amilasa	0,001	Niveles significativamente mayores en los que no tomaron antihipertensivos.
PSICOTROPOS	CPK	0,020	Niveles significativamente menores en los que tomaron varios psicotropos frente a los que no tomaron.
CORTISONA	Urea	0,025	Niveles significativamente mayores en los que no tomaron cortisona.
	Colesterol HDL	0,008	Niveles significativamente mayores en los que tomaron cortisona.
	Ca	0,001	Niveles significativamente mayores en los que no tomaron cortisona.
	Bilirrubina	0,010	Niveles significativamente mayores en los que no tomaron cortisona.
	LDH	0,013	Niveles significativamente mayores en los que tomaron cortisona.
SANGRE	He	0,039	Niveles significativamente mayores en los que no tomaron el medicamento.
CEREBRO	Creatinina	0,045	Niveles significativamente menores en los que tomaron varios medicamentos.
	Triglicéridos	0,022	Niveles significativamente menores en los que tomaron varios medicamentos.
	Ca	0,043	Niveles significativamente mayores en los que no tomaron el medicamento.
	GGT	0,029	Niveles significativamente mayores en los que tomaron varios medicamentos.
	LDH	0,038	Niveles significativamente mayores en los que tomaron varios medicamentos.
	Cl	0,000	Niveles significativamente mayores en los que no tomaron el medicamento.

MEDICAMENTO O SUPLEMENTO	PARÁMETRO	P	DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS
PLAQUETAS	Creatinina	0,015	Niveles significativamente mayores en los que tomaron el medicamento.
	GOT	0,000	Niveles significativamente menores en los que tomaron el medicamento.
	Fosfatasa alcalina	0,003	Niveles significativamente mayores en los que tomaron el medicamento.
	Proteínas	0,018	Niveles significativamente menores en los que tomaron el medicamento.
	Amilasa	0,006	Niveles significativamente mayores en los que tomaron el medicamento.
GOTA	Urea	0,011	Niveles significativamente mayores en los que tomaron el medicamento.
	Colesterol HDL	0,004	Niveles significativamente menores en los que tomaron el medicamento.
	He	0,028	Niveles significativamente menores en los que tomaron el medicamento.
	Bilirrubina	0,028	Niveles significativamente mayores en los que tomaron el medicamento.
	Ferritina	0,044	Niveles significativamente menores en los que tomaron el medicamento.
	PTH	0,024	Niveles significativamente mayores en los que tomaron el medicamento.
COLESTEROL	Creatinina	0,001	Niveles significativamente menores en los que tomaron el medicamento.
	Urea	0,010	Niveles significativamente menores en los que tomaron el medicamento.
	Triglicéridos	0,000	Niveles significativamente mayores en los que tomaron el medicamento.
	Colesterol LDL	0,000	Niveles significativamente mayores en los que tomaron el medicamento.
	Fosfatasa alcalina	0,029	Niveles significativamente mayores en los que tomaron el medicamento.
	CPK	0,019	Niveles significativamente menores en los que tomaron el medicamento.
	PTH	0,045	Niveles significativamente mayores en los que tomaron el medicamento.
	Colesterol total	0,000	Niveles significativamente mayores en los que tomaron el medicamento.
FACTOR B-K	Triglicéridos	0,000	Niveles significativamente mayores en los que tomaron varios medicamentos.
	Colesterol HDL	0,033	Niveles significativamente mayores en los que tomaron 1 medicamento.
	Colesterol LDL	0,044	Niveles significativamente mayores en los que tomaron varios medicamentos.
	GOT	0,026	Niveles significativamente mayores en los que tomaron varios medicamentos.
	Colinesterasa	0,028	Niveles significativamente menores en los que tomaron 1 medicamento.
	LDH	0,001	Niveles significativamente mayores en los que tomaron varios medicamentos.
	CI	0,034	Niveles significativamente mayores en los que no tomaron medicamentos.
	PTH	0,000	Niveles significativamente mayores en los que no tomaron medicamentos.
	Colesterol total	0,001	Niveles significativamente mayores en los que tomaron varios medicamentos.

MEDICAMENTO O SUPLEMENTO	PARÁMETRO	P	DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS
CORAZÓN	Glucosa	0,024	Niveles significativamente mayores en los que tomaron el medicamento.
	Proteínas	0,001	Niveles significativamente menores en los que tomaron el medicamento.
	Ca	0,045	Niveles significativamente menores en los que tomaron el medicamento.
	CPK	0,019	Niveles significativamente menores en los que tomaron el medicamento.
	Na	0,001	Niveles significativamente menores en los que tomaron el medicamento.
PREVENCIÓN INFARTOS	Triglicéridos	0,003	Niveles significativamente mayores en los que tomaron el medicamento.
	Colesterol HDL	0,003	Niveles significativamente menores en los que tomaron el medicamento.
	Na	0,022	Niveles significativamente menores en los que tomaron el medicamento.
	Cl	0,008	Niveles significativamente menores en los que tomaron el medicamento.
	Amilasa	0,005	Niveles significativamente menores en los que tomaron el medicamento.

4.4.- ANÁLISIS DE REGRESIÓN ENTRE LOS NIVELES DE LOS DISTINTOS MINERALES Y PARÁMETROS BIOQUÍMICOS ANALIZADOS EN ENFERMOS CON INSUFICIENCIA RENAL.

En la tabla 38 se recogen los valores de los niveles de significancia y los de los coeficientes de correlación correspondientes, obtenidos al aplicar el análisis de regresión lineal entre las concentraciones de los distintos minerales y los parámetros bioquímicos analizados en los enfermos con insuficiencia renal, para los que se ha obtenido una correlación lineal estadísticamente significativa, tras la aplicación de los test de Pearson o de Spearman según los modelos fuesen paramétricos o no paramétricos, respectivamente. Es de destacar la existencia de relaciones estadísticamente significativas y positivas entre los niveles de Cu y Al.

TABLA 38. Valores de los coeficientes de correlación lineal y los niveles de significancia correspondientes (entre paréntesis) para los que se han obtenido relaciones lineales estadísticamente significativas al realizar el análisis de regresión lineal entre los parámetros bioquímicos analizados.

PARÁMETRO	Zn	Cu	Cu/Zn	Al	LDL/HDL	GLUCOSA	CREATININA
Zn		-0,120 (0,012)	-0,689 (0,000)				
Cu	-0,120 (0,012)		0,761 (0,000)	0,170 (0,003)			
Al		0,170 (0,003)					0,210 (0,000)
Glucosa			0,127 (0,024)		0,208 (0,000)		-0,156 (0,002)
Creatinina				0,210 (0,000)		-0,156 (0,002)	
Urea	-0,142 (0,010)		0,113 (0,044)				0,511 (0,000)
Ácido úrico			-0,128 (0,022)	0,188 (0,001)			0,423 (0,000)
Triglicéridos	0,116 (0,037)				0,480 (0,000)	0,241 (0,000)	
Colesterol total			0,111 (0,049)		0,398 (0,000)	0,144 (0,004)	-0,213 (0,000)
Colesterol HDL					-0,557 (0,000)	-0,157 (0,002)	-0,140 (0,007)
Colesterol LDL	-0,120 (0,031)		0,111 (0,049)		0,599 (0,000)	0,180 (0,000)	-0,149 (0,004)
GOT				0,173 (0,002)			-0,137 (0,008)
GPT				0,149 (0,008)			
Fosfatasa alcalina	-0,174 (0,002)	0,111 (0,049)	0,181 (0,001)				
P	-0,173 (0,002)				0,157 (0,003)		0,408 (0,000)
He		-0,146 (0,009)					
Proteínas	-0,173 (0,002)	0,156 (0,005)	0,200 (0,000)	0,173 (0,002)	0,183 (0,000)		
Ca				0,140 (0,012)			
Bilirrubina				0,149 (0,008)	-0,117 (0,025)	-0,122 (0,017)	0,163 (0,002)
GGT				0,217 (0,001)			
Colinesterasa					0,242 (0,000)		
CPK	0,140 (0,032)						0,349 (0,000)
LDH		0,213 (0,001)	0,184 (0,005)	0,244 (0,000)			
Amilasa						-0,148 (0,022)	0,172 (0,008)
Na				0,135 (0,041)			
K				0,182 (0,006)		-0,148 (0,023)	
Cl				-0,139 (0,036)			
Ferritina	0,279 (0,000)		-0,204 (0,003)				-0,155 (0,018)
PTH					0,157 (0,005)		

PARÁMETRO	UREA	ÁCIDO ÚRICO	TRIGLICÉRIDOS	COLESTEROL TOTAL	COLESTEROL HDL	COLESTEROL LDL	GOT
Urea		0,447 (0,000)	0,121 (0,016)	-0,181 (0,000)	-0,179 (0,000)	-0,132 (0,010)	
Ácido úrico	0,447 (0,000)		0,163 (0,001)		-0,157 (0,002)		
Triglicéridos	0,121 (0,016)	0,163 (0,001)		0,342 (0,000)	-0,373 (0,000)		-0,118 (0,020)
Colesterol total	-0,181 (0,000)		0,342 (0,000)		0,367 (0,000)		
Colesterol HDL	-0,179 (0,000)	-0,157 (0,002)	-0,373 (0,000)	0,367 (0,000)			
Colesterol LDL	-0,132 (0,010)		0,313 (0,000)	0,904 (0,000)	0,157 (0,002)		
GOT			-0,118 (0,020)				
GPT							0,661 (0,000)
Fosfatasa alcalina							0,115 (0,032)
P	0,214 (0,000)	0,302 (0,000)		0,160 (0,003)		0,185 (0,000)	-0,132 (0,013)
He			0,140 (0,008)	0,136 (0,010)			
Proteínas				0,190 (0,000)		0,202 (0,000)	
Ca							
Bilirrubina			-0,181 (0,000)	-0,292 (0,000)	-0,111 (0,033)	-0,278 (0,000)	0,149 (0,004)
GGT						-0,130 (0,041)	0,429 (0,000)
Colinesterasa			0,288 (0,000)	0,405 (0,000)		0,370 (0,000)	-0,153 (0,015)
CPK	0,246 (0,000)	0,203 (0,001)			0,211 (0,001)		0,160 (0,011)
LDH				0,130 (0,041)			0,378 (0,000)
Amilasa	0,295 (0,000)	0,252 (0,000)		0,191 (0,003)		0,128 (0,048)	
Na				0,157 (0,015)			
K	0,245 (0,000)			-0,146 (0,024)			
Cl			-0,138 (0,033)		0,156 (0,017)		
Ferritina				-0,151 (0,022)		-0,166 (0,012)	

PARÁMETRO	GPT	FOSFATASA ALCALINA	P	He	PROTEÍNAS	Ca	BILIRRUBINA	GGT
GPT				0,124 (0,020)		0,120 (0,024)	0,218 (0,000)	0,517 (0,000)
Fosfatasa alcalina				-0,139 (0,010)			0,118 (0,028)	0,261 (0,000)
P					0,105 (0,048)			-0,145 (0,022)
He	0,124 (0,020)	-0,139 (0,010)				0,129 (0,016)		
Proteínas			0,105 (0,048)			0,266 (0,000)	0,188 (0,000)	
Ca	0,120 (0,024)			0,129 (0,016)	0,266 (0,000)		0,276 (0,000)	
Bilirrubina	0,218 (0,000)	0,118 (0,028)			0,188 (0,000)	0,276 (0,000)		
GGT	0,517 (0,000)	0,260 (0,000)	-0,145 (0,022)					
Colinesterasa				0,137 (0,032)	0,298 (0,000)	0,250 (0,000)		-0,166 (0,009)
CPK	0,320 (0,000)	-0,141 (0,026)	0,199 (0,002)		0,142 (0,025)		0,283 (0,000)	
LDH	0,301 (0,000)					-0,127 (0,045)		0,213 (0,001)
Amilasa				0,164 (0,011)	0,205 (0,002)	0,242 (0,000)	0,197 (0,002)	
Na					0,175 (0,007)	0,187 (0,004)		
K			0,202 (0,002)					
Cl		-0,191 (0,003)						
Ferritina	0,175 (0,008))		-0,285 (0,000)		-0,147 (0,026)			0,216 (0,001)
PTH		0,260 (0,000)	0,286 (0,000)	-0,118 (0,034)			0,179 (0,001)	

PARÁMETRO	COLINESTERASA	CPK	LDH	AMILASA	Na	K	Cl	FERRITINA
Proteínas	0,298 (0,00)	0,142 (0,025)						
Colinesterasa		0,157 (0,013)		0,224 (0,001)	0,192 (0,003)			
CPK	0,157 (0,013)		0,285 (0,000)	0,237 (0,000)	0,179 (0,006)			
LDH		0,285 (0,000)				0,243 (0,000)		
Amilasa	0,224 (0,001)	0,237 (0,000)						
Na	0,192 (0,003)	0,179 (0,006)					0,478 (0,000))	
K			0,243 (0,000)					
Cl					0,478 (0,000)			
Ferritina								
PTH				0,174 (0,008)				

5.- DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.

5.1.- NIVELES SÉRICOS DE Zn.

5.1.1.- ANÁLISIS COMPARATIVO DE NIVELES DE Zn EN PACIENTES HEMODIALIZADOS FRENTE A LOS CONTROLES SANOS.

En primer lugar podemos destacar la disminución notable de los niveles de cinc sérico en individuos con insuficiencia renal y hemodializados respecto al grupo control de individuos sanos. Este hecho ha sido ampliamente descrito con anterioridad por otros investigadores (Miura y col., 1999; Vanholder y col., 2002; Ribeiro y col., 2004; Hsieh y col., 2005; Navarro-Alarcón y col., 2006; Sahin y col., 2009; Tonelli y col., 2009; Rucker y col., 2010) quienes han llegado a los mismos resultados obtenidos en este trabajo. En todos estos estudios, se pone de manifiesto como principal causa de la hipocinqueimia plasmática referida, un incremento de la excreción urinaria de cinc, aunque en otros también se indica de manera adicional un descenso en la absorción intestinal de este elemento (Mahajan y col., 1982; Ranaldi y col., 2002). Otro importante factor que afecta a las concentraciones plasmáticas de cinc y claramente descrito en la bibliografía, es el menor consumo de proteínas en pacientes con insuficiencia renal, pues la ingesta de este mineral está directamente relacionada con el consumo proteico (Burge y col., 1984).

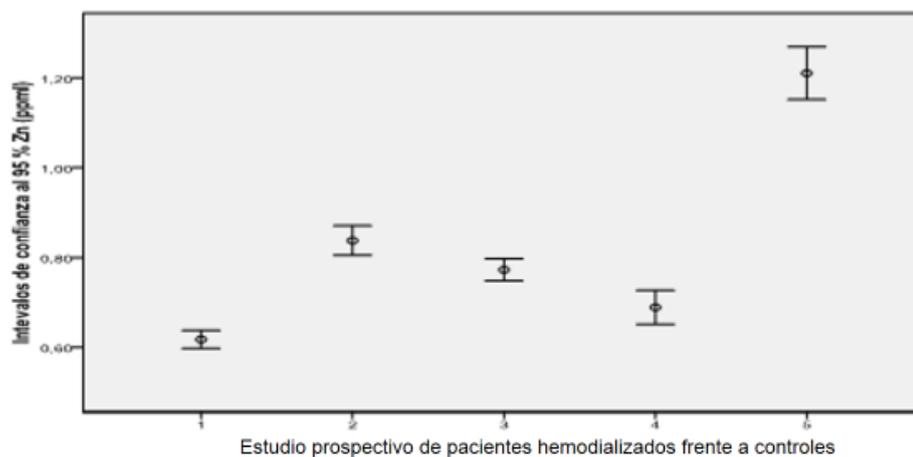
Contrariamente a lo indicado con anterioridad, Cabral y col. (2005) no encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar los niveles séricos de este oligoelemento en pacientes hemodializados frente a voluntarios sanos de la misma región geográfica.

5.1.2.- ESTUDIO LONGITUDINAL DE LOS NIVELES SÉRICOS DE Zn EN PACIENTES HEMODIALIZADOS.

Si analizamos los datos obtenidos para las concentraciones de Zn en el estudio longitudinal realizado en los pacientes hemodializados, se aprecia una concentración significativamente más baja de éste elemento en el primer muestreo (Tabla 20). Adicionalmente, hemos comprobado como los niveles séricos de Zn disminuyeron significativamente desde el 2º al 3º muestreo, así como desde éste último al 4º (Figura 34). La disminución descrita coincide con el estudio de Hung y col. (1997), y parece ser que podría estar relacionada con una actividad en el organismo más acusada con el tiempo, de las alteraciones

metabólicas asociadas a la hemodiálisis, así como con la perpetuación en la restricción del consumo proteico a la que suelen estar sometidos estos pacientes.

FIGURA 34. Estudio prospectivo de los niveles séricos de Zn en los pacientes hemodializados (1: 1^{er} muestreo; 2: 2^o muestreo; 3: 3^{er} muestreo; 4: 4^o muestreo) frente a los controles sanos (5).



5.1.3.- INFLUENCIA DE LOS FACTORES (SEXO, GRUPO DE EDAD, TRASPLANTES, ETIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD Y TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO) EN LOS NIVELES SÉRICOS DE Zn.

En cuanto al sexo, si bien no existen diferencias significativas en los resultados obtenidos, se aprecia una tendencia a la significancia con niveles séricos de Zn más elevados en los hombres que en las mujeres ($p= 0,052$). Este hallazgo puede estar relacionado con el mayor consumo de energía y proteínas descrito en bibliografía en sujetos masculinos (As´Habi y col., 2011).

En lo referente a la posible influencia de la edad de los pacientes objeto del estudio, podemos observar que, a medida que aumenta la edad de los enfermos, existe una tendencia ($p= 0,056$) a la disminución de los niveles séricos de cinc, especialmente a partir de los 50 años (Figura 13), resultado al que también llegaron en estudios previos otros investigadores (Sema y col., 2005). Concretamente, los niveles medios determinados en los sujetos con edades comprendidas entre 60-<70 y 70-<80 años, fueron significativamente inferiores a los determinados en el grupo con edades comprendidas entre 40-<50 años, así como en el de 30-<40 años, según se observó en test de rango múltiple. Por lo tanto, parece apreciarse que, con el envejecimiento, existe una tendencia a la

disminución significativa de los niveles séricos de Zn. Una posible explicación podría ser el deterioro de la ingesta dietética de este elemento y menor ingesta energética que se produce en las personas de edad avanzada, así como una disminución de la capacidad de absorción asociada al envejecimiento (Mocchegiani y col., 1995; Pepersack y col., 2001; Chandra, 2004). Adicionalmente, según lo indicado por otros investigadores (Mocchegiani y col., 2000, 2002), con el incremento de la edad, las metalotioneinas disminuyen la capacidad de fijación principalmente del Cu y de otros minerales, aunque por el contrario, aumentan la establecida con el Zn, lo que podría asociarse igualmente con el descenso en los niveles séricos de este elemento con el incremento de la edad apreciado en este estudio.

El **trasplante renal** al que fueron sometidos algunos de los pacientes estudiados no influyó significativamente en las concentraciones séricas de Zn.

Ni el **consumo de medicamentos**, ni la **etiología de la enfermedad**, influyeron significativamente en los niveles séricos de cinc, resultado que coincide con lo apreciado por nuestro grupo de investigación en un estudio previo (Navarro-Alarcón y col. 2006). A pesar de ello, en el presente estudio, sí se han apreciado valores menores en enfermos aquejados de glomerulonefritis en comparación con los que sufrían pielonefritis.

Si analizamos la posible influencia de los **distintos medicamentos** consumidos por los pacientes podemos distinguir dos grupos:

- Por un lado, tendríamos los medicamentos que pueden afectar directamente a las concentraciones de otros minerales en plasma, tales como antianémicos, antipotasémicos, antifosfatémicos, suplementos de calcio, etc., Cabría pensar en posibles interacciones con el Zn que pudieran afectar a sus niveles séricos, pues existen mecanismos de regulación homeostática de estos minerales que afectan al metabolismo del Zn (Olivares Grohnert, 2010). Sin embargo, no se han apreciado diferencias significativas con ninguno de estos medicamentos.

- Por otro lado, en referencia a la ingesta de medicamentos paliativos de sintomatologías asociadas a la enfermedad renal como antihipertensivos, psicótropos, protectores gástricos, etc., tampoco se han encontrado interacciones de ningún tipo con los niveles séricos de Zn.

5.2.- NIVELES SÉRICOS DE Cu.

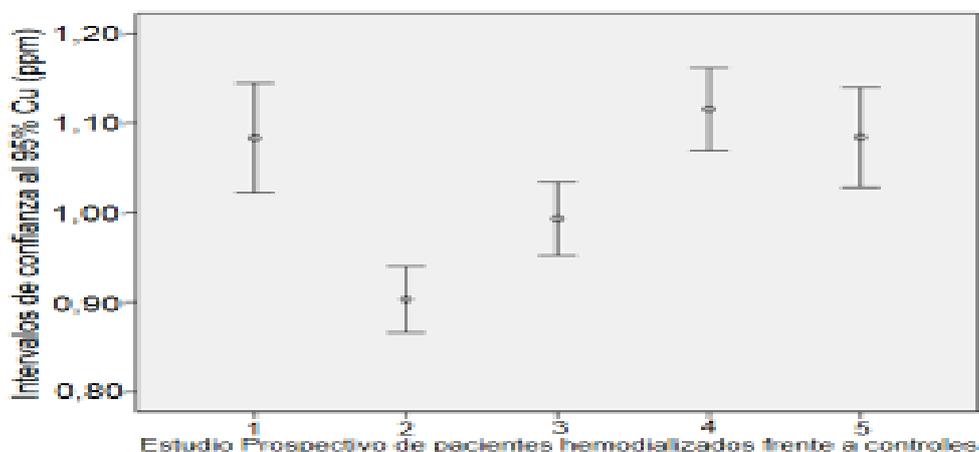
5.2.1.- ANÁLISIS COMPARATIVO DE NIVELES DE Cu EN PACIENTES HEMODIALIZADOS FRENTE A LOS CONTROLES SANOS

En este estudio hemos comprobado que los niveles séricos de Cu en individuos con insuficiencia renal y hemodializados no son significativamente distintos de los determinados en el grupo control de individuos sanos. Este hallazgo coincide con el previamente referido por otros investigadores (Hosokawa y col., 1984; Zime y col., 1988). A pesar de ello, se observa una tendencia a la significancia estadística ($p= 0.059$), con niveles ligeramente más altos en los controles.

En contraposición a los resultados obtenidos en nuestro estudio, son muchos los autores que han encontrado mayores niveles de Cu en pacientes hemodializados con respecto a los controles sanos (Navarro-Alarcón y col., 2006; Ari y col., 2011; Ikee y col., 2012; Guo y Wang, 2013). Algunos de estos autores han relacionado este aumento con la hemodiálisis de larga duración. Por otro lado, Kasama (2010), indicó que tan solo en pacientes en hemodiálisis alimentados con preparados de nutrición enteral, con contenido insuficiente en Cu, aparecían deficiencias en los niveles séricos de este elemento respecto a los controles sanos. Algunos investigadores como Navarro-Alarcón y col. (2006) observaron niveles séricos elevados de cobre en enfermos hemodializados, con una tendencia a disminuir y acercarse a las concentraciones medidas en los controles sanos, durante los 3 muestreos realizados a lo largo de los 6 meses que duró el estudio.

En el presente estudio, aunque no hemos observado la existencia de diferencias significativas en los niveles séricos de Cu en los pacientes frente a los controles, sin embargo, sí hemos encontrado que desde el 2º muestreo y hasta el 4º aumentan significativamente los niveles séricos de este elemento. En el estudio actual, la diferencia con respecto a los trabajos de investigación referidos con anterioridad, radica en que se trata de un estudio prospectivo realizado a lo largo de 2 años de duración, apreciándose una modificación significativa en las concentraciones de este elemento según el muestreo considerado.

FIGURA 35. Estudio prospectivo de los niveles séricos de Cu en los pacientes hemodializados (1: 1^{er} muestreo; 2: 2^o muestreo; 3: 3^{er} muestreo; 4: 4^o muestreo) frente a los controles sanos (5).



5.2.2.- ESTUDIO LONGITUDINAL DE LOS NIVELES SÉRICOS DE Cu EN PACIENTES HEMODIALIZADOS.

Para el Cu, en el estudio longitudinal realizado sobre los pacientes, se observaron niveles séricos significativamente inferiores en el 2^o muestreo respecto a los otros 3 muestreos restantes (Tabla 20). Además, los niveles del 1^{er} y 4^o muestreos fueron significativamente mayores a los del 2^o y 3^o muestreos (Figuras 35). En otros estudios realizados por otros investigadores, se ha comprobado que los niveles séricos de Cu se elevaban al aumentar la duración de la hemodiálisis (Ikee y col., 2012). De manera semejante, en el trabajo de investigación previamente realizado por nuestro grupo, comprobamos que los niveles de Cu aumentaban en los pacientes hemodializados, aunque iban disminuyendo y acercándose a las concentraciones séricas en los controles sanos, a medida que el estudio prospectivo, de 6 meses de duración, iba avanzando (Navarro-Alarcón y col., 2006).

5.2.3.- INFLUENCIA DE LOS FACTORES (SEXO, GRUPO DE EDAD, TRASPLANTES, ETIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD Y TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO) EN LOS NIVELES SÉRICOS DE Cu.

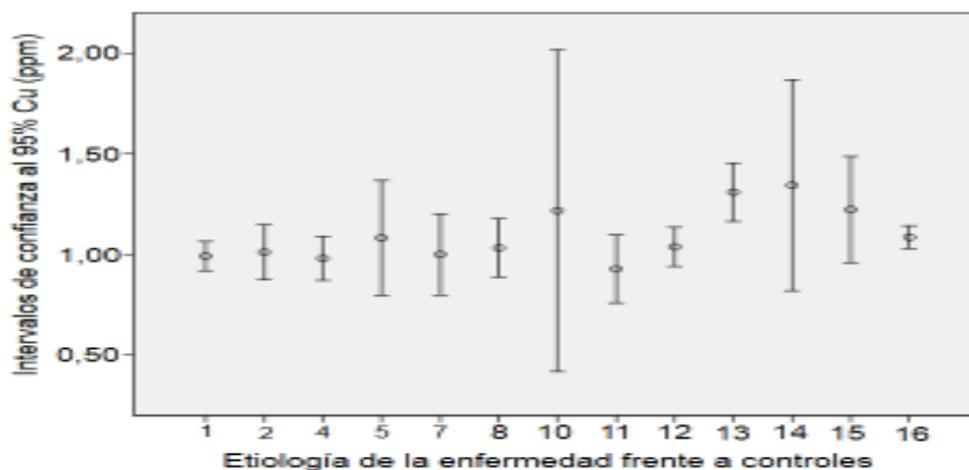
En cuanto al **sexo**, si bien no existen diferencias significativas, se aprecia una tendencia a la significancia con niveles séricos de Cu más elevados en los hombres que en las mujeres ($p= 0,083$). Este hallazgo como se indicó previamente para el Zn, podría estar relacionado con el mayor consumo de energía y proteínas descrito en sujetos masculinos previamente por otros investigadores (Ikee y col., 2012).

En relación a la **edad**, los niveles séricos de Cu se correlacionaron significativamente con el grupo de edad considerado ($p= 0,002$). Concretamente, con respecto a los enfermos con edades entre 30 y <40 años y entre 80 y <90 años, las concentraciones determinadas fueron significativamente inferiores a las encontradas en los que tenían una edad comprendida entre 50 y <60 años (Figura 13).

El **trasplante renal** al que fueron sometidos algunos de los pacientes estudiados no influyó significativamente en las concentraciones séricas de Cu. Sin embargo, mediante el test de ANOVA de 2 colas se apreció que para este elemento había una tendencia a la significancia estadística ($p= 0,058$). Concretamente, los niveles séricos de Cu eran tendentes a ser significativamente inferiores en pacientes trasplantados respecto a los no trasplantados ($p= 0,058$).

En referencia a la **etiología de la enfermedad**, el test de la t-Student expresó la existencia de diferencias estadísticamente significativas según la misma en los pacientes estudiados para los niveles séricos de Cu ($p= 0,002$). Concretamente, las concentraciones en enfermos cuya etiología de enfermedad fue la nefropatía por diabetes (Figura 36) fueron significativamente superiores a aquellos pacientes cuya etiología fue la glomerulonefritis, glomerulonefritis membranosa proliferativa, nefroangioesclerosis, nefropatía gotosa, nefropatía por analgésicos, nefropatía por carnitina, y nefropatía poliquística (Figura 36).

FIGURA 36. Estudio prospectivo de los niveles séricos de Cu en función de la etiología de la enfermedad frente a los controles sanos (16) [(1): Glomerulonefritis; (2): Glomerulonefritis membranosa proliferativa; (4): Nefroangioesclerosis; (5): Vascular; (7): Nefropatía gotosa; (8): Nefropatía por analgésicos; (10): Nefropatía por antibióticos; (11) Nefropatía por carnitina; (12) Nefropatía poliquística; (13) Nefropatía por diabetes; (14) Pielonefritis; (15) Enfermedad de Good Pasture; (16) Controles].



Como podemos apreciar en la Figura (36), los niveles séricos de Cu en los enfermos cuya etiología de enfermedad fue la nefropatía por diabetes, presentaron valores significativamente más elevados que los controles sanos ($p=0,002$). Por el contrario, los pacientes cuya etiología fue la glomerulonefritis mostraron niveles significativamente inferiores ($p=0,045$). Este resultado manifiesta que la etiología de la enfermedad influye significativamente en los niveles séricos de Cu.

En un estudio previo (Navarro-Alarcón y col., 2006), comprobamos que los niveles séricos de Cu en pacientes hemodializados cuyo origen de la enfermedad era la glomerulonefritis, eran significativamente más bajos que los que habían sufrido pielonefritis. En el presente estudio, al comparar los valores de Cu correspondientes a estas 2 etiologías, si bien hemos comprobado que no hay diferencias significativas ($p > 0,05$), se observa que los niveles determinados en los pacientes con enfermedad renal asociada a la pielonefritis fueron notablemente más elevados ($1,344 \pm 0,330$ mg/l) que los que presentaban un origen de enfermedad de glomerulonefritis ($0,992 \pm 0,254$ mg/l).

Si analizamos la posible influencia de los **distintos medicamentos** consumidos por los pacientes podemos distinguir dos grupos:

- Por un lado tendríamos los medicamentos que pueden afectar directamente a las concentraciones de otros minerales en suero, tales como antianémicos, antipotasémicos, antifosfatémicos, suplementos de calcio, etc.

* En primer lugar, en los pacientes que tomaban **antianémicos** no se apreciaron diferencias significativas en los niveles séricos de Cu respecto a los que no los tomaron (Tabla 24).

* En segundo lugar, los enfermos que consumieron varios **antipotasémicos y antifosfatémicos**, manifestaron concentraciones significativamente mayores ($p=0,005$) que los enfermos que tomaron 1 sólo anti K y P (Tabla 25, Figuras 20). Asimismo, se observó la existencia de una tendencia a la significancia estadística entre los pacientes que no consumieron dicho medicamento frente a los que consumieron varios, según se vio mediante el test de la t de Student de 2 colas ($p= 0,088$).

Por el contrario, en otros estudios se ha visto que, aunque el carbonato de calcio e hidróxido de aluminio se prescriben como quelantes del fosfato en pacientes hemodializados, también funcionan como antiácidos aumentando el pH del tracto gastrointestinal. Este incremento del pH puede disminuir la absorción de cobre, que se encuentra más facilitada en medio ácido. Además, el calcio, bajo la forma de carbonato o de acetato de calcio, parece ser que podría originar una disminución de la absorción del Cu aumentando al mismo tiempo la excreción fecal del mismo (Tompsett, 1940; Snedecker, 1982).

En estudios recientes realizados por otros investigadores, se ha podido ver cómo la administración de Sevelamer, ampliamente utilizado en el tratamiento de la hiperfosfatemia en pacientes con enfermedad renal crónica, llevaba a una menor calcificación vascular, así como a la mejora de los perfiles lipídicos (Chertow y col., 2002; Ikee y col., 2012), de los marcadores antiinflamatorios (Navarro-Gonzalez y col., 2011) y antioxidantes (Lin y col., 2011). Takagi y col. (2010) han demostrado que este medicamento (Sevelamer) se une al Cu de forma particularmente fuerte a pH ácido, disminuyendo los niveles séricos de éste. Sin embargo, otros autores (Veighey y col., 2011), no encontraron diferencias entre los niveles séricos de Cu en pacientes usuarios de Sevelamer frente a los no usuarios, de forma semejante a lo apreciado

en nuestro estudio, en el que el consumo de otros medicamentos empleados en pacientes en hemodiálisis para controlar la hiperfosfatemia, no afectó significativamente a los niveles séricos de este mineral. Sin embargo, Veighey y col. (2011) si observaron como la acidez gástrica podía influir en la absorción de este elemento.

* En tercer lugar, el test de la t-Student manifestó que los niveles séricos de Cu aumentaron significativamente en los pacientes que tomaron 1 o varios **suplementos de Ca** frente a los enfermos sometidos a hemodiálisis que no los consumieron (Tabla 26, Figura 23) ($p= 0,004$). Este resultado es igualmente contrario al indicado anteriormente por Tompsett (1940) y Snedeker (1982).

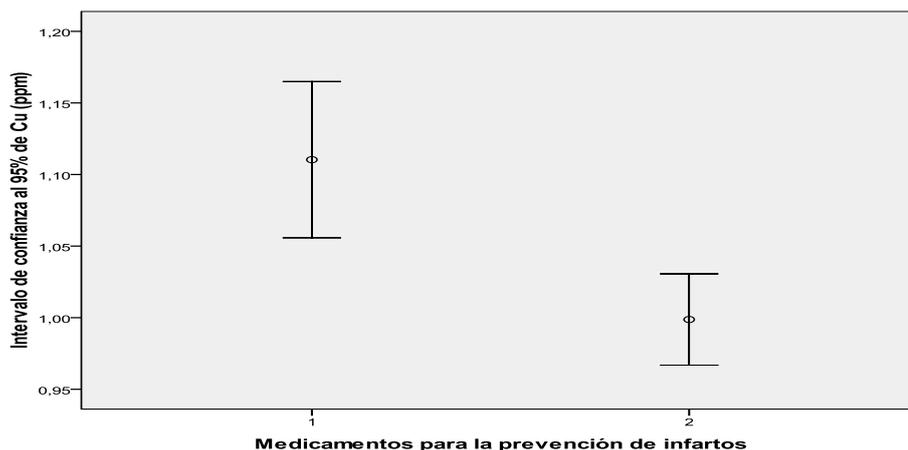
* En este trabajo se puso de manifiesto que los niveles séricos de Cu fueron significativamente diferentes según el consumo de **diuréticos** ($p= 0,002$) (Tabla 27). Concretamente, las concentraciones séricas de Cu fueron significativamente inferiores en los pacientes que consumieron diuréticos (Figura 26). Parece ser que el consumo de estos medicamentos facilita una mayor excreción urinaria de Cu, a la vez que aumenta la diuresis. Considerando que este elemento se elimina mayoritariamente por vía biliar cuando se encuentra libre en sangre, y que cuando está asociado con agentes quelantes formando complejos o quelatos solubles se elimina por vía renal (Takeda y col., 2000), parece lógico el resultado obtenido de un descenso significativo de los niveles séricos de este oligoelemento con el tratamiento por diuréticos, los cuales actuarían como agentes quelantes facilitando la eliminación urinaria de éste.

* En este trabajo hemos observado que el consumo de **antianémicos** no influye significativamente en las concentraciones séricas de Cu. Ikee y col., (2012) informaron que la suplementación con hierro intravenoso no estaba asociada con los niveles séricos de Cu. Por otro lado, en otros estudios se ha indicado que la ingestión de exceso de hierro para combatir la anemia en pacientes en hemodiálisis disminuye la absorción de cobre (Yates y col., 2000) y, por lo tanto, sus niveles séricos.

* En relación con el consumo de medicamentos con **acción preventiva de infartos**, hemos apreciado que los pacientes en hemodiálisis consumidores de éstos, presentaron niveles séricos de Cu

significativamente más elevados. Aunque no conocemos a qué puede ser debido el resultado encontrado, sí se sabe que el grosor de las capas íntima y media de la carótida en pacientes hemodializados, está relacionado con mayores niveles séricos de Cu (Ari y col., 2011). Por este motivo, pensamos que el consumo de estos medicamentos está justificado en aquellos sujetos que presentan concentraciones séricas más elevadas de este elemento.

FIGURA 37. Estudio prospectivo de los niveles séricos de Cu en función del consumo o no de medicamentos para la prevención de infartos.



5.3.- BALANCE DE LOS NIVELES SÉRICOS DE Cu/Zn.

5.3.1.- ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS BALANCES DE Cu/Zn EN PACIENTES HEMODIALIZADOS FRENTE A LOS CONTROLES SANOS

El estudio estadístico de los valores de las correlaciones Cu/Zn se ha llevado a cabo mediante el método no paramétrico de Kruskal-Wallis.

Se comprobó que los balances Cu/Zn fueron estadísticamente superiores en los enfermos hemodializados respecto a los controles sanos. De forma semejante, Guo y col., (2013) han referido que los pacientes en hemodiálisis presentan balances de Cu/Zn significativamente más altos que los controles, así como valores más elevados de los marcadores del estrés oxidativo y de las citoquinas pro-inflamatorias. Esto pone de manifiesto la importancia que estos balances tienen como biomarcadores de las patologías asociadas a la insuficiencia renal. Estos mismos investigadores concluyen en otro estudio, que la suplementación con Zn mejora los valores anormalmente altos de los balances Cu/Zn y de los

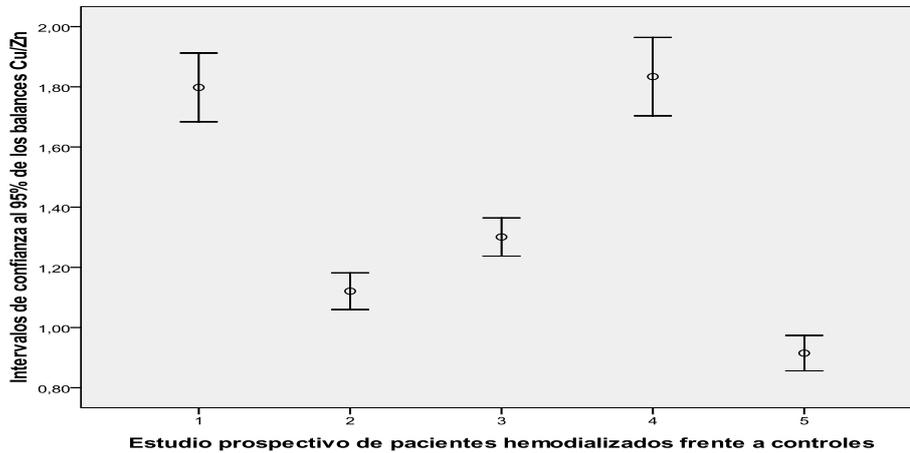
marcadores de estrés oxidativo y estatus inflamatorio, característicos de estos enfermos. Además, un estudio anterior del mismo grupo de investigación (Guo y col., 2011a) indica que los balances elevados de Cu/Zn en pacientes en diálisis peritoneal están asociados con malnutrición, estrés oxidativo aumentado, inflamación y alteración del equilibrio inmunológico.

También se ha señalado que la correlación Cu/Zn se encuentra asociada con la aterosclerosis de la carótida en enfermos hemodializados (Ari y col., 2011). Esta asociación de los balances Cu/Zn con biomarcadores de estrés oxidativo e inflamación, también ha sido indicada por otros investigadores (Ikee y col., 2012).

5.3.2.- ESTUDIO LONGITUDINAL DE LOS BALANCES DE Cu/Zn EN PACIENTES HEMODIALIZADOS.

Para los balances Cu/Zn, en el estudio longitudinal, los resultados obtenidos mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de las varianzas, reflejaron la necesidad del empleo del test no paramétrico de Kruskal-Wallis (K-W) ($p < 0,05$). El test de K-W expresó la existencia de diferencias estadísticamente significativas en el estudio longitudinal para la correlación Cu/Zn (Tabla 20, Figura 38). Se observaron valores significativamente inferiores en el 2º muestreo respecto a los 3 restantes, y el grupo control (Tabla 20; Figura 38). Además los niveles del 1º y 4º muestreos fueron significativamente mayores a los del 2º y 3º muestreos. Como puede apreciarse en la Figura 38 en todos los muestreos, los balances de Cu/Zn fueron significativamente superiores en enfermos respecto a los determinados en los controles sanos. Además, estos valores aumentaron desde el segundo al tercer muestreo y desde éste último al cuarto. Estos resultados establecen que en el estudio prospectivo llevado a cabo, los balances Cu/Zn no mejoran, por lo que se mantienen los riesgos aumentados de estrés oxidativo, inflamación, alteración del sistema inmune y patologías cardiovasculares como la aterosclerosis en los pacientes hemodializados.

FIGURA 38. Estudio prospectivo de los balances de Cu/Zn en los pacientes hemodializados (1: 1^{er} muestreo; 2: 2^o muestreo; 3: 3^{er} muestreo; 4: 4^o muestreo) frente a los controles sanos (5).



5.3.3.- INFLUENCIA DE LOS FACTORES (SEXO, GRUPO DE EDAD, TRASPLANTES, ETIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD Y TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO) EN LOS NIVELES SÉRICOS DE Cu.

En cuanto al sexo, edad, trasplante renal y etiología de la enfermedad no se apreció su influencia en los balances Cu/Zn en pacientes hemodializados. No obstante, en el caso de los pacientes trasplantados, se apreció una tendencia al descenso significativo de los balances Cu/Zn ($p=0,082$), que indica, aunque no de manera concluyente, que el trasplante renal podría mejorar dichas correlaciones y en consecuencia disminuir el riesgo asociado a sufrir patologías relacionadas con el estrés oxidativo y la inflamación. Como consecuencia, una posible vía de investigación futura, radicaría en el estudio prospectivo de los balances Cu/Zn en pacientes hemodializados trasplantados durante periodos largos de tiempo, para poder confirmar el resultado antes citado.

Si analizamos la posible influencia de los distintos medicamentos consumidos por los pacientes, hemos encontrado lo siguiente:

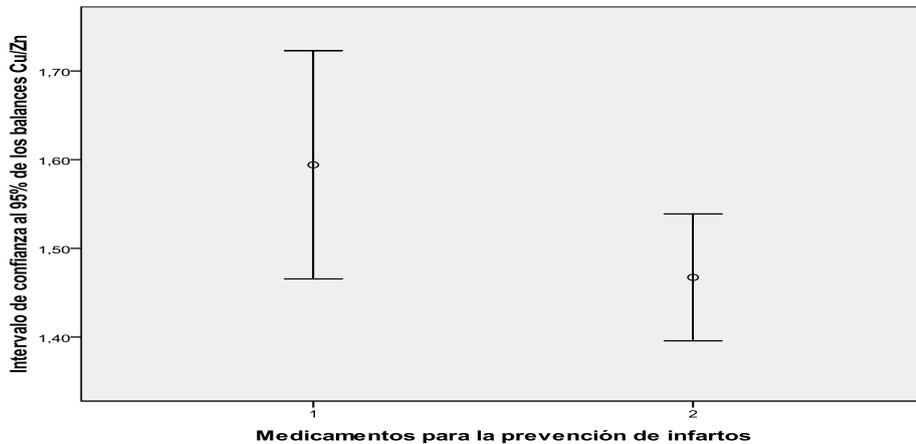
- * Entre los enfermos que consumieron **antipotásémicos y antifosfatémicos**, se observó que los enfermos que consumieron varios anti K y P presentaron balances Cu/Zn mayores ($p < 0,05$) que los que tomaron un sólo anti K y P (Tabla 25, Figuras 21).

* En los pacientes hemodializados, los balances Cu/Zn aumentaron en aquellos que tomaron uno o varios **suplementos de Ca** frente a los enfermos que no los consumieron (Tabla 26, Figura 24) ($p= 0,014$).

* En este trabajo se puso de manifiesto que los balances de Cu/Zn fueron significativamente diferentes según el consumo de **diuréticos** ($p=0,003$) (Tabla 27). Concretamente, los balances de Cu/Zn fueron superiores en los pacientes que no consumieron diuréticos (Figura 27). Como antes hemos comentado para el Cu, el consumo de estos medicamentos facilitaría la excreción vía renal de este elemento al aumentar la diuresis, lo que disminuiría el balance Cu/Zn, y por tanto el riesgo asociado a los altos valores de las correlaciones Cu/Zn característicos de los pacientes hemodializados. Este resultado justifica la conveniencia del uso de diuréticos en estos enfermos.

* En relación con el consumo de medicamentos con **acción preventiva de infartos**, hemos apreciado que los pacientes en hemodiálisis consumidores de éstos, manifiestan una tendencia a presentar mayores valores de los balances Cu/Zn ($p= 0,052$) (Tabla 30, Fig. 39). Este hecho podría estar justificado teniendo en cuenta que los enfermos a los que se les prescribió estos medicamentos tenían ya un mayor riesgo de padecer infarto. Como ya hemos indicado anteriormente en este estudio y también han observado otros investigadores (Ari y col., 2012; Ikee y col., 2012), los enfermos hemodializados presentan mayor riesgo cardiovascular y éste se asocia a valores más altos de los balances Cu/Zn. Por este motivo podría considerarse la asociación del consumo de estos medicamentos con una tendencia al aumento en los balances Cu/Zn, si bien no se puede concluir este hecho, al carecer del muestreo previo al consumo de medicamentos para la prevención de infartos por parte de los pacientes a los que se les prescribieron.

FIGURA 39. Estudio de los balances de Cu/Zn en los pacientes hemodializados según el consumo o no de medicamentos para la prevención de infartos (1: consumidores; 2: no consumidores).



Aunque no conocemos a que puede ser debido el resultado encontrado, se sabe que el grosor de las capas íntima y media de la carótida, en pacientes hemodializados, está relacionado con mayores niveles séricos de Cu (Ari y col., 2011). Por este motivo, pensamos que el consumo de medicamentos con acción preventiva de infartos está justificado en aquellos sujetos que presentan concentraciones séricas más elevadas de este elemento.

5.4.- NIVELES SÉRICOS DE Al.

5.4.1.- ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS NIVELES DE Al EN PACIENTES HEMODIALIZADOS FRENTE A LOS CONTROLES SANOS

Tras la ejecución del test de Kolmogorov-Smirnov y el test de Levene, y la aplicación del correspondiente test de Kruskal-Wallis hemos comprobado que los niveles séricos de Al son significativamente superiores en los enfermos respecto a los controles sanos, como se ha puesto de manifiesto en estudios anteriormente realizados por otros investigadores (Nenchev y col., 2007). Estos investigadores concluyen que los pacientes con insuficiencia renal sujetos a hemodiálisis y con diabetes mellitus, como patología secundaria asociada, tenían mayores niveles de Al antes y después de la hemodiálisis (Nenchev y col., 2007), respecto a los

controles sanos, motivo por el cual se cree que el incremento es debido al consumo de aglutinantes de fosfatos con base de Al, como también han referido otros investigadores (Pepper y col., 2011). Por otro lado, otros autores (Bohrer y col., 2009) consideran que el incremento de las concentraciones séricas de Al se puede deber adicionalmente a que la medicación administrada a los pacientes en hemodiálisis pueda estar contaminada con Al, más concretamente la administrada por vía intravenosa como sería el caso de fórmulas con Fe, insulina, y EPO, tres de los medicamentos más importantes y ampliamente administrados a este tipo de pacientes. Además, se sabe que, en muchas ocasiones, las fórmulas orales que incorporan Fe para paliar la sintomatología de malestar digestivo asociada y para facilitar la absorción de Fe, incluyen ácido ascórbico, succínico y citrato, sustancias en las que se ha descrito que aumentan adicionalmente la absorción de Al (Bohrer y col., 2009).

Otros investigadores (Christie y col., 2011), destacan la importancia de la solución con la que se realiza la diálisis, ya que en algunos casos se empleaba agua de la red de distribución pública, con unos niveles por encima de 50 $\mu\text{g Al/l}$, en lugar de la tratada por ósmosis inversa, lo que se asociaba a ese incremento en los niveles sanguíneos de Al en pacientes hemodializados. Por otro lado, Douthat y col. (2006) indican que en Europa y más concretamente en España, a partir de 1996 el 80% de los centros usaba agua osmóticamente tratada, observándose una disminución notable de los niveles de Al en sangre, a pesar de que todavía continuaban siendo elevados con respecto a los controles sanos.

Otros autores (Guo y col., 2011b), indican que, de forma concomitante al aumento de Al en plasma, se produce un descenso en los niveles plasmáticos de Zn y de Fe, debido a que el Al compite con estos elementos a nivel de las metalotioneínas.

Por otro lado, Da Silva y col. (2010) encuentran también concentraciones elevadas de Al en la mayoría de los suplementos de Ca masticables, usados como medicamentos en pacientes hemodializados.

Además, se sabe que una vez que el Al alcanza el organismo humano, éste es difícilmente eliminable debido a que se une fuertemente a proteínas plasmáticas que dificultan su filtración en la diálisis (Douthat y col., 2006).

5.4.2.- ESTUDIO LONGITUDINAL DE LOS NIVELES SÉRICOS DE Al EN PACIENTES HEMODIALIZADOS.

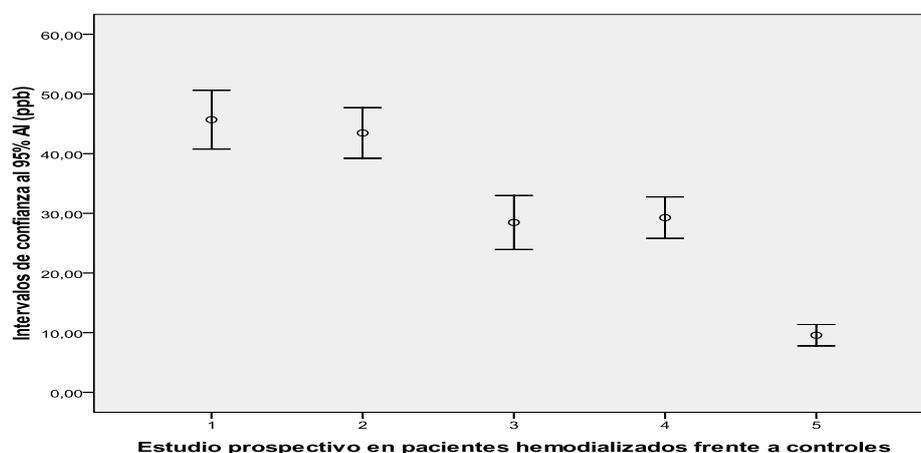
En el caso del Al, en el estudio longitudinal (Figura 40) se apreció un descenso significativo de las concentraciones séricas en los 3^{er} y 4^o muestreos, respecto a los muestreos realizados en 1^{er} y 2^o lugar ($p < 0,001$). Asimismo se observó, que en los 4 muestreos realizados en los pacientes en hemodiálisis, los niveles séricos de este elemento fueron significativamente superiores a los determinados en los controles sanos (Figura 40), lo que implica que, incluso en el estudio prospectivo, se siguen manteniendo niveles séricos de Al superiores en los enfermos en hemodiálisis, tal y como han puesto de manifiesto otros investigadores (Hou y col., 2010; Pepper y col., 2011).

Hay que tener en cuenta que en nuestro estudio prospectivo, hemos apreciado un descenso de los niveles de Al en el 3^{er} y 4^o muestreos, lo que podría ser debido tal y como indican Pepper y col. (2011) al secuestro de este metal en determinados tejidos como el hueso. Otros investigadores adicionalmente señalan que este metal puede acumularse en el sistema nervioso, hematopoyético y parotideo (Douthat y col., 2006). Dado que el Zn disminuye significativamente en el suero de los pacientes en hemodiálisis respecto a los controles sanos, la regulación homeostática de éste conllevaría la liberación en los tejidos donde se acumula asociado a las metalotioneínas (Guo y Wang, 2011), con el fin de participar en las importantes funciones metabólicas en las que está implicado este mineral. En estas circunstancias, el Al podría unirse a los lugares que han quedado libres en las metalotioneínas y de esta manera almacenarse en los tejidos, lo que justificaría el descenso significativo en los niveles séricos de Al encontrados en los dos últimos muestreos del estudio longitudinal realizado en el presente trabajo.

La acumulación de Al antes referida en el sistema nervioso y el tejido óseo, podría estar relacionada con la aparición de ciertas enfermedades neurodegenerativas (Alzhöimer y Parkinson) y de desmineralización ósea (osteomalacia), respectivamente (Douthat y col., 2006; Da Silvaad y col., 2010; Kazi y col., 2010; Dabeka y col., 2011; Wu y col., 2012). En relación a lo indicado a nivel óseo, queremos resaltar que Hou y col. (2010) correlacionaron el aumento de concentración sérica de Al con el incremento de los niveles de Ca, tal y como también nosotros hemos puesto de manifiesto en el presente estudio, al comprobar que los valores de Al están lineal y positivamente relacionados con las concentraciones de Ca ($P = 0,012$; $r = 0,140$). Esto podría estar asociado a la

desmineralización antes indicada, y sería objeto de comprobación en investigaciones futuras.

FIGURA 40. Estudio prospectivo de los niveles séricos de Al en los pacientes hemodializados (1: 1^{er} muestreo; 2: 2^o muestreo; 3: 3^{er} muestreo; 4: 4^o muestreo) frente a los controles sanos (5).



Hou y col. (2010) describen que los niveles séricos de Al aumentan con la duración de la hemodiálisis en los enfermos renales, resultado contrario al que nosotros hemos puesto de manifiesto en el estudio longitudinal llevado a cabo, donde los muestreos 3 y 4 manifiestan niveles de Al en suero significativamente menores.

5.4.3.- INFLUENCIA DE LOS FACTORES (SEXO, GRUPO DE EDAD, TRASPLANTES, ETIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD Y TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO) EN LOS NIVELES SÉRICOS DE Al.

En cuanto a los factores del sexo, trasplante renal y etiología de la enfermedad no se apreció que influyesen en los niveles séricos de Al en pacientes hemodializados.

En relación al grupo de edad, según el test de Kruskal-Wallis, sí se apreció una influencia significativa de este factor en los niveles séricos de Al; concretamente hemos apreciado que los valores de este elemento en el grupo de edad entre 80 y <90 años eran significativamente inferiores a los grupos de edad

comprendida entre 60 y <70 y 70 y <80 años, al igual que ocurre con los correspondientes al grupo de edad comprendido entre 40 y < 50 años, en los que también son inferiores, respecto a los establecidos en los grupos con edades entre 60 y < 70 años, y el de 70 y < 80 años (Figura 15). Contrariamente a lo apreciado en nuestro estudio, Hou y col. (2010) indican que los niveles séricos de Al aumentan con la edad de los pacientes con fallo renal crónico, antes de iniciar el proceso de hemodiálisis.

Por último en referencia a la influencia que los **tratamientos farmacológicos** ejercen en los niveles séricos de Al hemos comprobado lo siguiente:

* En cuanto al consumo de **antianémicos** por los sujetos hemodializados, hemos comprobado que los niveles séricos de Al fueron significativamente mayores en los que consumieron un antiánémico frente a los que no consumieron o consumieron varios (Figura 19). Si consideramos conjuntamente el consumo o no de antianémicos (incluyendo en el mismo grupo los que consumen 1 o varios frente a los no consumidores), observamos que los niveles séricos de Al son significativamente mayores en los consumidores ($p= 0.007$). Este hallazgo se relaciona con lo expresado por Bohrer y col. (2009), quienes indican que las formulaciones que contienen Fe aumentan los niveles sanguíneos de Al, debido a que los agentes quelantes que actúan como facilitadores de la absorción del Fe o para prevenir los efectos adversos, tales como las náuseas asociadas a su consumo (ácido ascórbico, succínico, citrato, etc.), facilitan también la quelación del Al con la consiguiente formación de quelatos solubles de este elemento que finalmente incrementan su absorción a nivel intestinal. Sin embargo otros investigadores (Guo y Wang, 2011) manifiestan que se encontró una relación negativa entre los niveles plasmáticos de Al y de Fe en pacientes en hemodiálisis, ya que ambos compiten por la unión a la metalotioneína, que es la encargada de regular a nivel intestinal la absorción y se encuentra implicada en el almacenamiento y excreción de metales (Guo y col., 2002; Bellés y col., 2007). Asimismo, Guo y Wang (2011) refieren que cuando se produce una acumulación de Al paralelamente se produce un descenso corporal de Fe.

* En los enfermos que consumieron **antipotásémicos y antifosfatémicos**, específicamente para los enfermos que consumieron varios anti K y P, se

manifestaron niveles de Al mayores ($p < 0,05$) con respecto a los que no tomaron (Tabla 25, Figuras 22). Este resultado se relaciona con el hecho de que estos medicamentos suelen llevar en su composición sales de Al, tal y como ha sido descrito en múltiples estudios con anterioridad (Nenchev y col., 2007; Weng y col., 2009; Mudge y col., 2011; Guo y col., 2011; Pepper y col., 2011).

- * Para el Al, el consumo de varios **hipercalcemiantes** aumentó significativamente los niveles séricos de este elemento en estos enfermos respecto a los no consumidores ($p < 0,05$) (Tabla 26, Figura 25). Este hallazgo podría estar correlacionado con el hecho de que el Al se encuentra como componente en la mayoría de las fuentes de suplementos de Ca masticable (Da Silvaab y col., 2010). Relacionado con lo anterior, otros investigadores (Hou y col., 2010) indicaron que la concentración de Al aumentaba a nivel sérico cuanto mayor era la concentración de Ca presente en éste. Asimismo, en este estudio hemos comprobado la existencia de una correlación lineal estadísticamente significativa entre los niveles séricos de Al y de Ca en los pacientes hemodializados estudiados ($r = 0,140$; $p = 0,012$; Tabla 38).
- * En cuanto a los **diuréticos**, hemos comprobado que los pacientes en hemodiálisis que los consumen manifiestan unos niveles de Al significativamente inferiores frente a los que no los consumieron (Tabla 27, Figura 28). Azik y col. (2011), indicaron que el Al se elimina mayoritariamente a nivel renal, y que en los pacientes con insuficiencia renal se tiende a acumular dicho elemento, dado que esta vía aparece claramente limitada, motivo por el cual la administración de diuréticos facilitaría la excreción urinaria de este elemento y el descenso significativo a nivel sanguíneo apreciado en nuestro estudio.

Por otro lado, el hecho de que el Al sea difícilmente eliminable por hemodiálisis, dada su fuerte unión a las proteínas plasmáticas, facilita su acumulación corporal en estos pacientes (Douthat y col., 2006). Por este motivo, el empleo de diuréticos en éstos promueve la eliminación de este elemento, por lo que estaría recomendado dicho uso con el fin de disminuir los posibles efectos tóxicos ligados a su acumulación corporal.

- * En relación al consumo de **vasodilatadores**, se comprobó que los niveles séricos de Al eran significativamente inferiores en los pacientes en hemodiálisis consumidores de los mismos ($p = 0,042$; Tabla 29). La

justificación a este hallazgo podría estar relacionada con que la vasodilatación pueda favorecer el tránsito de este elemento a los tejidos diana en los que se acumula en el organismo.

- * En relación al consumo de medicamentos **antihipertensivos**, se apreció que los niveles de Al en el suero de los pacientes que tomaban 1 antihipertensivo son significativamente inferiores a los que no lo tomaban o tomaban varios antihipertensivos. Sin embargo, al considerar conjuntamente los consumidores y no consumidores de antihipertensivos no se encuentran diferencias significativas ($p= 0,091$).
- * En referencia al consumo de **cortisona** hemos comprobado como los pacientes consumidores de ésta, tienen niveles significativamente inferiores a los que no la tomaban. No obstante el número de enfermos que la consumieron fue bajo ($n= 8$), por esto consideramos que este resultado debería ser objeto de un estudio más profundo en investigaciones futuras. A pesar de ello, el descenso es muy considerable por lo que creemos que dicho corticoide influye en los niveles séricos de este elemento.

5.5.- VALORES DE LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS, NUTRICIONALES Y HEMATOLÓGICOS EN PACIENTES HEMODIALIZADOS.

5.5.1.- ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS, NUTRICIONALES Y HEMATOLÓGICOS EN LOS PACIENTES HEMODIALIZADOS FRENTE A LOS CONTROLES SANOS.

En cuanto al análisis de **parámetros bioquímicos** entre pacientes hemodializados e individuos sanos (tabla 31), se encontraron diferencias significativas para los **parámetros lipídicos**. En el caso de **triglicéridos**, los individuos enfermos presentaron mayores valores que los individuos sanos, mientras que en el resto de parámetros del perfil lipídico (**colesterol total**, **HDL**, **LDL**) se ha observado que los niveles de éstos son significativamente menores en individuos enfermos. Este hecho se podría explicar si consideramos el papel del Zn en el metabolismo lipídico y en la regulación de la biosíntesis de lipoproteínas.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Philipp y col. (2010); sin embargo Ari y col. (2011) a pesar de determinar igualmente menores valores en estos parámetros en enfermos respecto a controles sanos, no encontraron

diferencias estadísticamente significativas. Concretamente Philipp y col. (2010), apreciaron niveles menores de colesterol total en pacientes hemodializados, explicándose este resultado por la existencia de una mayor concentración de la proteína Zn- α 2-glicoproteína en enfermos hemodializados a pesar de sus menores niveles de Zn. Esta proteína parece estar implicada en el metabolismo lipídico, produciendo finalmente una disminución de la concentración de lipoproteínas plasmáticas.

Los niveles de glucosa plasmática fueron superiores en pacientes hemodializados en relación con el grupo control, aunque no se hayan encontrado diferencias significativas. Sin embargo, otros investigadores (Kiziltas y col., 2008; Sahin y col., 2009; Lobo y col., 2012) describen la existencia de altos niveles de glucosa en pacientes hemodializados como consecuencia de la aparición de resistencia a la insulina. Parece ser que esta resistencia es consecuencia de un incremento de los niveles de leptina. Estos niveles altos de leptina, de forma secundaria, podrían ser responsables de la pérdida de masa muscular que se observa en los pacientes con disfunción renal crónica, pudiendo también estar relacionado con el desarrollo de malnutrición en los enfermos con insuficiencia renal crónica sometidos a hemodiálisis (Lobo y col., 2012).

Con respecto a los niveles plasmáticos de creatinina, observamos que los individuos enfermos tienen menores concentraciones que los controles sanos. Estos resultados coinciden con los previamente descritos por otros investigadores (El Tayeb y col., 2009; Sahin y col., 2009; Philipp y col., 2010; Lobo y col., 2012).

En cuanto a los resultados obtenidos para la urea, vemos cómo estos valores suben significativamente en los individuos enfermos con respecto al grupo control. Los altos resultados de los niveles de urea son similares a los obtenidos por otros investigadores (Batista y col. 2006; El Tayeb y col. 2009) en un estudio parecido en pacientes, diabéticos y no diabéticos, con enfermedad renal. Este incremento es consecuencia de las alteraciones del metabolismo proteico intrínsecas a la patología de la disfunción renal.

En relación al ácido úrico, los pacientes manifestaron una marcada hiperuricemia ($7,83 \pm 6,03$ mg/dl) (Tabla 31), observándose que dichas concentraciones son ligeramente superiores al valor determinado por otro grupo de investigación (7,70 mg/dl) (Alimonda y col., 2009; Martí del Moral y col., 2011), quienes informaron que los niveles superiores a este valor se encuentran asociados con mayores índices de mortalidad. Otros investigadores (Leyva y col., 1997; Leyva y col., 1998; Hoepfer y col., 1999) encontraron que los valores de

ácido úrico aumentaban de forma progresiva a medida que la enfermedad iba avanzando, observación que sin embargo, como más adelante referiremos, no hemos apreciado en el estudio longitudinal en estos enfermos. Adicionalmente, tal y como otros investigadores han puesto de manifiesto (Szeto y col., 2004), los altos niveles de ácido úrico en pacientes hemodializados, se encuentran asociados con un mayor riesgo de padecer enfermedad coronaria y con un incremento del estrés oxidativo (Martí del Moral y col., 2011). En este estudio realizado previamente por nuestro grupo de investigación (Martí del Moral y col., 2011), hemos encontrado la existencia de una correlación lineal inversa entre los niveles séricos de ácido úrico (biomarcador de procesos inflamatorios) y Se en suero lo que puede implicar un riesgo cardiovascular incrementado en estos enfermos.

También se observó que los niveles plasmáticos de GOT y GPT fueron significativamente inferiores en los enfermos hemodializados que en los controles sanos. Desconocemos hasta el momento la justificación de este hallazgo.

Los niveles de bilirrubina plasmática fueron superiores en pacientes hemodializados en relación con el grupo control, aunque no se hayan encontrado diferencias estadísticamente significativas, debido a la alta dispersión de las concentraciones encontradas.

5.5.2.- ESTUDIO LONGITUDINAL DE LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS, NUTRICIONALES Y HEMATOLÓGICOS EN PACIENTES HEMODIALIZADOS

En el estudio prospectivo realizado se observaron diferencias estadísticamente significativas para los parámetros bioquímicos de creatinina, ácido úrico, urea, colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL, P, proteínas, Ca, bilirrubina, Na y ferritina (Tabla 32, Figuras 29).

En este estudio longitudinal (Tabla 32) hemos apreciado que los niveles plasmáticos de colesterol total y colesterol LDL disminuyen significativamente con el progreso de la patología y la hemodiálisis asociada a la misma (Figuras 29). Para ambos parámetros bioquímicos se puede apreciar un comportamiento similar con un descenso en los niveles plasmáticos en el 1^{er} muestreo que se acentúa significativamente con el tiempo en los 3 restantes. Este descenso del colesterol total y del LDL, podría estar relacionado con lo descrito previamente en la bibliografía por otros investigadores en relación a la necesidad de un estatus

corporal adecuado en Zn para la biosíntesis de lipoproteínas (Philipp y col., 2010; Ari y col., 2011). En este sentido, en nuestro estudio hemos visto que los niveles de este elemento están disminuidos en los pacientes hemodializados, descenso que se acentúa en el estudio longitudinal.

En relación a los niveles séricos de fósforo, se ha observado la existencia de un descenso significativo entre el primer y segundo y cuarto muestreos del estudio longitudinal (Figura 29). Asimismo, los valores encontrados en el segundo muestreo son significativamente superiores a los determinados en el cuarto. Ambos hallazgos establecen en general la existencia de un descenso de los niveles séricos de P con el tiempo en pacientes en hemodiálisis.

En cuanto a las proteínas, hemos observado que los niveles plasmáticos determinados en el primer muestreo son significativamente superiores a los hallados en los muestreos restantes (Figura 29).

Para el calcio, hemos apreciado que las concentraciones determinadas en el segundo muestreo son superiores a las del primero (Figura 29).

En referencia a la ferritina, hemos podido observar que los niveles determinados en el primer muestreo son significativamente más bajos que los correspondientes a los otros tres muestreos (Figura 29).

Para la bilirrubina plasmática hemos encontrado que los enfermos en el primer muestreo tienen niveles más bajos que en el cuarto.

Por último, es reseñable que en el estudio longitudinal realizado, los niveles plasmáticos de creatinina disminuyen con una tendencia a la significancia estadística ($p= 0,061$) (Tabla 32), resultado que se explicaría como consecuencia de la influencia de la hemodiálisis en este parámetro, tal y como ha sido descrito con anterioridad (Kiziltas y col., 2008). Al estudiar específicamente el 1^{er} muestreo respecto al 4^o, hemos apreciado un nivel de significancia de $p= 0,013$, que pone de manifiesto la mayor disminución significativa de los niveles plasmáticos de creatinina en enfermos con el tiempo.

5.5.3.- INFLUENCIA DE LOS FACTORES (SEXO, GRUPO DE EDAD, TRASPLANTES, ETIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD Y TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO) EN LOS VALORES DE LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS, NUTRICIONALES Y HEMATOLÓGICOS.

Respecto al análisis comparativo de los diferentes parámetros bioquímicos, hematológicos y nutricionales analizados en los pacientes hemodializados, hemos encontrado diferencias significativas para múltiples de ellos según el sexo (Tabla 33), según el trasplante o deceso (Tabla 34, Figura 30), según la edad (Tabla 35, Figuras 31 y 32), según la etiología de la enfermedad (Tabla 36, Figura 33) y según el tratamiento farmacológico (Tabla 37), como puede apreciarse tanto en las tablas como en las figuras referidas.

5.5.4.- ANÁLISIS DE REGRESIÓN ENTRE LOS NIVELES DE LOS DISTINTOS MINERALES (Zn, Cu, balance Cu/Zn y Al) Y PARÁMETROS BIOQUÍMICOS ANALIZADOS EN ENFERMOS CON INSUFICIENCIA RENAL.

En el análisis de regresión lineal realizado entre los niveles séricos de Zn, Cu y Al, y los balances Cu/Zn, respecto a los parámetros bioquímicos, hematológicos y nutricionales medidos en los pacientes hemodializados, hemos encontrado la existencia de múltiples correlaciones significativas, tal y como puede observarse en la tabla 38.

Para el **Zn**, encontramos una correlación lineal positiva con los triglicéridos, CPK, y la ferritina, y negativa con el Cu, urea, colesterol LDL, fosfatasa alcalina, P y proteínas ($p < 0.05$; Tabla 38).

Es reseñable la correlación negativa entre el Zn y los valores de colesterol LDL, resultado que establece que cuanto más bajo es el nivel sérico de Zn en los pacientes hemodializados mayor es la concentración del colesterol LDL y, en consecuencia, el riesgo cardiovascular. Este resultado se ha obtenido a pesar de que en el estudio longitudinal los valores de colesterol LDL son significativamente inferiores en los pacientes que en los controles sanos (Martí del Moral, 2011).

Para el **Cu**, encontramos una correlación lineal positiva con el Al, fosfatasa alcalina, proteínas y LDH, y negativa con el Zn y con la hemoglobina ($p < 0.05$; Tabla 38). La correlación lineal negativa existente entre el Cu y el Zn ha sido

referida anteriormente en otros estudios (Navarro-Alarcón y col., 2006; Guo y col., 2011, 2013).

Para el **balance Cu/Zn** hemos encontrado una correlación positiva con el Cu, glucosa, urea, colesterol total, colesterol LDL, fosfatasa alcalina, proteínas y LDH, y una correlación negativa con el Zn, ácido úrico y la ferritina ($p < 0.05$; Tabla 38). Concretamente, para algunos marcadores del perfil lipídico medidos en pacientes hemodializados tales como el colesterol total y el colesterol LDL se ha visto que se encuentran asociados a balances Cu/Zn más elevados y por tanto con riesgos cardiovasculares incrementados (Martí del Moral, 2011; Ikee y col., 2012; Guo y col., 2013), todo ello a pesar de que en el estudio prospectivo los niveles de colesterol LDL disminuyen con el tiempo.

Para el **Al**, hemos encontrado una correlación positiva con el Cu, creatinina, ácido úrico, GOT, GPT, proteínas, Ca, bilirrubina, GGT, LDH, Na y K, y una correlación negativa con Cl ($p < 0.05$; Tabla 38).

Como hemos apreciado en el presente trabajo, los elevados niveles de Al encontrados en los pacientes en hemodiálisis se encuentran correlacionados positivamente con un número elevado de parámetros bioquímicos y nutricionales, lo que posiblemente indicaría la adicional alteración homeostática que acontece en el organismo de estos pacientes con los altos niveles de Al, pues como ya hemos visto en los controles sanos, los niveles de este elemento son habitualmente muy bajos.

En otros estudios, se ha indicado de igual forma que en nuestro trabajo que al aumentar los niveles de Al, se eleva la concentración de la creatinina y el Ca séricos (Hou y col., 2010). Además, dado que los medicamentos que incluyen Fe y Ca en su composición, empleados por estos pacientes, adicionalmente también incorporan Al, se justificaría en parte esa correlación positiva entre los niveles séricos de Al y de Ca (Bohrer y col., 2009).

6.- CONCLUSIONES

6.- CONCLUSIONES.

- 1.- Los parámetros analíticos de los métodos empleados en la determinación de Zn, Cu y Al, indican la idoneidad de los mismos para la medida de los niveles de estos elementos en las muestras de suero analizadas.
- 2.- Los niveles séricos de Zn disminuyen, mientras que los de Al y el balance Cu/Zn aumentan significativamente en los pacientes con insuficiencia renal crónica sometidos a hemodiálisis.
- 3.- En el estudio longitudinal, los niveles de Zn disminuyeron desde el 2º al 4º muestreo, sucediendo lo contrario para el Cu y el balance Cu/Zn en estos enfermos. Para el Al, su concentración disminuye en el 3º y 4º muestreos.
- 4.- Los niveles de Zn en el grupo control fueron significativamente mayores a los determinados en los 4 muestreos realizados en los pacientes, observándose lo contrario para el balance Cu/Zn y el Al.
- 5.- En pacientes, los niveles séricos de Zn disminuyeron a partir de 50 años. Asimismo, se han observado valores menores en enfermos cuya etiología de enfermedad era la glomerulonefritis frente a los que sufrían pielonefritis.
- 6.- Los enfermos con edades <30 años y entre 70 y <80 años presentaron concentraciones de Cu inferiores a las encontradas en los de edad comprendida entre 50 y <60 años. Los pacientes con nefropatía por diabetes tenían niveles de Cu superiores a aquellos con glomerulonefritis, glomerulonefritis membranosa proliferativa, nefroangioesclerosis y nefropatía gotosa, poliquística, por analgésicos y por carnitina. Los hemodializados que consumían suplementos de Ca o medicamentos preventivos de infartos manifestaron mayores niveles de Cu, frente a los consumidores de diuréticos que tuvieron niveles inferiores.
- 7.- De forma semejante a lo hallado para el Cu, los balances Cu/Zn aumentaron con el consumo de suplementos de Ca, y disminuyeron con el de diuréticos.
- 8.- La edad influye en los niveles séricos de Al. Los enfermos que consumieron antipotasémicos, antifosfatémicos o hipercalcemiantes presentaban niveles mayores de Al, resultado éste, posiblemente relacionado con que estos medicamentos pueden llevar en su composición sales de este elemento.

Los pacientes que tomaban vasodilatadores o diuréticos tuvieron niveles de Al inferiores, posiblemente debido a que las vías de distribución y excreción de este metal se encontraban facilitadas, respectivamente.

- 9.- En el análisis de regresión del Zn, Cu, balance Cu/Zn y Al, entre ellos mismos y con los parámetros restantes analizados en los enfermos, es reseñable la correlación lineal negativa entre los niveles séricos de Zn y el colesterol-LDL, así como la positiva entre los balances Cu/Zn y las concentraciones de colesterol total y colesterol-LDL.
- 10.- Los enfermos presentaron niveles más elevados de triglicéridos, urea y ácido úrico, y más bajos de colesterol total, colesterol-LDL, colesterol-HDL, creatinina, GOT y GPT. .
- 11.- En el estudio longitudinal se observaron alteraciones en las concentraciones de ácido úrico, colesterol total, colesterol-LDL, colesterol-HDL, P, He, proteínas, Ca, bilirrubina, Na y ferritina. Concretamente el colesterol total y el colesterol-LDL disminuyeron, lo que podría deberse a la disminución en el estatus corporal de Zn necesario para la biosíntesis de lipoproteínas.

Como conclusión final podemos decir que la correlación existente entre los niveles elevados del balance Cu/Zn observados en estos pacientes y los marcadores de estrés oxidativo, inflamatorios e inmunológicos, hacen recomendable considerar la implementación de terapias dirigidas a disminuir dichos balances, como podrían ser el consumo de diuréticos y de medicamentos que adicionalmente disminuyan los niveles séricos de Al, dado el posible efecto preventivo en cuanto a la aparición de patologías cardiovasculares.

7.- BIBLIOGRAFIA.

- ACS Committee on Environmental Improvement. Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental Chemistry. *Analytical Chemistry* (1980); 52: 2242.
- Al Juhaiman, LA. Estimating aluminum leaching from aluminum cook wares in different meat extracts and milk. *Journal of Saudi Chemical Society* (2010); 14 (1): 131–137.
- Al Mayouf, A; Al Juhaiman, L; Al Suhaybani, L. Corrosion of aluminum in ascorbic, citric and tartaric acids with and without chloride ions. *Anti-Corrosion Methods and Materials* (2008); 55 (2): 79–83.
- Alfrey, AC; LeGendre, GR; Kaehny, WD. The dialysis encephalopathy syndrome. Possible aluminum intoxication. *The New England Journal of Medicine* (1976); 294: 184-8.
- Alimonda, AL; Núñez, J; Nuñez, E y col Hyperuricemia in acute heart failure. More than a simple spectator? *European Journal of Internal Medicine* (2009); 20: 74–79.
- Aggett, PJ. An overview of the metabolism of copper. *European Journal of Medical Research* (1999); 4: 214–6.
- Almas, AR; Singh, BR. Plant uptake of cadmium-109 and zinc-65 at different temperature and organic matter levels. *Journal of Environmental Quality* (2001); 30: 869–877.
- Aranha, LN; Lobo, JC; Stockler-Pinto, MB; Leal, VO; Machado, JP; Mafra, D. Relationship between zinc levels and plasma leptin in hemodialysis patients. *Journal of Trace elements in Medicine and Biology* (2012); 26: 238-242.
- Ari, E; Kaya, Y; Demir, H; Ascioglu, E; Keskin, S. The Correlation of Serum Trace Elements and Heavy Metals with Carotid Artery Atherosclerosis in Maintenance Hemodialysis Patients. *Biological Trace Element Research* (2011); 144: 351-359.
- As´Habi, A; Tabibi, H; Houshiar Rad, A; Nozary Heshmati, B; Mahdavi-Mazdeh, M; Hedayati, M. Dietary assessment of hemodialysis patients in Tehran, Iran. *Hemodialysis International* (2011); 15: 530-537.

- Aschner, M; Syversen, T; Souza, DO; Rocha, JB. Metallothioneins: Mercury Species-Specific Induction and Their Potential Role in Attenuating Neurotoxicity. *Experimental Biology and Medicine* (2006); 231: 1468.
- Azik, FM; Ekim, M; Sakallioğlu, O; Aydin, A. A different interaction between parathyroid hormone, calcitriol and serum aluminum in chronic kidney disease; a pilot study. *International Urology and Nephrology* (2011); 43: 467-470.
- Barceloux, DG. Zinc. *Clinical Toxicology* (1999); 37: 279-292.
- Barceloux, DG. Copper. *Clinical toxicology* (1999b); 37: 217-230.
- Barnes, N; Tsivkovskii, R; Tsivkovskaia, N; Lutsenko, S. The copper-transporting ATPases, Menkes and Wilson Disease Proteins, Have Distinct Roles in Adult and Developing Cerebellum. *The Journal of Biological Chemistry* (2005); 280: 9640-9645.
- Barrera, R; Schattner, M; Gabovich, N; Zhang, J; Saeed, M; Genao, A. Bacteremic episodes and copper/zinc ratio in patients receiving home parenteral nutrition. *Nutrition in Clinical Practice* (2003); 18: 529–532.
- Batista, MN; Cuparri, L; Campos Pedrosa, LF; Almeida, MG; Almeida, JB; Quieroz de Medeiros, AC; Canziani, MEF. Effect of End-Stage Renal Disease and Diabetes on Zinc and Copper Status. *Biological Trace Element Research* (2006); 112: 1-11.
- Bayer, TA; Multhaup, G. Involvement of amyloid β precursor protein (A β PP) modulated copper homeostasis in Alzheimer's disease. *Journal Alzheimer's disease* (2005); 8: 201–6.
- Bellés, M; Albina, ML; Sanchez, DJ; Corbella, J; Domingo, JL. Effects of oral aluminum on essential trace elements metabolism during pregnancy. *Biological Trace Element Research* (2007); 79: 67-81.
- Berg, JW. Zinc finger domains: hypotheses and current knowledge. *Annual Review of Biophysical and Biophysical Chemistry* (1990); 9: 405-421.
- Bettger, WJ; O'Dell, BL. Minireview: A critical physiological role of zinc in the structure and function of biomembranes. *Life Sciences* (1981); 28: 1425-1438.

- Bevc, S; Hojs, R; Ekart, R; y col. Atherosclerosis in hemodialysis patients: Traditional and nontraditional risk factors. *Acta Dermatovenerologica Alpina, Panonica et Adriatica* (2006); 15 (4): 151-157.
- Beyersmann, D. Homeostasis and cellular functions of zinc. *Material Wissenschaft und Werkstofftechnik* (2002); 33: 764–769.
- Bilandzic, N; Đokic, M; Sedak, M; Varenina, I; Kolanovic, BS; Oraic, D; Zrncic, S. Determination of copper in food of animal origin and fish in Croatia. *Food Control* (2012); 27: 284-288.
- Bingham, MJ; Sargeson, AM; McArdle, HG. Identification and characterization of intracellular copper pools in rat hepatocytes. *American Journal of Physiology* (1997); 272: G1400.
- Blumberg, A; Hanck, A; G. Sander nutrición vitamina en los pacientes de diálisis peritoneal ambulatoria continua. *Clinical Nephrology* (1983); 20: 244-250.
- Bohrer, D; Bertagnolli, D; Oliveira, S.; Nascimento, P; Carvalho, L; Garcia, S; Arantes, L; Barros, E. Role of medication in the level of aluminium in the blood of chronic haemodialysis patients. *Nephrology Dialysis Transplantation*. (2009); 24: 1277–1281.
- Botash, AS; Nasca, J; Dubowy, R; Weenberger, HL; Oliphant, M. Zinc–induced copper deficiency in an infant. *American journal of diseases of children* (1992); 164: 709.
- Bozalioglu, S; Ozkan, Y; Turan, M; Simsek, B. Prevalence of zinc deficiency and immune response in short-term hemodialysis. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* (2005); 18: 243–249.
- Bremner, I. Biological Roles of Copper. *Excerpta Medica- Amsterdam. Ciba Foundation Symposium* (1979); 79: 209.
- Breslow, E. Comparison of Cupric Ion-binding Sites in Myoglobin Derivatives and Serum Albumin. *The Journal of Biological Chemistry* (1964); 239: 3252-3259.
- Brewer, GJ. Anticopper therapy against cáncer and diseases of inflammation and fibrosis. *Drug Discovery Today* (2005); 10: 1103-9.

- Burge, J; Schemmel, R; Johnson, LK. Taste acuity and zinc status in chronic renal disease, *Journal of the American Dietetic Association* (1984); 84(10): 1203-1206.
- Cabral, PC; Diniz Ada, S; de Arruda, IK. Vitamin A and zinc status in patients on maintenance haemodialysis. *Nephrology (Carlton)* (2005); 10 (5): 459-463.
- Calesnick, B; Dinan, AM. Zinc deficiency and zinc toxicity. *American Family Physician* (1988); 37: 267-270
- Campbell, A. The potencial role of aluminium in Alzheimer's disease, *Nephrology Dialysis Transplantation* (2002); 17 (2): 17-20.
- Carter, DC; Ho, JX. Advances in Protein Chemistry. *Academic. New York* (1994); 45: 153.
- Cauraut, F. Bioaccumulation de quelques elements traces (As, Cd, Cu, Hg, Se, Zn) chez le globicéphale noir (Globicéphala malas, Delphinidé) pêché au large des iles Fèroé. *Tesis Doctoral*. Université de Nantes (Francia) (1994).
- Cerpa, W; Varela-Nallar, I; Reyes, AE; Minniti, AN; Inestrosa, NC. Is there a role for copper in neurodegenerative disease? *Molecular Aspects of Medicine* (2005); 26: 405-20.
- Chandra, RK. Impact of nutritional status and nutrient supplements on immune responses and incidence of infection in older individuals. *Ageing research reviews* (2004); 3: 91-104.
- Chen, B; Zeng, Y; Hu, B. Study on speciation of aluminum in human serum using zwitterionic bile acid derivative dynamically coated C18 column HPLC separation with UV and on-line ICP-MS detection. *Talanta*. (2010); 81: 180-186.
- Chen, Y-H; Shi, W; Liang, X-L; y col. Effect of blood simple type on the measurement of advanced oxidation protein products as a biomarker of inflammation and oxidative stress in hemodialysis patients. *Biomarkers* (2011); 16 (2): 129-135.
- Chertow, GM; Burke, SK; Raggi, P; Treat to Goal Working Group. Sevelamer attenuates the progression of coronary and aortic calcification in hemodialysis patients. *Kidney International* (2002); 62: 245–252

- Chevalier, CA; Liepa, G; Murphy, MD. The effects of zinc supplementation on serum zinc and cholesterol concentrations in hemodialysis patients. *Journal of Renal Nutrition* (2002); 12: 183-9.
- Christie, M; Lavergne, V; Sikaneta, T; Seng Hue, C; Taskapan, H; Tam, P.W; Ayoub, P; Ting, R; Leblanc, D; Ghannoum, M. Hyperaluminemia During Long-term Dialysis: Still Relevant Today. *American Journal of Kidney Diseases* (2011); 58 (5): 861-863.
- Clydesdale, FM. Minerals: Their Chemistry and Fate in Food. *Marcel Dekker, New York*, 1988, p. 57.
- Collins, AJ; Kasiske, B; Herzog, C; Chavers, B; Foley, R; Gilbertson, D; Grimm, R; Liu, J; Louis, T; Manning, W; Matas, A; McBean, M; Murray, A; St Peter, W; Xue, J; Fan, Q; Guo, H; Li, S; Roberts, T; Snyder, J; Solid, C; Wang, C; Weinhandl, E; Arko, C; Chen, SC; Dalleska, F; Daniels, F; Dunning, S; Ebben, J; Frazier, E: Excerpts from the United States Renal Data System 2004 annual data report: atlas of endstage renal disease in the United States. *American Journal of Kidney Diseases* (2005); 45 (Suppl 1): A5-7.
- Committee on Nutrition. American Academy of Pediatrics: aluminum toxicity in infants and children. *Pediatrics* (1996); 97: 413–416.
- Coyle, P; Philcox, JC; Carey, LC; Rofe, AM. Metallothionein: the multipurpose protein. *Cellular and Molecular Life Sciences* (2002); 59: 627–647.
- Crichton, RR. Biological Inorganic Chemistry. *Elsevier, Amsterdam* (2008).
- Crisponi, G; Nurchi, VM; Fanni, D; Gerosa, C; Nemolato, S; Faa, G. Copper-related diseases: From chemistry to molecular pathology. *Coordination Chemistry Reviews* (2010); 254: 876–889.
- Crisponi, G; Remelli, M. Iron chelating agents for the treatment of iron overload. *Coordination Chemistry Reviews* (2008); 252: 1225-1240.
- Cunningham, BC; Bass, S; Fuh, G; Wells, JA. Zinc mediation of the binding of human growth hormone to the human prolactin receptor. *Science* (1990); 250:1709-1712.

- Da Silvaab, E; Jakubovicb, R; Pejovic-Milic, A; Heyda DV. Aluminium and strontium in calcium supplements and antacids: a concern to haemodialysis patients? *Food Additives and Contaminants* (2010); 27 (10): 1405–1414.
- Dabeka, R; Fouquet, A; Belisle, S; Turcotte, S. Lead, cadmium and aluminum in Canadian infant formulae, oral electrolytes and glucose solutions. *Food Additives and Contaminants* (2011); 28 (6): 744–753.
- Darbre, PD. Environmental oestrogens, cosmetics and breast cancer. Best Practice & Research: *Clinical Endocrinology & Metabolism* (2006); 20(1): 121–143.
- Davis, GK; Mertz, W. Copper trace elements in human and animal nutrition. *New York: Academic Press* (1987); 1, 5th ed.
- Delves, HT. Biological Roles of Copper. *Excerpta Medica-Amsterdam. Ciba Foundation Symposium* (1980); 79: 5.
- Demirezen, D; Uruc, K. Comparative study of trace elements in certain fish, meat and meat products. *Meat science* (2006); 74: 255-260.
- Demont, M; Boutakhrit, K; Fekete, V; Bolle, F; Van Loco, J. Migration of 18 trace elements from ceramic food contact material: influence of pigment, pH, nature of acid and temperature. *Food Chemistry and Toxicology* (2012); 50 (3–4): 734–743.
- Deng, G-F; Li, K; Ma, J; Liu, F; Dai, J-J; Li, H-B. Aluminium content of some processed foods, raw materials and food additives in China by inductively coupled plasma–mass spectrometry. *Food Additives and Contaminants* (2011); Part B, 4 (4): 248–253.
- DeVoto, E; Yokel, RA. The biological speciation and toxicokinetics of aluminum. *Environ Health Perspect* (1994); 102 (11): 940–951.
- D’Haese, P; De Broe, M. Trace elements in chronic renal failure patients treated by dialysis. *Journal of Trace Elements and Electrolytes in Health and Disease* (1999); 16: 163–174.
- Dietary reference intakes: applications in dietary assessment. Washington, DC: National Academy of Sciences (2000); 2-255.

- Ding, X; Xie, H; Kang, YJ. The significance of copper chelators in clinical and experimental application. *Journal of Nutritional Biochemistry* (2011); 22: 301–310.
- Donley, SA; Llagan, BJ; Rim, H; Linder, MC. Copper transport to mammary gland and milk during lactation in rats. *American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism* (2002); 283: E667.
- Douthat, W; Garay, G; Arteaga de, J; Fernández Martin, JL; Cannata, J; Massari, P. Quince años de seguimiento de los niveles de Aluminio en centro de diálisis en Argentina. *Sección metabolismo Óseo y Mineral. Servicio de nefrología. Hospital privado-Centro médico de Cordoba, Argentina* (2006); IV (2): 57-63.
- Drueke TB. Intestinal absorption of aluminium in renal failure. *Nephrology Dialysis Transplantation* (2002); 17 (2): 13-16.
- Dursun, E; Ozben, T; Suleymanlar, G. Effect of hemodialysis on the oxidative stress and antioxidants. *Clinical Chemistry and laboratory medicine* (2002); 40 (10): 1009-1013.
- Eaton-Evans, J; McIlrath, EM; Jackson, WE; McCartney, H; Strain, JJ. Copper supplementation and the maintenance of bone mineral density in middle-aged women. *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine* (1996); 9: 87-94.
- Edwards, MR. Toxicity, aluminum. *E. Medicine from WebMD* (2006); <http://www.Emedicine.Com/MED/topic113.htm>.
- Elshamaa, MF; Sabry, S; Mokhtar, I; El-Saaid, GS; Raafat, M; Abd-El Haleem, DA. Aluminium and lead abnormalities in children on haemodialysis: relationship with some medications. *Archives of Medical Science* (2010); 6 (3): 420-429.
- El Tayeb, A; Abd El-Mottaleb, N; Abdel Aziz, E. Relationship Between Serum Parathyroid Hormone and Trace elements (Serum Zinc and Magnesium) in hemodialyzed Chronic Renal Failure Children. *Biological Trace Element Research* (2009); 128: 128-134.
- El-Youssef, M. Wilson disease. *Mayo Clinical Proceedings*. (2003); 78: 1126–1136.

- Evelyn Tiffany-Castiglioni, E; Hong, S; Qian, Y. Copper handling by astrocytes: Insights into neurodegenerative diseases. *International Journal of Developmental Neuroscience* (2011); 29: 811–818.
- Exley, C. A biogeochemical cycle for aluminium? *Journal of Inorganic Biochemistry* (2003); 97 (1): 1–7.
- Exley, C; Charles, LM; Barr, L; Martin, C; Polwart, A; Darbre, PD. Aluminium in human breast tissue. *Journal of Inorganic Biochemistry* (2007); 101(9): 1344–1346.
- Falchuk, K. The molecular basis for the role of zinc in developmental biology. *Molecular and Cellular Biochemistry* (1998); 188: 41–48.
- Faure, A; Mathon, L; Poupelin, JC; Allaouchiche, B; Chassard, D. Acute cupric sulfate intoxication: pathophysiology and therapy about a case report. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation* (2003); 22: 557–9.
- Farinati, F; Cardin, R; D'Inca, R; Naccarato, R; Sturniolo, GC. Zinc treatment prevents lipid peroxidation and increases glutathione availability in Wilson's disease. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* (2003); 141: 372.
- Faure, A; Mathon, L; Poupelin, JC; Allaouchiche, B; Chassard, D. Acute cupric sulfate intoxication: pathophysiology and therapy about a case report. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation* (2003); 22: 557–9.
- Feketea, V; Deconinckb, E; Bollea, F; Van Loocoab, J. Modelling aluminium leaching into food from different foodware materials with multi-level factorial design of experiments. *Food Additives and Contaminants* (2012); 29 (8): 1322–1333.
- Ferreira, KS; Gomes, JC; Chaves, JBP. Copper content of commonly consumed food in Brazil. *Food Chemistry* (2005); 92: 29–32.
- Fimreite, N; Hansen, OO; Pettersen, HC. Aluminum concentrations in selected foods prepared in aluminum cookware, and its implications for human health. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* (1997); 58 (1): 1–7.
- Fischer, PWF; L'Abbe, MR; Giroux, A. Effects of age, smoking, drinking, exercise and estrogen use on indices of copper status in healthy adults. *Nutrition Research* (1990); 10: 1081-90.

- Food Standards Agency: McCance and Widdowson's The Composition of Foods, Sixth Summary Edition. *Cambridge: Royal Society of Chemistry* (2002).
- Ford, ES. Serum copper concentration and coronary heart disease among US adults. *The American Journal of Epidemiology* (2000); 151: 1182–8.
- Fortes, C; Forastiere, F; Agabiti, N; Fano, V; Pacifici, R; Virgili, F; Piras, G; Guidi, L; Bartoloni, C; Tricerri, A; Zuccaro, P; Ebrahim, S; Perucci, CA. The effect of zinc and vitamin A supplementation on immune response in an older population. *Journal of the American Geriatrics Society* (1998); 46: 19–26.
- Franchitto, N; Gandia-Mailly, P; Georges, B; Galinier, A; Telmon, N; Ducassé, JL; Rougé, D. Acute copper sulphate poisoning: A case report and literature review. *Resuscitation* (2008); 78: 92–96.
- Frankova, A; Drabek, O; Havlik, J; Szakova, J; Vanek, A. The effect of beverage preparation method on aluminium content in coffee infusions. *Journal of Inorganic Biochemistry* (2009); 103 (11): 1480–1485.
- Frederickson, C. Neurobiology of zinc and zinc-containing neurons. In: *International review of neurobiology* (Smythies J, Bradley R, eds). *New York: Academic Press* (1989); 31: 145-238.
- Froment, DP; Molitoris, BA; Buddington, B; Miller, N; Alfrey, AC. Site and mechanism of enhanced gastrointestinal absorption of aluminum by citrate. *Kidney International* (1989); 36: 978–984.
- Frossard, E; Bucher, M; Mächler, F; Mozafar, A; Hurrell, R. Potential for increasing the content and bioavailability of Fe, Zn and Ca in plants for human nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture* (2000); 80: 861–879.
- Ganrot, PO. Metabolism and possible health effects of aluminum. *Environ Health Perspect* (1986); 65: 363–441.
- Gentil, MG; Maná, GM; D'Amico, G; Testolin, G; Porrini, M; Simonetti, P. Vitamin Nutrition in patients with chronic renal failure and dietary manipulation. *Contributions to Nephrology* (1988); 65: 43-50.

- Gilmour, ER; Hartley, GH; Goodship, THJ. Trace elements and vitamins in renal disease. In: Mitch, W, E. e Klahr, S. *Handbook of Nutrition and the Kidney*, 3^a ed. Philadelphia: Lippincott-Raven (1998); 107-122.
- Gimeno-García, E; Andreu, V; Boluda, R. Heavy metals incidence in the application of inorganic fertilizers and pesticides to rice farming soils. *Environ Pollut* (1996); 92: 19–25.
- Golden, MHN. Severe malnutrition. In: Weatherall, DJ; Ledingham, JG; Warrell, DA; editors. *Oxford textbook of medicine*. Oxford: Oxford University Press (1996); 1278-96.
- Goldhaber, SB. Trace elements risk assessment: Essentiality vs. Toxicity. *Regulatory toxicology and Pharmacology* (2003); 38: 232-242.
- Goldstein AL (ed). Thymic hormones and lymphokines. *Plenum Press, New York* (1984).
- Gollan, JL. Studies on the Nature of complexes formed by copper with human alimentary secretions and their influence on copper absorption in the rat. *Clinical Science and Molecular Medicine* (1975); 49: 237.
- Graham, RD; Welch, RM; Saunders, DA; Ortiz-Monasterio, I; Bouis, HE; Bonierbale, M; de Haan, S; Burgos, G; Thiele, G; Liria, R; Nutritious subsistence food systems. *Advances in Agronomy* (2007); 92: 1–74.
- Greger, JL. Aluminium content of the American diet. *Food Technology* (1985); 9: 73–80.
- Greger, JL; Snedeker, SM. Effect of dietary Protein and Phosphorus levels on the utilization of zinc, copper and manganese by adult males. *Journal of Nutrition* (1980); 110: 2243-2253.
- Griscon, NT; Craigh, JN, Neuhauser, EBD. Systemic bone disease developing in small premature infants. *Pediatrics* (1971); 48: 883-895.
- Grusak, MA; Cakmak, I. Methods to improve the crop-delivery of minerals to humans and livestock. In: *Broadley MR, White PJ, eds. Plant nutritional genomics*. Oxford, UK: Blackwell, (2005); 265–286.
- Gu, QY; Li, XW; Zhang, LC; Huang, JF; Li, YF. Effects of aluminium intoxication on metal elements contents of cerebrum and cerebellum in chicks. *China Poultry* (2009); 23: 15–17.

- Guerin, T; Chekri, R; Vastel, C; Sirot, V; Volatier, JL; Leblanc, JC. Determination of 20 trace elements in fish and other seafood from the french market. *Food Chemistry* (2011); 127: 934- 942.
- Guiraud, P; Favier, A; Horn, N. Metabolisme du cuivre. In: EMC endocrinologie Nutrition. *Physiologie et Pathologie de la Nutrition*. Paris: Masson (2008); 3 (10): 359.
- Gunay, N; Yildirim, C; Karcioğlu, O. A series of patients in the emergency department diagnosed with copper poisoning: recognition equals treatment. *Tohoku Journal of Experimental Medicine* (2006); 209: 243—8.
- Gunshin, H; Mackenzie, B; Berger, UV; Gunshin, Y; Romero, MF; Boron, WF; Nussberger, S; Gollan, JL; Hediger, MA. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* (1997); 388: 482–488
- Guo, Ch; Huang, Cf; Chiou, YL; Hsu, Gs. Alteration of trace element distribution and testis ACE activity in mice with high peritoneal aluminum. *Biological Trace Element Research* (2002); 86: 145- 157.
- Guo, Ch-H; Wang, Ch-L; Chen, P-Ch; Yang, T-Ch. Linkage of Some Trace Elements, Peripheral Blood Lymphocytes, inflammation, and oxidative stress in ESRD patients undergoing either hemodialysis or peritoneal dialysis. *Peritoneal Dialysis International* (2010); 30: 583-591.
- Guo, Ch-H; Chen, P-Ch; Yeh, M-S; Hsiung, D-Y; Wang, Ch-L. Cu/Zn ratios are associated with nutritional status, oxidative stress, inflammation, and immune abnormalities in patients on peritoneal dialysis. *Clinical Biochemistry* (2011a); 44 (4): 275-280.
- Guo, CH; Wang, CL; Chen, PC. Micronutrient metabolism in hemodialysis patients. In: Maria Goretti Penido, ed. *Hemodialysis-different aspects*. Croatia: InTech (2011b); 173-204.
- Guo, Ch-H; Wang, Ch-L. Plasma aluminum is a risk factor for oxidative stress and inflammation status in hemodialysis patients. *Clinical Biochemistry* (2011); 44: 1309-1314.
- Guo, Ch-H; Wang, Ch-L. Research Paper Effects of Zinc Supplementation on Plasma Copper/Zinc Ratios, Oxidative Stress, and Immunological Status

- in Hemodialysis Patients. *International Journal of Medical Sciences* (2013); 10(1): 79-89.
- Gupta, VB; Anitha, S; Hegde, ML; Zecca, L; Garruto, RM; Ravid, R; Shankar, SK; Stein, R; Shanmugavelu, P; Jagannatha Rao, KS. Aluminium in Alzheimer's disease: are we still at a crossroad? *Cellular and Molecular Life Science* (2005); 62 (2): 143-158.
 - Guthrie, JF; Lin, BH; Frazao, E. Role of food prepared away from home in the American Diet, 1977- 1978 versus 1994- 1996; changes and consequences. *Journal of Nutrition Education and Behavior* (2002); 34: 140-150.
 - Ha-Duong, NT; Hemadi, M; Chikh, Z; Chahine, JM. Kinetics and thermodynamics of metal-loaded transferrins: transferrin receptor 1 interactions. *Biochemical Society Transactions* (2008); 36: 1422-1426.
 - Halliwell, B: Ascorbic acid, iron overload, and desferrioxamine [letter]. *British Medical Journal* (Clinical Research Edition) (1982); 285-296.
 - Halliwell, B; Gutteridge, JMC. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal* (1984); 219: 1-14.
 - Hambidge, KM; Chavez, MN; Brown, RM; Walravens, PA. Zinc nutritional status of young middle-income children and effects of consuming zinc-fortified breakfast cereal. *American Journal of Clinical Nutrition* (1979); 37: 2532-2539.
 - Han, O; Wessling-Resnick, M. Copper repletion enhances apical iron uptake and transepithelial iron transport by Caco-2 cells. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology* (2002); 282: G527.
 - Hasan, N; Emery, D; Baithun, SI; Dodd, S. Chronic copper intoxication due to ingestión of coins: a report of an unusual case. *Human and Experimental Toxicology* (1995); 14: 500-2.
 - Hart, EB; Steenbock, J; Waddell, J; Elvehjem, CA. Iron in Nutrition: VII. Copper as a supplement to Iron for Hemoglobin building in the rat. *The Journal of Biological Chemistry* (1982); 77: 797.
 - Harvey, LJ; Dainty, JR; Beattie, JH; Majsak-Newman, G; Wharf, SG; Reid, MD; Fairweather-Tait, SJ. Copper absorption from foods labelled intrinsically

and extrinsically with Cu-65 stable isotope. *European Journal of Clinical Nutrition* (2005); 59: 363–368.

- Harris, W.R. Binding and transport of aluminum by serum proteins. *Coordination Chemistry Reviews* (1996); 149: 347-365.
- Haschke, F; Ziegler, EE; Edwards, BB; Fomon, SJ. Effect of iron fortification of infant formula on trace mineral absorption. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* (1986); 5: 768–73.
- Healy, H; Reith, D; Morgan, C; Clague, A; Westhuyzen, J. Are metalloproteins and acute phase reactants associated with cardiovascular disease in end-stage renal failure? *Annals of Clinical and Laboratory Science* (2000); 30: 295–304.
- Heller, RM; Kirchner, SG; O'Neill, JrJA; Hough, JrAJ; Howard, L; Kramer, SS. Skeletal changes of copper deficiency in infants receiving prolonged total parenteral nutrition. *Journal of Pediatrics* (1978); 92: 947–9.
- Hellstrom, HO; Michaelsson, K; Mallmin, H; Mjoberg, B. The aluminium content of bone, and mortality risk. *Age Ageing* (2008); 37(2): 217–220.
- Hémadi, M; Miquel, G; Kahn, PH; El Hage Chaine, JM. Aluminum exchange between citrate and human serum transferrin and interaction with transferrin receptor 1. *Biochemistry* (2003); 42: 3120-3130.
- Henkin, RI; Aamodt, RL. A redefinition of zinc deficiency. In: *Nutritional bioavailability of zinc*, chap. 6 (Inglett GE, ed.). Washington: American Chemical Society (1983); 83-105.
- Henkin RI, Schechter PH, Friedewald WVT, Demets DL, Raff M. A double blind study of the effects of zinc sulfate on taste and small bowel dysfunction. *The American Journal of the Medical Sciences* (1976); 272: 285- 299.
- Himmelfarb, J. Hemodialysis complications. *American Journal of Kidney diseases* (2005); 45 (6): 1122-1131.
- Himmelfarb, J. Relevance of oxidative pathways in the pathophysiology of chronic kidney disease. *Cardiology Clinics* (2005); 23: 319–330.
- Himmelfarb, J. Oxidative stress in hemodialysis. *Contributions to Nephrology* (2008); 161: 132-137.

- Hoeper, MM; Hohfeld, JM; Fabel, H. Hyperuricaemia in patients with right or left heart failure. *European Respiratory Journal* (1999); 13: 682–685.
- Hoffman, HN; Pkyliky, RL; Fleming, CR. Zinc-induced copper deficiency. *Gastroenterology* (1988); 94: 508-512.
- Hosokawa, S; Nishitani, H; Imai, T; Nishio, T; Tomoyoshi, T; Sawanishi, K. Changes in Copper and zinc in chronic haemodialysis patients. *Proceedings of the European Dialysis and Transplant Association-European Renal Association. Congress* (1984), 21, 247–250.
- Hosokawa, S; Oyamaguchi, A; Yoshida, O. Trace elements and complications in patients undergoing chronic hemodialysis. *Nephron* (1990); 55(4): 375–379.
- Hou, XH; Lamberts, LV; Guan, GJ; D'Haese, PC. Increased exposure to aluminum: Still a problem for chronic renal failure patients in East China? *Trace Elements and Electrolytes* (2010); 27 (1): 10-19.
- Hsieh, Y-Y; Shen, W-S; Lee, L-Y; Wu, T-L; Ning, H-Ch; Sun, Ch-F. Long-Term Changes in Trace Elements in patients Undergoing Chronic Hemodialysis. *Biological Trace Element Research* (2006); 106: 115-121.
- Huang, JW; Hung, KY; Lee, SH. Trace elements in blood and dialysate among continuous ambulatory peritoneal dialysis patients: a prospective, multicenter collaborative Study. *Dial Transplant* (2000); 29: 62-8.
- Hung, KY; Ho, CY; Kuo, YM. Trace elements burden in geriatric hemodialysis patients a prosective multicentre collaborative study, *International Journal of Artificial Organs* (1997); 20: 553-556.
- Ikee, R; Tsunoda, M; Sasaki, N; Sato, N; Hashimoto, N. Clinical factors associated with serum copper levels and potential effect of sevelamer in hemodialysis patients. *International Urology and Nephrology* (2012) 1-7.
- Institute of Medicine (US). Subcommittee on Interpretation, et al. *Dietary reference intakes: a report of the Subcommittees on Interpretation and Uses of Dietary Reference Intakes and the Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes, Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. Applications in dietary assessment.* National Academies Press, 2000.

- Institute of Medicine (IOM), food and Nutrition Board. Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium and zinc. Washington, DC: National Academy Press, 2001.
- Ishani, A; Collins, AJ; Herzog, CA; Foley, RN: Septicemia, access and cardiovascular disease in dialysis patients: the USRDS Wave 2 study. *Kidney International* (2005); 68: 311-318.
- IUPAC. Nomenclature, symbols, units and their usage in spectrochemical analysis-II. *Spectrochimica Acta* (1978); 33B: 242.
- Jantsch, W; Kulig, K; Rumack, BH. Massive copper sulphate ingestion resulting in hepatotoxicity. *Journal of Toxicology. Clinical Toxicology* (1984-1985); 22: 585-8.
- Jiang, Y; Reynolds, C; Xiao, C; Feng, W; Zhou, Z; Rodriguez, W. Dietary copper supplementation reverses hypertrophic cardiomyopathy induced by chronic pressure overload in mice. *Journal of Experimental Medicine* (2007); 204: 657-66.
- Jimenez, AM; Herrador, MA; Asuero, MA. Elementos traza en alimentos. I. Aspectos metodológicos de su determinación. *Alimentaria* (1984); 152: 107-112.
- Johnson, PE; Milne, DB; Lykken, GI. Effects of age and sex on copper absorption, biological half-life, and status in humans. *American Journal of Clinical Nutrition* (1992); 56: 917-25.
- Kaminska-Galwas, B; Grzeszczak, W; Jedryczko, A; Pachelski, JL. Levels of Zn, Cu, Ni and Se in the serum of treated haemodialysis patients. Influence of the therapy with erythropoietin, *Polish Archives of internal Medicine Wewn.* (1993); 89: 368-376.
- Kang, YJ. Copper and homocysteine in cardiovascular diseases. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* (2011); 129(3): 321-331.
- Karahan, SC; Deger, O; Orem, A; Ucar, F; Erem, C; Alver, A. The effects of impaired trace element status on polymorphonuclear leukocyte activation in the development of vascular complications in type 2 diabetes mellitus. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* (2001); 39: 109-115.

- Kasama, RK. Trace Minerals in Patients with End-Stage Renal Disease. *Seminars in Dialysis* (2010); 23 (6): 561–570.
- Kazi, TG; Jalbani, N; Baig, JA; Arain, MB; Afridi, HI; Jamali, MK; Shah, AQ; Memon, AN. Evaluation of toxic elements in baby foods commercially available in Pakistan. *Food Chemistry* (2010); 119: 1313- 1317.
- Kestenbaum, B; Belozeroff, V. Mineral metabolism disturbances in patients with chronic kidney disease. *European Journal of Clinical Investigation* (2007); 37: 607–622.
- Khan, SN; Rahman, MA; Samad, A. Trace elements in serum from Pakistani patients with acute and chronic ischemic heart disease and hypertension. *Clinical Chemistry* (1984); 30: 644–8.
- Kim, B; Nevitt, T; Thiele, DJ. Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation. *Nature Chemical Biology* (2008); 4: 176-85.
- Kim, BE; Turski, ML; Nose, Y; Casad, M; Rockman, HA; Thiele, DJ. Cardiac copper deficiency activates a systemic signaling mechanism that communicates with the copper acquisition and storage organs. *Cell Metabolism* (2010); 11: 353–63.
- Kirmizis, D; Papagianni, A; Dogrammatzi, F; y col. Effects of simvastatin on markers of inflammation oxidative stress and endothelial cell apoptosis in patients on chronic hemodialysis. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* (2010); 17 (12): 1256-1265.
- Kitzemberg, R; Madl, C; Ferenci, P. Wilson Disease. *Metabolic Brain Disease* (2005); 20: 295.
- Kiziltas, H; Ekin, S; Erkok, R. Trace Element Status of Chronic Renal Patients Undergoing Hemodialysis. *Biological Trace Element Research* (2008); 124: 103-109.
- Klein, Jr WJ; Metz, EN; Price, AR. Acute copper intoxication. A hazard of hemodialysis. *Archives of Internal Medicine* (1972); 129: 578-82.
- Klein, GL; Leichtner, AM; Heyman, MB. Patient Care Committee of the North American Society for Pediatric Gastroenterology and Nutrition. Position Statement of the North American Society for Pediatric Gastroenterology and Nutrition: Aluminum in Large and Small Volume Parenterals Used in Total

Parenteral Nutrition: *Response to the Food and Drug Administration (FDA) Notice of Proposed Rule by the North American Society for Pediatric Gastroenterology and Nutrition* (2004). Disponible en: <http://www.naspgn.org/sub/aluminum.asp>.

- Klevay, LM. Cardiovascular disease from copper deficiency—a history. *The Journal of Nutrition* (2000); 130: 4895-925.
- Klevay, LM. Is the Western diet adequate in copper? *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* (2011); 25: 204– 212.
- Knöpfel, M; Smith, C; Solioz, M. ATP-driven copper transport across the intestinal brush border membrane. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2005); 330: 645–652.
- Koca, T; Berber, A; Koca, HB; Demir, TA; Koken, T. Effects of hemodialysis period on levels of blood trace elements and oxidative stress. *Clinical and Experimental Nephrology* (2010); 14(5): 463–468.
- Kodama, H; Sato, E; Gu, YH; Shiga, K; Fujisawa, C; Kozuma, TJ. Effect of copper and diethyldithiocarbamate combination therapy on the macular mouse, and animal model of Menkes disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease* (2005); 28: 971.
- Koletzko, B; Baker, S; Cleghorn, G; Neto, UF; Gopalan, S; Hernell, O. Global standard for the composition of infant fórmula: Recommendations of an ESPGHAM coordinated international expert group. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* (2005); 41 (5): 584-599.
- Komindr, S; Thirawitayakom, J; Taechangam, S; Puchaiwatananon, O; Songchisomboon, S; Domrongkitchaiporn, S. Nutritional status in chronic hemodialysis patients, *Biomedical and Environmental Science* (1996); 9: 256–262.
- Kopple, JD; Mercurio, K; Blumenkrantz, MJ. Daily requirement for pyridoxine supplements in chronic renal failure. *Kidney International* (1981); 19: 694-704.
- Krachler, M; Shi, F; Rossipal, E; Irgolic, KJ. Changes in the concentrations of trace elements in human milk during lactation. *Journal of Trace elements in Medicine and Biology* (1998); 12: 159.

- Krachler, M; Scharfetter, H; Wirnsberger, G. Exchange of alkali trace elements in hemodialysis patients: a comparison with Na⁺ and K⁺. *Nephron* (1999); 83: 226–236.
- Krachler, M; Wirnsberger, GH. Long-term changes of plasma trace element concentrations in chronic hemodialysis patients. *Blood Purification* (2000); 18: 138–43.
- Krewski, D; Yokel, RA; Nieboer, E; Borchelt, D; Cohen, J; Harry, J; Kacew, S; Lindsay, J; Mahfouz, AM; Rondeau, V. Human health risk assessment for aluminium, aluminium oxide, and aluminium hydroxide. *Journal of Toxicology and Environmental Health part B*. (2007); 10 (1): 1–269.
- Kruger, PC; Parsons, PJ. Determination of serum aluminum by electrothermal atomic absorption spectrometry: A comparison between Zeeman and continuum background correction systems. *Spectrochimica Acta* (2007); Part B 62: 288-296.
- Kumar, V; Gill, KD. Aluminium neurotoxicity: neurobehavioural and oxidative aspects. *Archives of Toxicology* (2009); 83: 965–978.
- Laserna, JJ. Pérdidas y contaminación en análisis de trazas. *Química analítica* (1985); 4: 1-22.
- Leblanc, JC; Guérin, T; Noël, L; Calamassi-Tran, G; Volatier, JL; Verger, P. Dietary exposure estimates of 18 elements from the 1st French total diet study. *Food Additives and Contaminants* (2005); 22: 624- 641.
- Ledoux, DR; Henry, PR; Ammerman, CB; Rao, PV; Miles, RD. Estimation of the relative bioavailability of inorganic copper sources for chicks using tissue uptake of copper. *Journal of Animal Science* (1991); 69: 215-222.
- Ledoux, DR; Pott, EB; Henry, PR; Ammerman, CB; Merritt, AM; Madison, JB. Estimation of the relative bioavailability of inorganic copper sources for sheep. *Nutrition Research* (1995); 15: 1803.
- Lee, J; Pena, MM; Nose, Y; Thiele, DJ. Biochemical characterization of the human copper transporter Ctr1. *Journal of Biological Chemistry* (2002); 277: 4380-7.

- Lesourd, BM. Nutrition and immunity in the elderly: modification of immune responses with nutritional treatments. *American Journal of Clinical Nutrition* (1997); 66: S478–S484
- Leyva, F; Anker, S; Swan, JW y col. Serum uric acid as an index of impaired oxidative metabolism in chronic heart failure. *European Heart Journal* 1997); 18: 858–865.
- Leyva, F; Anker, SD; Godsland, IF y col. Uric acid in chronic heart failure: a marker of chronic inflammation. *European Heart Journal* (1998); 19: 1814–1822.
- Li, J; Hsieh, Y. Traditional Chinese food technology and cuisine. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*. (2004); 13(2): 147–155.
- Li, XW; Zhang, LC; Zhu, YZ; Li, YF. Dynamic analysis of exposure to aluminum and an acidic condition on bone formation in young growing rats. *Environ Toxicol Pharmacol* (2011); 31: 295–301.
- Libuda, L; Alexy, U; Remer, T; Stehle, P; Schoenar, E; Kersting, M. Association between long-term consumption of soft drinks and variables of bone modelling and remodelling in a sample of healthy German children and adolescents. *The American Journal of Clinical Nutrition* (2008); 88: 1670-1677.
- Lin, YF; Chien, CT; Kan, WC. Pleiotropic effects of sevelamer beyond phosphate binding in end-stage renal disease patients: a randomized, open-label, parallel-group study. *Clinical Drug Investigation* (2011); 31: 257–267.
- Linder, MC; Weiss, KC; Vu, HM; Rucker, RB in: Hurley, LC; Lonnerdal, B; Keen, C (Eds.). Trace Elements in Man and Animals, *Plenum, New York* (1987); p. 141.
- Linder, MC. The Biochemistry of Copper. *Plenum Press, New York* (1991).
- Linder, MC; Hazeg-Azam, M. Copper biochemistry and molecular biology. *American Journal of Clinical Nutrition* (1996); 63: 797S-811S.
- Linder, MC; Wooten, L; Cerveza, P. Copper transport. *American Journal of Clinical Nutrition* (1998); 67: 965S-971S.
- Linz, R; Barnes, NL; Zimnicka, AM; Kaplan, JH; Eipper, B; Lutsenko, S. Intracellular targeting of copper-transporting ATPase ATP7A in a normal and

- Atp7b/- kidney. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* (2008); 294: F53-F61.
- Lione, A. The prophylactic reduction of aluminium intake. *Food Chemistry and Toxicology* (1983); 21(1): 103–109.
 - Liukkonen-Lilja, H; Piepponen, S. Leaching of aluminium from aluminium dishes and packages. *Food Additives and Contaminants* (1992); 9(3): 213–223.
 - Lobo, JC; Aranha, LN; Moraes, C; Brito, LC; Mafra, D. Linking Zinc and Leptin in Chronic Kidney Disease: Future Directions. *Biological Trace Element Research* (2012); 146: 1-5.
 - Locsey, L; Papp, L. Study of trace elements in patients on haemodialysis. *International Urology and Nephrology* (1983); 15: 289–295.
 - Lombardi-Boccia, G; Aguzzi, A; Cappelloni, H; Di Lullo, G; Lucarini, M. Total diet study. *British Journal of Nutrition* (2003); 90: 1117-1121.
 - Long, GL; Winefordner, JD. Limit of detection a closer look at the IUPAC. Definition. *Analytical Chemistry* (1983); 55: 713^a.
 - Lonnerdal, B. Copper nutrition during infancy and childhood. *American Journal of Clinical Nutrition* (1998); 67: 1046S-1053S.
 - Lopez de Romaña, D; Olivares, M; Uauy, R; Araya, M. Risks and benefits of copper in light of new insights of copper homeostasis. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* (2011); 25: 3–13.
 - Madsen, E; Gitlin, JD. Copper deficiency. *Current Opinion in Gastroenterology* (2007); 23: 187-192.
 - Maha AM. Al-Ashmawy. Prevalence and Public Health Significance of Aluminum Residues in Milk and Some Dairy Products. *Journal of Food Science* (2011); 76 (3): 73-76.
 - Mahajan, SK; Prasad, AS; Rabbani, P; Briggs, WA; McDonald, FD. Zinc deficiency a reversible complication of uremia. *American Journal of Clinical Nutrition* (1982); 36: 1177-1183.

- Maret, W; Sandstead, HH. Zinc requirements and the risks and benefits of zinc supplementation. *Journal of Trace elements in Medicine and Biology* (2006); 20(1): 3–18.
- Markovits, PM; Sankey, AW; James, DK; McCabe, R; Mahomed, K; Golding, J: Zinc taste test and postnatal depression. *British Journal of Psychiatry* (1990); 156: 451-452.
- Marschner, H. Mineral nutrition of higher plants. *London, UK: Academic Press* (1995).
- Marsh, HN; Riley, SA. Digestion and absorption of nutrients and vitamins. In: Feldman, M; Sleisenger, MH; Scharchmidt, BF. (Eds), *Sleisenger and Fordstran's Gastrointestinal and Liver Disease*. *WB Saunders Co* (1998), ch 7, 1471.
- Martí del Moral, L; Agil, A; Navarro-Alarcón, M; López-G^a de la Serrana, H; Palomares-Bayo, M; Oliveras-López, MJ. Altered serum selenium and uric acid levels and dyslipidemia in hemodialysis patients could be associated with an enhanced cardiovascular risk. . *Biological Trace Element Research* 2011; 144: 496-503.
- Martín, A; Luna, J. Bioestadística para las ciencias de la salud. *Ed. Norma, Madrid* (1988).
- Martin, F; Linden, T; Katskinski, DM; Oehme, F; Flamme, I; Mukhopadhyay, CK; Eckardt, K; Troger, J; Barth, S; Camenisch, G; Wenger, RH. Copper-dependent activation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1: Implications for ceruloplasmin regulation. *Blood* (2005); 105: 4613-4619.
- Mason, KE. A conspectus of research on copper metabolism and requirements of man. *The Journal of Nutrition* (1979); 109: 1979–2066.
- Mataix, J; López-Frías, M; Martínez de Victoria, E; López-Jurado, M; Aranda, P; Llopis, J. Factors associated with obesity in an adult Mediterranean population: Influence on plasma lipid profile. *Journal of the American College of Nutrition* (2005); 24: 456-65.
- Mataix, J; Llopis, J. In: Mataix, J, editor. *Minerales. Nutrición y Alimentación Humana*. Madrid: Ergon (2009); 265-231.

- Mazej, Z; Al Sayegh-Petkovsek, S; Pokorny, B. Heavy metal concentrations in food chain of Lake Velenjsko jezero, Slovenia: an artificial lake from mining. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, (2010); 58: 998–1007.
- Medicare program; standards for quality of water used in dialysis and revised guidelines on reuse of hemodialysis filters for end-stage renal disease (ESRD) patients – HCFA. *Final rule. Fed Regist* (1995); 60: 48039-48044.
- Mesías, M; Seiquer, I; Navarro, P. Consumption of highly processed foods: Effects on bioavailability and status of zinc and copper in adolescents. *Food Research International* (2012); 45: 184–190.
- Michaluk, A; Kochman, K. Involvement of copper in female reproduction. *Reproductive Biology* (2007); 7: 193-205.
- Millour, S; Noël, L; Kadar, A; Chekri, R; Vastel, C; Sirot, V. Leblanc, J.C; Guérin, T. Pb, Hg, Cd, As, Sb and Al levels in foodstuffs from the 2nd French total diet study. *Food Chemistry* (2011); 126: 1787–1799.
- Mills, CF. Dietary interactions involving trace elements. *Annual Review of Nutrition* (1985); 5: 173-193.
- Miura, Y; Nakai, K; Sera, K; Sato, M. Trace elements in sera from patients with renal disease. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*. (1999); 150: 218–21.
- Miura, Y; Nakai, K; Suwabe, A; Sera, K. Trace elements in renal disease and hemodialysis. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B Beam Interactions with Materials and Atoms* (2002); 189: 443–449.
- Mocchegiani, E; Fabris, N. Age-related thymus involution: zinc reverses in vitro the thymulin secretion defect. *International Journal of Immunopharmacology* (1995); 17: 745-9.
- Mocchegiani, E; Muzzioli, M. Zinc, metallothioneins, immune responses, survival and ageing. *Biogerontology* (2000a); 1: 133–143
- Mocchegiani, E; Muzzioli, M. Therapeutic application of zinc in human immunodeficiency virus against opportunistic infections. *The Journal of Nutrition* (2000b); 130 (5): S1424–S1431

- Mocchegiani, E; Giacconi, R; Cipriano, C; Gasparini, N; Orlando, F; Stecconi, R; Muzzioli, M; Isani, G; Carpena, E. Metallo- thioneins (I+II) and thyroid-thymus axis efficiency in old mice: role of corticosterone and zinc supply. *Mechanisms of Ageing and Development* (2002); 123: 675–694.
- Molony, D; Murthy, B. Accumulation of metals and minerals from phosphate binders. *Blood Purification* (2005); 23 (1): 2–11.
- Morandi, L; Angelini, C; Prella, A. High plasma creatine Kinase: review of the literatura and proposal for a diagnostic algorithm. *Neurological Sciences* (2006); 27: 303-311.
- Moreno, A; Esparza, N; Toledo, A; Suria, S; Rosique, P; García-Cantón, C; Palomar, R; Perez, MA; Checa, MD. Vacunación contra hepatitis B: otra fuente de carga de Aluminio via parenteral en los pacientes en hemodiálisis. *Nefrología* (1999); 19 (4): 331-337.
- Morishita, Y; Hanawa, S; Miki, T; y col. The association of plasma provenin level with an oxidative stress marker 8-OHdG in nondiabetic hemodialysis patients. *Clinical and experimental nephrology* (2011); 15 (3): 398-404.
- Mudge, DW; Johnson, DW; Hawley, CM; Campbell, SB; Isbel, NM; LvanEps, C; Petrie, JJB. Do aluminium-based phosphate binders continue to have a role in contemporary nephrology practice? *BMC Nephrology* (2011), 12:20.
- Mujika, JI; López, X; Rezabal, E; Castillo, R; Marti, S; Moliner, V; Ugalde, JM. A QM/MM study of the complexes formed by aluminum and iron with serum transferrin at neutral and acidic ph. *Journal of Inorganic Biochemistry* (2011); 105: 1446-1456.
- Muller, JP; Steinegger, A; Schlatter, C. Contribution of aluminum from packaging materials and cooking utensils to the daily aluminum intake. *Z Lebensm Unters Forsch* (1993); 197 (4): 332–341.
- Muller, M; Anke, M; Illing-Gunther, H. Aluminium in foodstuffs. *Food Chemistry* (1997); 61: 419–428.
- Mydlík M, Derzsiová K, Válek A, Szabó T, Dandár V, Takác M. Vitamins and continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD). *International Urology and Nephrology* (1985); 17(3): 281-6.

- Nardi, EP; Evangelista, FS; Tormen, L; Saint´Pierre, TD; Curtius, AJ; de Souza, SS. The use of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) for the determination of toxic and essential elements in different types of food samples. *Food Chemistry* (2009); 112: 727-732.
- NAS/NRC. Drinking water and health. The contribution of drinking water to mineral nutrition in humans. *Washington: National Academy of Sciences* (1980); 265-403.
- Nath, R. Copper deficiency and heart disease: molecular basis, recent advances and current concepts. *International Journal of Biochemistry and Cellular Biology* (1997); 29: 1245-54.
- National Research Council. Copper in drinking water. *Washington, DC: National Academy Press* (2000).
- Navarro-Alarcón, M; Reyes Pérez, A; López García, H; Palomares Bayo, M; Olalla-Herrera, M; López-Martínez, MC. Longitudinal study of Serum Zinc and Copper Levels in hemodialysis Patients and their Relation to Biochemical Markers. *Biological Trace Element Research* (2006); 113: 209-222.
- Navarro-Alarcon, M; Gil Hernández, F; Gil Hernandez, A. Selenio, manganeso, cromo, zinc, molibdeno, yodo y otros oligoelementos minoritarios. In: Gil Hernández A, editor. *Tratado de Nutrición, Tomo I: Bases fisiológicas y Bioquímicas de la Nutrición*. Madrid: Acción Medica (2010); 997–1036.
- Navarro-Gonzalez, JF; Mora-Fernandez, C; Muros de Fuentes, M; Donate-Correa, J; Cazana-Perez, V; Garcia-Perez, J. Effect of phosphate binders on serum inflammatory profile, soluble CD14, and endotoxin levels in hemodialysis patients. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* (2011); 6: 2272–2279.
- Navarro, M; Sánchez, M; López, MC; López, H. Determination of mercury in crops by cold vapor atomic absorption spectrometry after microwave dissolution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (1991); 39: 2223-2225.

- Navarro, J; Granadillo, V; Salgado, O; Rodríguez-Iturbe, B; García, R; Delling, G; Romero, R. Bone metal content in patients with chronic failure. *Clinical Chemistry* (1992); 211: 133–142.
- Navarro, P; Aspe, T; Seiquer, I. Zinc transport in Caco-2 cells and zinc in rats: Influence of the heat treatment of a casein–glucose–fructose-mixture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2000); 48: 3589–3596.
- Nayak P. Aluminium: impacts and disease. *Environmental Research* (2002); 89: 101–115.
- Nenchev, N; Pavlova, S; Dimitrova, V; Strashimirova, V; Sredkov, I; Kraev, Zdr. Level of aluminum in the blood serum determined by atomic absorption spectrometry in patients on a periodic dialysis. *Nephrology, Dialysis and Transplantation* (2007); 13 (3-4): 50-53.
- Nesse, A; Garbossa, G; Pérez, G; Vittori, D; Pregi, N. Aluminio: ¿culpable o inocente? *Química Viva* (2003); 2 (1): 9-16.
- Nihi, MM; Manfro, RC; Martins, C; y col. Association between body fat, inflammation and oxidative stress in hemodialysis. *Jornal brasileiro de Nefrología* (2010); 32 (1): 9-15.
- Noël, L; Chekri, R; Millour, S; Vastel, C; Kadar, A; Sirot, V; Leblanc, JC; Guérin, T. Li, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Se and Mo levels in foodstuffs from the Second French TDS. *Food Chemistry* (2012); 132: 1502–1513.
- Nolan, ChR; Qunibi, WY. Treatment of hyperphosphatemia in patients with chronic kidney disease on maintenance hemodialysis. *Kidney International*, Vol. 67, Supplement 95 (2005); 95: S13–S20.
- Nookabkaewa, S; Rangkadilokab, N; Akibb, CA; Tuntiwigitc, N; Saehuna, J; Satayavivadabd, J. Evaluation of trace elements in selected foods and dietary intake by young children in Thailand. *Food Additives & Contaminants* (2013); Part. B, 6 (1): 55–67.
- Nose, Y; Kim, BE; Thiele, DJ. Ctr1 drives intestinal copper absorption and is essential for growth, iron metabolism and neonatal cardiac function. *Cell Metabolism* (2006); 4: 235.
- NRC. Recommended dietary allowances. 10th ed. Washington: National Academy of Sciences, (1989).

- Ochi, A; Ishimura, E; Tsujimoto, Y; Kakiya, R; Tabata, T; Mori, K; Shoji, T; Yasuda, H; Nishizawa, Y; Inaba, M. Trace Elements in the Hair of Hemodialysis Patients. *Biological Trace Element Research* (2011); 143: 825-834.
- Olaizola, I; Serrano, M; Álvarez González, M.A.; Naves, M.L.; Cannata, JB. Evidencias clínico-experimentales sobre la existencia de un mecanismo de retroalimentación en la regulación de la absorción intestinal de Aluminio en la insuficiencia renal crónica. *Nefrología* (1990); 10 (3): 270-276.
- Oldenquist, G; Salem, M. Parenteral copper sulfate poisoning causing acute renal failure. *Nephrology Dialysis Transplantation* (1999); 14: 441-441-443.
- Olivares, M, Uauy, R. Copper as an essential element. *American Journal of Clinical Nutrition* (1996b); 63: 791S–6S.
- Olivares, M; Uauy, R. Limits of metabolic tolerance to copper and biological basis for present recommendations. *American Journal of Clinical Nutrition* (1996); 63: 846-852.
- Olivares, M; Pizarro, F; Speisky, H; Lönnerdal, B; Uauy, R. Copper in infant nutrition: safety of WHO provisional guideline value for copper content of drinking water. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* (1998); 26: 251–7.
- Olivares, M; Araya, M; Uauy, R. Copper homeostasis in infant nutrition: déficit and excess. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* (2000); 31: 102–11.
- Olivares, M; Castillo, C; Uauy, R. Cobre y Zinc. *Tratado de Nutrición. Tomo 1. Bases Fisiológicas y Bioquímica de la Nutrición.* (Gil, A ed.). Editorial Médica Panamericana. Madrid (2010); 687-704.
- Olivares, M; Pizarro, F; López de Romaña, D; Ruz, M. Acute Copper Supplementation Does Not Inhibit Non-Heme Iron Bioavailability in Humans. *Biological Trace Element Research* (2010b); 136: 180–186.
- O'Neill, NC; Tanner, MS. Uptake of copper from brass vessels by bovine milk and its relevance to Indian childhood cirrhosis. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* (1989); 9: 167–72.

- Onianwa, PC; Adeyemo, AO; Idowu, OE; Ogabiela, EE. Copper and zinc contents of Nigerian foods and estimates of the adult dietary intakes. *Food Chemistry* (2001); 72: 89-95.
- Ortega, RM; Requejo, AM; Andres, P; Lopez-Sobaler, AM; Quintas, ME; Redondo, MR; Navia, B; Rivas, T: Dietary intake and cognitive function in a group of elderly people. *American Journal of Clinical Nutrition* (1997); 66: 803-809.
- Ozen, KP; Asci, G; Gungor, O. Nutritional state alters the association between free triiodothyronine levels and mortality in hemodialysis patients. *American Journal of Nephrology* (2011); 33: 305-12.
- Pandelova, M; Levy Lopez, W; Michalke, B; Schramm, KW. Ca, Cd, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Se, and Zn contents in baby foods from the EU market: Comparison of assessed infant intakes with the present safety limits for minerals and trace elements. *Journal of Food Composition and Analysis* (2012); 27: 120–127.
- Parsons, V; Davies, C; Goode, C. Aluminium in bone from patients with renal failure. *British Medical Journal* (1971); 4: 273-5.
- Pekarinen, M. World food consumption patterns. In: *Man, food, and nutrition* (Rechcigl M, ed.). Boca Raton, FL: CRC Press, (1973); 15-34.
- Penland, JG. Cognitive performance effects of low zinc (Zn) intakes in healthy adult men. *The FASEB Journal* (1991); J 5: A938.
- Pennington, JT; Calloway, DH. Copper content of foods. Factors affecting reported values. *Journal of the American Dietetic Association* (1973); 63: 143–153.
- Peper, R; Campbell, N; Yaqoob, M.M; Roberts, N.B; Fan S.L-S. Do oral aluminium phosphate binders cause accumulation of aluminium to toxic levels? *BMC Nephrology*, (2011); 12:55.
- Pepersack, T; Rotsaert, P; Benoit, F; Willems, D; Fuss, M; Bourdoux, P; Duchateau, J. Prevalence of zinc deficiency and its clinical relevance among hospitalized elderly. *Archives of Gerontology and Geriatrics* (2001); 33: 243-53.

- Perez, G; Garbossa, G; Sasseti, B; Di Risio, C; Nesse, A. Interference of aluminum on iron metabolism in erythroleukaemia K562 cells. *Journal of Inorganic Biochemistry* (1999); 76: 105-112.
- Philipp, A; Kralisch, S; Bachmann, A; Lossner, U; Kratzsch, J; Blüher, M; Stumvoll, M; Fasshauer, M. Serum levels of the adipokine zinc- α 2-glycoprotein are increased in chronic hemodialysis. *Metabolism Clinical and Experimental* (2011); 60: 669-672.
- Picciano, MF; Guthrie, HA. Copper, Iron and Zinc in mature human milk. *American Journal of Clinical Nutrition* (1976); 29: 242.
- Planells, E; Sánchez, C; Montellano, MA; Mataix, J; Llopis, J. Vitamin B₆ and B₁₂ and folate status in an adult mediterranean population. *European Journal of Clinical Nutrition* (2003); 57: 777-85.
- Poole, RL; Schiff, L; Hintz, SR; Wong, A; Mackenzie, N; Kerner, JA. Aluminium content of parenteral nutrition in neonates: measured versus calculated levels. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* (2010); 50: 208–211.
- Poppe, W; Baklok, W. Avances en evaluación de métodos y aparatos en el laboratorio clínico. *Química Clínica* (1989); 8: 71-92.
- Powel, JJ; Thompson, RPH. The chemistry of aluminum in the gastrointestinal lumen and its uptake and absorption. *Proceedings of the Nutrition Society* (1993); 52: 241–253.
- Prasad, AS. Clinical spectrum and diagnostic aspects of human zinc deficiency. In: *Essential and toxic trace elements in human health and disease* (Prasad AS, ed.). New York: Alan R. Liss (1988); 3-53.
- Prasad, AS. Zinc in growth and development and spectrum of human zinc deficiency. *Journal of the American College of Nutrition* (1988); 7: 377-384.
- Prasad, AS. Discovery of human zinc deficiency and studies in an experimental human model. *American Journal of Clinical Nutrition* (1991); 53: 403-412.
- Pritchard, DL; Penney, N; McLaughlin, MJ; Rigby, H; Schwarz, K. Land application of sewage sludge (biosolids) in Australia: risks to the environment and food crops. *Water Science and Technology* (2010); 62: 48–57.

- Propst, A; Propst, T; Feichtinger, H; Judmaier, G; Willeit, J; Vogel, W. Copper-induced acute rhabdomyolysis in Wilson's disease. *Gastroenterology* (1995); 108: 885-887.
- Rae, TD; Schmidt, PJ; Pufahl, RA; Culotta, VC; O'Halloran, TV. Undetectable intracellular free copper: The requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science* (1999); 284: 805-8.
- Ranaldi, G; Perozzi, G; Truong-Tran, A; Zalewski, P; Murgia, C. Intracellular distribution of labile Zn (II) and zinc transporter expression in kidney and MDCK cells. *The American Journal of Physiology* (2002); 283: F1365-F1375.
- Ranau, R; Oehlenschlanger, J; Steinhart, H. Aluminium levels of fish fillets baked and grilled in aluminium foil. *Food Chemistry* (2001); 73 (1): 1-6.
- Rashidi, AA; Salehi, M; Piroozmand, A; Sagheb, MM. Effects of zinc supplementation on serum zinc and C-reactive protein concentrations in hemodialysis patients. *Journal of Renal Nutrition* (2009); 19: 475-478.
- Rayman, MP; Pattison, DJ. Dietary manipulation in musculoskeletal conditions. *Best Practice and Research Clinical Rheumatology* (2008); 22: 535-61.
- Reyes-Castañeda, P. Bioestadística Aplicada. Ed. Trillas, México (1980).
- Ribeiro, RC; Sales, VS; Neves, F de A; Draibe, S; Brandao-Neto, J. Effects of zinc on cell-mediated immunity in chronic hemodialysis patients. *Biological Trace Element Research* (2004); 98: 209-217.
- Rink, L; Gabriel, P: Zinc and the immune system. *Proceedings of the Nutrition Society* (2000); 59: 541-552.
- Robertson WO. Chronic poisoning: Trace metal and others. In: *Cecil's Textbook of Medicine*. Goldman L, Bennett JC (eds.) W.B Saunders Co. (2000); 70-2.
- Rodriguez, A; Soto, G; Torres, S; Venegas, G; Castillo-Duran, C. Zinc and Copper in hair and plasma of children with chronic diarrhea. *Acta Paediatrica* (1985); 74: 770.
- Rossi, L; Squitti, R; Calabrese, L; Rotilio, G; Rossini, PM. Alteration of peripheral markers of copper homeostasis in Alzheimer's disease patients:

implications in aetiology and therapy. *The Journal of Nutrition, Health and Aging* (2007); 11: 242-248.

- Rucker, D; Thadhani, R; Tonelli, M. Trace Element Status in Hemodialysis Patients. *Seminars in Dialysis*. (2010); 23 (4): 389-395.
- Sahin, H; Uyanik, F; Inanc, N; Erdem, O. Serum Zinc, Plasma Ghrelin, Leptin Levels, Selected Biochemical Parameters and Nutritional Status in Malnourished Hemodialysis Patients. *Biological Trace Element Research* (2009); 127: 191-199.
- Saiyed, SM; Yokel, RA. Aluminium content of some foods and food products in the USA, with aluminium food additives. *Food Additives and Contaminants* (2005); 22(3): 234–244.
- Salgueiro, MJ; Zubillaga, M; Lysionek, A; Sarabia, MI; Caro, R; De Paoli, T. Zinc as an essential micronutrient: a review. *Nutrition Research* (2000); 20: 737-755.
- Sánchez, C; López-Jurado, M; Aranda, P; Llopis, J. Plasma levels of copper, manganese and selenium in an adult population in southern Spain: Influence of age, obesity and lifestyle factors. *Science of the Total Environment* (2010); 408: 1014–1020.
- Sandstead, HH. Availability of zinc and its requirement in human subjects. In: *Clinical, biochemical and nutritional aspects of trace elements* (Prasad AS, ed.). New York: Alan R. Liss (1982); 83-101.
- Saracoglu, S; Saygi, KO; Uluozlu, OD; Tuzen, M; Soylok, M. Determination of trace element content of baby foods from Turkey. *Food Chemistry* (2007); 105: 280–285.
- Sauberlich, HE. Laboratory tests for the assessment of nutritional status. Boca Negra, Fl. *CRC Press* (1999); 313.
- Savory, J; Wills, MR. Trace metals: Essential Nutrients or toxins. *Clinical Chemistry* (1992); 38: 1565-1573.
- Scancar, J; Stibilj, V; Miacic, R. Determination of aluminum in Slovenian foodstuffs and its leachability from aluminum cookware. *Food Chemistry* (2004); 85:151–157.

- Scheinberg, IH; Sternlieb, I. Wilson disease and idiopathic copper toxicosis. *American Journal of Clinical Nutrition* (1996); 63: 842S–55S.
- Scientific Committee on Food: SCF, 2006. Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. Tolerable upper intake levels for vitamins and minerals. Retrieved February 2006, from <http://www.efsa.europa.eu/en/ndatopics/docs/ndatolerableuil.pdf>.
- Serra-Manjem, L; Ribas, L; Tresserras, R; Ngo, J; Salleras, L. How could changes in diet explain changes in coronary heart disease mortality in Spain? The Spanish paradox- *American Journal of Clinical Nutrition* (1995), 61: 51351-9 Suppl.
- Seymour, CA; Howell, JM; Gawthorne, JM (Eds). Copper in Animals and Man. *CRC Press*. Boca Raton, FL (1987).
- Shah, BG. Chelating agents and bioavailability of minerals. *Nutrition Research* (1981); 1: 617-622.
- Shankar, AH; Prasad, AS: Zinc and immune function: the biological basis of altered resistance to infection. *American Journal of Clinical Nutrition* (1998); 68 (2): 447S-463S.
- Shrimpton, R; Gross, R; Hill, I; Young, M: Zinc deficiency: what are the most appropriate interventions? *British Medical Journal* (2005); 330: 347-349.
- Shuman, LM. Micronutrient fertilizers. *Journal of Crop Production* (1998); 1: 165–195.
- Snedeker, M; Smith, SA; Greger, JL. Effect of dietary calcium and phosphorus levels on the utilization of iron, copper, and zinc by adult males. *Journal of Nutrition* (1982); 112: 136–143.
- Sondheimer, JH; Mahajan, SK; Centeno, DL. Elevated plasma copper in chronic renal failure. *American Journal of Clinical Nutrition* (1988); 47: 896–899.
- Soni, MG; White, SM; Flamm, WG; Burdock, GA. Safety evaluation of dietary aluminum. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* (2001); 33 (1): 66–79.
- Spada, PL; Rossi, C; Alimonti, A; Bocca, B; Ricerca, BM; Bocci, MG; Myrtò Carvelli; Vulpio, C; Luciani, G; De Sole, P. Iron, Zinc and Aluminium Ferritin Content of Hemodialysis Hyperferritinemic Patients: Comparison With Other

Hyperferritinemic Clinical Conditions and Normoferritinemic Blood Donors. *Clinical Biochemistry* (2009); 42: 1654-1657.

- Stefanidou, M; Maravelias, C; Dona, A; Spiliopoulou, C. Zinc: a multipurpose trace element. *Archives of Toxicology* (2006); 80: 1–9.
- Stein, RS; Jenkins, D; Korn, ME. Death after use of cupric sulphate as emetic. *JAMA* (1976); 235: 801.
- Storelli, M; Barone, M; Garofalo, G; Marcotrigiano, GO. Metals and organochlorine compounds in eel (*Anguilla anguilla*) from the Lesina lagoon, Adriatic Sea (Italy). *Food Chemistry* (2007); 100: 1337-41.
- Strause, LG; Hegenauer, J; Saltman, P; Cone, R; Resnick, D. Effects of long-term dietary manganese and copper deficiency on rat skeleton. *Journal of Nutrition* (1986); 116: 135-141.
- Sturniolo, GC; Mestriner, C; Irato, P; Albergoni, V; Longo, G; D'Inca, R. Zinc therapy increases duodenal concentration of Metallothionein and Iron in Wilson's disease patients. *The American Journal of Gastroenterology*. (1999); 94: 334.
- Sun, H; Hu, Ch; Jia, L; Zhu, Y; Zhao, H; Shao, B; Wang, N; Zhang, Z; Yanfei L. Effects of Aluminum Exposure on Serum Sex Hormones and Androgen Receptor Expression in Male Rats. *Biological Trace Element Research* (2011); 144: 1050–1058.
- Szeto, YT; Timothy, CY; Kowk, TCY y col. Effects of a long-term vegetarian diet on biomarkers of antioxidant status and cardiovascular disease risk. *Nutrition* (2004); 20: 863–866.
- Takagi, K; Masuda, K; Yamazaki, M. Metal ion and vitamin adsorption profiles of phosphate binder ionexchange resins. *Clinical Nephrology* (2010); 73: 30–35.
- Takeda, T; Yukioka, T; Shimazaki, S. Cupric sulfate intoxication with rhabdomyolysis, treated with chelating agents and blood purification. *Internal Medicine* (2000); 39: 253-5.
- Taki, K; Takayama, F; Tsuruta, Y; y col. Oxidative stress, advanced glycation end product, and coronary artery calcification in hemodialysis patients. *Kidney International* (2006); 70 (1): 218-224.

- Tapiero, H; Tew, KD. Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. *Biomedicine and Pharmacotherapy* (2003); 57: 399–411.
- Tapiero, H; Townsend, DM; Tew, KD. Trace elements in human physiology and pathology. Copper. *Biomedicine and Pharmacotherapy* (2003); 57: 386–398.
- Tennant, J; Stansfield, M; Yamaji, S; Srai, SK; Sharp, P. Effects of copper on the expression of metal transporters in human intestinal Caco-2 cells. *FEBS Letters* (2002); 11: 239-244.
- Thacher, TD; Fischer, PR; Strand, MA; Pettifor, JM. Nutritional rickets around the world: causes and future directions. *Annals of Tropical Paediatrics* (2006); 26: 1–16.
- Tompsett, SL. Factors affecting the absorption of iron and copper from the alimentary tract. *Biochemistry* (1940); 34: 961–969.
- Tonelli, M; Wiebe, N; Hemmelgarn, B; Klarenbach, S; Field, C; Manns, B; Thadhani, R; Gill, J. Trace elements in hemodialysis patients: a systematic review and meta-analysis. *BMC Medicine* (2009); 7: 25.
- Trapp, JA; Cannon, JB. Aluminum pots as a source of dietary aluminum. *The New England Journal of Medicine* (1981); 304(3): 172–173.
- Tumlund, JR; Keyes, WR; Anderson, HL; Acord, LL. Copper absorption and retention in young men at three levels of dietary copper by use of the stable isotope ⁶⁵Cu. *American Journal of Clinical Nutrition* (1989); 49: 870-8.
- Tumlund, JR; Keen, CL; Smith, RG. Copper status and urinary and salivary copper in young men at three levels of dietary copper. *American Journal of Clinical Nutrition* (1990); 51: 658–64.
- Uauy, R; Olivares, M; Gonzalez, M. Essentiality of copper in humans. *American Journal of Clinical Nutrition* (1998); 67: 952S-9S.
- United States Department of Agriculture Nutrition Monitoring in the United States. A progress report from the Joint Nutrition Monitorin Evaluation Committee. Hyattsville, MD: United States Department of Agriculture (1986); DHHS publ no 1255.

- Van den Berg, GJ; McArdle, HJ. A plasma membrane NADH oxidase is involved in copper uptake by plasma membrane vesicles isolated from rat liver. *Biochimica et Biophysica Acta* 1195 (1994); 276.
- Van Reen, R. Effects of excessive dietary zinc in the rat and the interrelationship with copper. *Archives of Biochemistry and Biophysics* (1953); 46: 337.
- Vanholder, R; Cornelis, R; Dhondt, A; Lameire, N. The role of trace elements in uraemic toxicity. *Nephrology Dialysis Transplantation* (2002); 17(2): 2-8.
- Vanholder, R; Cornelis, R; Dhondt, A; Lameire, N. Trace element metabolism in renal disease. In: Kopple JD, Massry SG (eds). *Nutritional Management of Renal Disease*, 2nd edn. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins (2004); 299–313.
- Vecchi, S; Bufali, S; Skibinski, D; O'Hagan, D; Singh, M. Aluminum Adjuvant Dose Guidelines in Vaccine Formulation for Preclinical Evaluations. *Journal of Pharmaceutical Sciences* (2012); 101 (1): 17-20.
- Veighey, K; Booth, J; Davenport, A. Does the choice of phosphate binder affect trace element levels in chronic kidney disease patients treated by regular haemodialysis? *Nephrology Dialysis Transplantation* (2011); 26: 1006–1010.
- Verissimo, MI; Oliveira, JABP; Gomes, MT. Leaching of aluminium from cooking pans and food containers. *Sensors and Actuators B: Chemical* (2006); 118: 192–197.
- Vonk, WIM; Klomp, LWJ. Role of transition metals in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochemical Society Transactions* (2008); 36: 1322-1328.
- Vuori, E. Intake of copper, iron manganese and zinc by healthy, exclusively-breast-fed infants during the first 3 months of life. *British Journal of Nutrition* (1979); 42: 407.
- Vuori, E; Kuitunen, P. The concentrations of copper and zinc in human milk. *Acta Paediatrica*. (1979); 68: 33-37.
- Waggoner, DJ; Bartnikas, TB; Gitlin, JD. The role of copper in neurodegenerative disease. *Neurobiology of Disease* (1999); 6: 221-30.

- Walton, JR. Aluminium in hippocampal neurons from humans with Alzheimer's disease, *Neurotoxicology* (2006); 27: 385-394.
- Walton, JR. Aluminum Disruption of Calcium Homeostasis and Signal Transduction Resembles Change that Occurs in Aging and Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease* (2012); 29: 255–273.
- Wapnir, RA. Copper absorption and bioavailability. *The American Journal of Clinical Nutrition* (1998); 67: 1054–1060.
- Ward, JD; Spears, JW. Long-term effects of consumption of low-copper diets with or without supplemental molybdenum on copper status, performance, and carcass characteristics of cattle. *Journal of Animal Science* (1997); 75: 3057-3065.
- Ward, RA; Mcleish, KR. Oxidant stress in hemodialysis patients: What are the determining factors? *Artificial Organs* (2003); 27 (3): 230-236.
- Ward, RJ; Zhang, Y; Crichton, RR. Aluminium toxicity and iron homeostasis. *Journal of Inorganic Biochemistry* (2001); 87: 9-14.
- Weast, RC (Ed.) Handbook of Chemistry and Physics, Chemical Rubber Co, Cleveland (1970).
- Welch, RM; Graham, RD. Breeding crops for enhanced micronutrient content. *Plant and Soil* (2002); 245: 205–214.
- Welch, RM; Graham, RD. Breeding for micronutrients in staple food crops from a human nutrition perspective. *Journal of Experimental Botany* (2004); 55: 353–364.
- Welch, RM; Graham, RD. Agriculture: the real nexus for enhancing bioavailable micronutrients in food crops. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* (2005); 18: 299–307.
- Welsh, SO; Marston, RM. Trends in levels of zinc in the United States food supply, 1909-1981. In: *Bioavailability of zinc* (Inglett GE, ed). ACS Symposium Series 210, Washington: American Chemical Society, (1983); 15.
- Welsh, SO; Marston, RM. Zinc levels of the US food supply 1909-1980. *Food Technology* (1982); 36: 70-76.

- Weng, C; Huang, W; Yu, C; Chang, C; Yang, C. Serum aluminum level correlates with arterial stiffness in haemodialysis patients. *The international journal of clinical practice* (2009); 63 (2): 249-253.
- White, PJ. Ion transport. In: Thomas B, Murphy DJ, Murray BG, eds. *Encyclopaedia of applied plant sciences*. London, UK: Academic Press (2003); 625–634.
- White, PJ; Broadley, MR. Biofortifying crops with essential mineral elements. *Trends in Plant Science* (2005); 10: 586–593.
- White, PJ; Broadley, MR. Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets – iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. *New Phytologist* (2009); 182: 49–84.
- WHO. Aluminium in drinking-water: Background document for development of WHO guidelines for drinking-water quality. Geneva: World Health Organization (2003).
- WHO. Evaluation of certain food additives and contaminants: sixty-seventh report of the Joint FAO/ WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series 940. Geneva: World Health Organization (2007).
- Williams, DM. Copper deficiency in humans. *Seminars in Hematology* (1983); 20: 118–28.
- Williams, RJP. Aluminium and biological systems: an introduction. *Coordination Chemistry Reviews* (1996); 149: 1–9.
- Wilson, RW. Aluminum. Homeostasis and Toxicology of Non-Essential Metals (2011); 32, Part.B: 67–123.
- Wirth, PL; Linder, MC. Distribution of copper among components of human-serum. *Journal of the National Cancer Institute* (1985); 75: 277-284.
- Wonga, WK.; Chungb, SWC; Kwongb, KP; Hoa YY; Xiaoac, Y. Dietary exposure to aluminium of the Hong Kong population Waiky. *Food Additives and Contaminants* (2010); 27 (4): 457–463.
- Wonk, WIM; Klomp, LWJ. Role of transition metals in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochemical Society Transactions* (2008); 36:1322-8.

- World Health Organization, Guidelines for Drinking-Water Quality. Incorporating First Addendum. Recommendations 3rd ed. Geneva (2008); Vol 1.
- Wu, FY-H; Wu, C-W. Zinc in DNA replication and transcription. *Annual Review of Nutrition* (1987); 7: 251-272.
- Wu, X; Li, J; Hu, JN; Deng, ZY. The Effects of Glutamate and Citrate on Absorption and Distribution of Aluminum in Rats. *Biological Trace Element Research* (2012); 148: 83–90.
- Yang, Q; Penninckx, W; Smeyers-Verbeke, J. Closed- vessel microwave acid digestion of foodstuffs and trace aluminium determination by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (1994); 42: 1948–1953.
- Yates, L; Soffer, O; Gropper, SS. Phosphate Binders Do Not Compromise the Copper Status of Adult Renal Disease Patients on Hemodialysis. *Biological Trace Element Research* (2000); 76: 1-12.
- Yilmaz, ME; Kiraz, M; Kara, IH. The evaluation of serum zinc and copper levels in hemodialysis patients in southeast Turkey. *Dialysis Transplant* (2000); 29: 718.
- Yokel, RA. The toxicology of aluminium in the brain: a review. *Neurotoxicology* (2000); 21: 813–828.
- Zand, N; Chowdhry, BZ; Wray, DS; Pullen, FS; Snowden, MJ. Elemental content of commercial 'ready to-feed' poultry and fish based infant foods in the UK. *Food Chemistry* (2012); 135: 2796–2801.
- Zhang, LC; Li, XW; Gu, QY; Zhu, YZ; Zhao, HS; Li, YF; Zhang, ZG. Effects of subchronic aluminum exposure on serum concentrations of iron and iron-associated proteins in rats. *Biological Trace Element Research* (2010); doi: 10.1007/s12011-010-8725-y.
- Zhou, DM; Hao, XZ; Wang, YJ; Dong, YH; Cang, L. Copper and Zn uptake by radish and pakchoi as affected by application of livestock and poultry manures. *Chemosphere* (2005); 59: 167–175.
- Zhu, YZ; Zhao, HS; Li, XW; Zhang, LC; Hu, CW; Shao, B; Sun, H; Bah, AA; Li, YF; Zhang, ZG. Effects of subchronic aluminum exposure on the immune

function of erythrocytes in rats. *Biological Trace Element Research* (2011); doi: 10.1007/s12011-011-8964-6.

- Zima, T; Mestek, O; Nemecek, M. Trace elements in hemodialysis and continuous ambulatory peritoneal dialysis patients, *Blood Purification* (1988); 16, 253–260.

8.- ANEXOS