

Evaluación de cobre y cinc en suero sanguíneo de pacientes diabéticos con y sin pie diabético

Evaluation of copper and zinc in blood serum of diabetic patients with and without diabetic foot

Blanca Irene Semprún de Villasmil^{*1}, María Fernanda Gómez², Kelys Milenis Hernández², Kenna Ferrer², Engelbert León² y Víctor Alberto Granadillo³

¹Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Técnica de Manabí, Ecuador.

²Departamento de Química, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina. Universidad del Zulia.

³Laboratorio de Instrumentación Analítica (LIA) Departamento de Química, Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia.

*bsemprun@utm.edu.ec

Artículo original

Recibido: 05-09-2018

Aceptado: 14-12-2018

Resumen

Los micronutrientes, cobre (Cu) y cinc (Zn) cumplen funciones indispensables para el desarrollo y crecimiento celular. Por tal razón, este trabajo presenta la evaluación de los niveles séricos de Cu y Zn de pacientes diabéticos con y sin pie diabético (DPD y DSPD) con edades comprendidas entre 55 y 75 años, empleando la espectrometría de absorción atómica con llama. Las muestras, una vez extraídas, se trasvasaron a tubos de polipropileno sin anticoagulante, se separaron por centrifugación para la obtención del suero y se almacenaron a 4 °C hasta su análisis. Para la determinación espectrométrica de Cu y Zn, las muestras se diluyeron con agua desionizada (2x). Las concentraciones medias de Cu y Zn para los DPD fueron de 1,017 y 1,134 mg/L para Cu; y de 1,009 y 0,907 mg/L para Zn, mientras que en DSPD fueron de 1,094 y 0,970 mg/L para Cu; y de 0,661 y 0,807 mg/L para Zn, en mujeres y hombres, respectivamente, sin que existieran diferencias ($p>0,05$) en las concentraciones de Cu y Zn entre los DPD y DSPD, encontrándose diferencias significativas ($p\leq 0,05$) en las concentraciones de Zn en mujeres DSPD. En consecuencia, se puede concluir que los niveles de Cu y Zn están en concentraciones adecuadas para ambos grupos, lo que permite inferir que el metabolismo de estos oligoelementos se encuentra en equilibrio en los pacientes DPD y DSPD, debido a la adecuada ingesta de dichos minerales diariamente.

Palabras clave: Espectrometría de absorción atómica con llama, Cu, Zn, pie diabético, diabetes mellitus.

Abstract

Copper and zinc micronutrients fulfill essential functions for cell growth and development. For this reason, this paper presents the evaluation of serum levels of Cu and Zn of diabetic patients with and without diabetic foot (DPD and DSPD) aged between 55 and 75 years, using flame atomic absorption spectrometry. Once the samples were extracted, were transferred to polypropylene tubes without anticoagulant, which were separated by centrifugation to obtain the serum, and stored at 4°C until their analysis. For the spectrometric determination of Cu and Zn the samples were diluted with deionized water (2x). The mean concentrations of Cu and Zn for the DPD groups was 1.017mg/L; 1,134mg/L for copper; and 1.009mg/L; 0.907mg/L for Zn and the DSPD group was 1.094mg/L;

0.970mg/L for copper; and 0.661mg/L; 0.807mg/L for Zn, in women and men respectively, so there is no significant difference ($p>0.05$) in the Cu and Zn concentrations at DPD and DSPD, finding significant differences ($p\leq 0.05$) in Zn's concentrations in women DSPD. Consequently, it can be concluded that Cu and Zn levels are in adequate concentrations for both groups. This allows to infer that metabolism of these trace elements is in equilibrium in the DPD and DSPD patients, due to the adequate intake of these minerals daily.

Keywords: Atomic absorption spectrometry flame, copper, zinc, diabetic foot, diabetes mellitus.

Introducción

La diabetes mellitus (DM) es un estado clínico grave causante de una tasa elevada de morbilidad y mortalidad a nivel mundial que limita las expectativas de vida del hombre¹. Se caracteriza por un aumento de los niveles de glucosa en sangre², originados por un defecto en la secreción de insulina por parte de las células β en el páncreas (islotos de Langerhans), por una alteración en el receptor de insulina o anomalías a nivel post-receptor en las células blanco de los diferentes tejidos donde esta actúa^{3,4}.

Las manifestaciones clínicas típicas de la DM-2 son: polifagia, polidipsia y poliuria, junto con un estado de astenia permanente. También existen otras complicaciones habituales como: las microangiopatías (retinopatía, nefropatía y neuropatía periférica) y macroangiopatías (coronariopatía y vasculopatía periférica)⁵. Otra complicación crónica es la pérdida sensorial del sistema sensitivo-motor y autónomo. Todos estos aspectos clínicos conllevan al paciente a la afección conocida como pie diabético (PD), en el cual el individuo en general, puede desarrollar ulceraciones que por ella baja el flujo de la circulación sanguínea y que, junto a la debilidad del sistema inmunológico, pueden conllevar a la pérdida de algún miembro inferior^{6,7}.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el pie diabético es una infección, ulceración y destrucción de los tejidos profundos de la extremidad inferior, asociada con alteraciones neurológicas y diversos grados de enfermedad vascular periférica^{7,8}. Además, existen estudios que han demostrado que esta patología conlleva a alteraciones del metabolismo de ciertos minerales encontrados en cantidades trazas en la sangre; tales como el Cu y el Zn^{9,10}.

El Cu, es un oligoelemento esencial para los seres humanos y animales, se encuentra en casi todas las células del organismo con mayor concentración en huesos y músculo esquelético (50 y 25 %), un 15 % en piel, médula ósea e hígado y un 8 % en el cerebro, considerado como un componente funcional de varias enzimas que poseen actividad de óxido-reducción, la lisil 6-oxidasa que ayuda a mantener la integridad y elasticidad del tejido conectivo, corazón y vasos sanguíneos, además de tener un papel importante en la formación de los huesos, la ceruloplasmina y la superóxido dismutasa I^{11,12}, forma parte de los factores de transcripción genética e interviene en el mantenimiento de la integridad del sistema inmune y regeneración de la piel¹³.

Por otra parte, el Zn, juega un papel esencial en el sistema inmunológico, modulando la susceptibilidad a las infecciones bacterianas, virales y micóticas. Es importante para el desarrollo corporal normal, participa como regulador de la apoptosis y tiene actividad antioxidante¹¹. Además, interviene en el metabolismo del retinol, proteínas y glúcidos, así como en la biosíntesis, liberación y acción de la insulina^{12,13}.

La deficiencia de estos elementos trazas conllevan a una supresión de la inmunidad y a su vez incrementan la susceptibilidad a las infecciones^{4,15}. Varios estudios¹⁶⁻¹⁸, han encontrado alteraciones de las concentraciones de Cu y Zn en pacientes con DM, que han sido correlacionadas con la presencia de complicaciones diabéticas (e.g. pie diabético). En el

contexto regional, alrededor del 80 % de la población padece de DM-2^{19,20}, que, en mucho de los casos, se manifiestan con complicaciones clínicas severas a causa de la susceptibilidad que ellos padecen a procesos sépticos (e.g. pie diabético). Las complicaciones de las úlceras del pie son la causa principal de hospitalización y amputación en los pacientes diabéticos.

Por la importancia clínica de estos oligoelementos en el organismo humano, es imprescindible evaluar los niveles de Cu y Zn en suero sanguíneo de pacientes diabéticos con y sin pie diabético, debido al rol que desempeña estos minerales en la fisiopatología de la diabetes mellitus¹⁵.

Metodología

Para la determinación analítica de Cu y Zn en suero sanguíneo humano en pacientes diabético con y sin pie diabético, se utilizó un espectrofotómetro de absorción atómica en el modo de llama (Marca Perkin-Elmer, modelo 2380, USA, como fuente de radiación se emplearon lámparas de cátodo hueco (HCL, de sus siglas en inglés: "*Hollow Cathode Lamp*") específicas para los metales Cu (Marca Perkin-Elmer, modelo 2884, USA) y para Zn (Marca Perkin-Elmer, modelo 2136, USA). Los parámetros operacionales empleados para la determinación analítica de cada metal se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Parámetros operacionales para la determinación de Cu y Zn*.

Metales	Longitud de onda (nm)	Banda espectral (nm)	Gas de la llama	Temperatura de llama (°C)	Patrón de sensibilidad (mg/L)	Modo
Cu	324,8	0,7	Aire-C ₂ H ₂	2.100-2.400	4	AA
Zn	213,9	0,7	Aire-C ₂ H ₂	2.100-2.400	0,8	AA

C₂H₂: Acetileno AA: Absorción Atómica

*Fuente: Manual del espectrofotómetro de absorción atómica con llama Perkin-Elmer modelo 2380.

Para la separación del suero sanguíneo del paquete celular se utilizó una centrífuga DINAC, Clay Adams, modelo 101. Los volúmenes para la preparación de las disoluciones y muestras se midieron con micropipetas automáticas Gilson (*Pipetman*), modelos P-20, P-100, P-200, P-1000 y P-5000, usando puntillas de polipropileno de grado premium. Además, se empleó material volumétrico de plástico y vidrio de alta precisión tipo A.

Las disoluciones concentradas de Cu y Zn (ca. 100 mg/L) se prepararon a partir de sus sales de sulfato de cobre pentahidratado (CuSO₄·5H₂O, *Fischer Scientific, Company USA*) y nitrato de Zn hexahidratado (Zn(NO₃)₂·6 H₂O, *Riedel de Haën*); en ácido nítrico 1 mol/L (HNO₃, *Fischer Scientific, Company USA*). Las disoluciones estándares de las curvas de calibración se prepararon diariamente por dilución directa de la solución concentrada de cada metal en una matriz con ácido nítrico de 1 mol/L. Todas las disoluciones se aforaron con agua desionizada grado I ASTM (según la *American Society for Testing and Materials*)²¹.

Se obtuvieron muestras de 10 mL de sangre completa por venopunción en mujeres y hombres mayores de 18 años, seleccionados de forma aleatoria, los cuales manifestaron por escrito su consentimiento en participar en este estudio, y un comité *Ad-honorem* que vigiló que se cumpliera los principios éticos y deontológicos. Un total de 36 pacientes diabéticos (n=36); 7 hombres y 7 mujeres con pie diabético (n=14) y 22 diabéticos controles (n=22), que acudieron a la Unidad Cardio-Metabólica "Dr. Roberto Gutiérrez" del Municipio Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela.

Las muestras de sangre completa obtenidas después de formado el coágulo, se centrifugaron a 1500 rpm por 20 min y luego se separó el suero sanguíneo del paquete celular, y se colocó en un tubo limpio. Para el análisis espectrofotométrico, las muestras se diluyeron 2X en agua desionizada. Cada porción de prueba se preparó por triplicado y las lecturas de absorbancia se registraron también por triplicado.

Métodos analíticos

Para la determinación analítica de las concentraciones de Cu y Zn, se elaboraron curvas de calibración mediante la preparación de disoluciones concentradas (100 mg/L) a partir de su sal específica, en una matriz de ácido nítrico (1 mol/L)²¹. Los patrones acuosos para la preparación de la curva de calibración se prepararon diariamente previo a la determinación espectrométrica del metal y, posteriormente, se graficó la señal de absorbancia (A) versus la concentración de cada uno²².

Análisis estadísticos

Para verificar si existen diferencias significativas entre las concentraciones de Cu y Zn en las muestras de suero sanguíneo de pacientes DPD y DC, se realizó una comparación de medias experimentales a través de la prueba estadística denominada; contraste t^{23} . En este caso se tienen dos medias muestrales ($\bar{X}_1 - \bar{X}_2$). Se planteó como hipótesis nula (H_0): que los dos grupos presentan las mismas concentraciones de Cu y Zn, es decir, $H_0 = \mu_1 = \mu_2$, se necesita probar si $\bar{X}_1 - \bar{X}_2$ difiere significativamente de cero. Para contrastar $H_0 = \mu_1 = \mu_2$ cuando no se puede suponer que las dos muestras proceden de poblaciones con desviaciones estándar iguales, se calculó el estadístico t^{23} .

Resultados y discusión

La Tabla 2, muestra las figuras analíticas de mérito de los métodos analíticos empleados para la determinación de Cu y Zn en suero sanguíneo de pacientes con pie diabético y sin pie diabético, la cual indica bajos límites de detección y cuantificación y una adecuada precisión, por lo que resulta apropiado para la determinación de Cu y Zn en suero sanguíneo de DPD y DSPD²⁴.

Tabla 2. Figuras analíticas de mérito de los métodos analíticos empleados para la determinación de Cu y Zn en suero sanguíneo de pacientes con y sin pie diabético.

Metal	Curva de calibración ^a	Coefficiente de correlación	Rango Linear (mg L ⁻¹)	L _D ^b mg/L	L _C ^c mg/L	Exactitud (%)	Precisión ^d (DER%)
Cu	$Y=0,0581X + 0,0003$	0,9999	0,005-4,0	0,0237	0,0790	98,78	0,001-2,083
Zn	$Y= 0,3965X + 0,0029$	0,9997	0,005-0,8	0,004	0,0144	98,63	0,36- 0,65

^aX y Y son la concentración del metal (mg L⁻¹) y la absorbancia integrada, respectivamente

^bLímite de detección, definido como tres veces la desviación estándar del blanco.

^cLímite de cuantificación, definido como diez veces la desviación estándar del blanco.

^dPromedio de la DER, para muestras reales. Las muestras se prepararon por triplicado y leídas por pentaplicado

En la Tabla 3 se presentan las concentraciones de Cu en suero sanguíneo humano de pacientes DPD y DSPD, en los cuales se observa que, para los dos grupos en el género femenino, se presentaron concentraciones (media \pm DE) de $1,017 \pm 0,198$ y $1,094 \pm 0,258$, respectivamente.

Al calcular el estadístico t se obtuvo que el valor experimental de t_c (0,71), fue menor que el valor tabulado t_t (2,14), por lo tanto, no se rechazó la hipótesis nula y se concluyó que no existió diferencia significativa ($p>0,05$) en los niveles de Cu en DPD y DSPD para las

mujeres. Para el género masculino se observa que los dos grupos (DPD y DSPD) presentaron concentraciones (media \pm DE) de $1,134 \pm 0,363$ mg/L y $0,970 \pm 0,131$ mg/L, respectivamente. Al aplicar la prueba estadística t se tuvo que el valor experimental de t_c (1,26), fue menor que el valor tabulado t_t (2,36), por lo tanto, no se rechaza la hipótesis nula y se concluyó que no existió diferencia significativa ($p>0,05$) en los niveles de Cu en los hombres de ambos grupos.

Tabla 3. Niveles de Cu en suero sanguíneo de pacientes con y sin pie diabético

Diabéticos con pie diabético				Diabéticos sin pie diabético		
Género	Muestras	Promedio (mg/L)	Desviación estándar	Muestras	Promedio (mg/L)	Desviación estándar
Femenino	7	1,017	0,198	11	1,094	0,258
Masculino	7	1,134	0,363	11	0,970	0,131

Intervalo experimental para DPD: 0,846-1,921 mg/L

Intervalo experimental para DSPD: 0,844-1,298 mg/L

En la Tabla 4 se presentan las concentraciones de Zn en suero sanguíneo humano de pacientes DPD y DSPD. Se observa que, en los dos grupos, el género femenino presentó concentraciones (media \pm DE) de $1,009 \pm 0,300$ mg/L y $0,661 \pm 0,245$ mg/L, respectivamente. Al aplicar la prueba estadística t para dos medias experimentales se obtuvo que el valor experimental de t_c (2,63), fue mayor que el valor tabulado t_t (2,23), por lo tanto, se rechazó la hipótesis nula y se concluyó que existió diferencia significativa ($p<0,05$) en los niveles de Zn en mujeres DPD y DSPD. Entre tanto, para el género masculino se observó que, los dos grupos (DPD y DSPD) presentaron concentraciones (media \pm DE) de $0,907 \pm 0,302$ mg/L y $0,807 \pm 0,392$ mg/L, respectivamente. Al aplicar la prueba estadística t se obtuvo que el valor experimental de t_c (0,62), fue menor que el valor teórico o tabulado t_t (2,14), por lo tanto, no se rechazó la hipótesis nula y se concluyó que no existieron diferencias significativas ($p>0,05$) en los niveles de Zn en hombres DPD y DSPD.

Tabla 4. Niveles de Zn en suero sanguíneo de pacientes con pie y sin pie diabético.

Diabéticos con pie diabéticos				Diabéticos sin pie diabético		
Género	Muestras	Promedio (mg/L)	Desviación estándar	Muestras	Promedio (mg/L)	Desviación estándar
Femenino	7	1,009	0,300	11	0,661	0,245
Masculino	7	0,907	0,302	11	0,807	0,392

Intervalo experimental para DPD: 0,411-1,415 mg/L

Intervalo experimental para DSPD: 0,331-1,700 mg/L

Varios estudios^{2,13,25,26}, han demostrado que los pacientes con DM presentan un sistema inmunológico deficiente, además de alteraciones o trastornos en el metabolismo de los carbohidratos y lípidos. Estos trastornos metabólicos conllevan a una disminución o alteración en las concentraciones de metales trazas (eg. Cu y Zn) los cuales actúan como co-factores de numerosas enzimas en diversas vías metabólicas, en especial aquellas que determinan la funcionalidad de las células pancreáticas.

En este contexto, los resultados de esta investigación en relación a los niveles de Zn y Cu en pacientes diabéticos concordaron con los obtenidos por Hussain y col.,¹⁰ quienes reportaron niveles disminuidos de Zn y concentraciones normales de Cu al compararlos con

el grupo control. De igual manera, Saha-Roy Santa y col.,² y Tawfeeq y col.,²⁷ reportaron niveles disminuidos de Zn en este tipo de población y niveles ligeramente altos para Cu. Las concentraciones normales de Cu encontradas en esta investigación permitieron sugerir que estos pacientes llevan un control adecuado de sus glicemias, ya que el aumento del Cu sérico está asociado con glicemias alteradas de pacientes mal controlados. Se ha reportado que la hipercupremia presenta una correlación positiva con los niveles de glucosa sanguínea²¹, además, facilita el estrés oxidativo en la DM-2, ya que el exceso de este metal estimula la reacción de Fenton.

Por su parte, Mohan y col.,²⁵ encontraron niveles de Zn y magnesio disminuidos y de Cu y hierro elevados en pacientes diabéticos con retinopatía, corroborando lo anteriormente mencionado. Por lo tanto, se puede decir que los bajos niveles de Zn pueden afectar la función del páncreas y tienen un papel importante en la patogénesis de la DM^{2, 27}. Las diferencias significativas ($p < 0,05$) en las concentraciones de Zn en suero sanguíneo humano de mujeres DPD y DSPD ($1,009 \pm 0,300$ mg/L y $0,661 \pm 0,245$ mg/L) correspondieron con lo reportado por Hasan²⁸ quien encontró niveles bajos de Zn en mujeres diabéticas iraquíes, como posible consecuencia de la mala absorción o excesiva excreción de esos metales por la orina.

Investigaciones previas^{3,28}, han sugerido que trastornos metabólicos asociados con la resistencia a la insulina e hiperglucemia, pueden causar la deficiencia de algunos minerales. El déficit de Cu y Zn ha sido con frecuencia reportado en DM como un factor que contribuye a la etiología de las complicaciones de la diabetes como son la hipertensión, la retinopatía y la trombosis^{1,29}. En este estudio, la disminución de los niveles de Zn en mujeres se asoció con niveles ligeramente más altos de Cu en pacientes DSPD, por lo contrario, la carencia de Cu producirá un antagonismo en la actividad de zinc lo cual conduce a una posible diabetes, pero el exceso de Cu disminuye los niveles de zinc afectando la síntesis de insulina, en conjunto los dos metales mantienen en equilibrio la síntesis de insulina y evita alteraciones en la glucosa³⁰.

Además, esta deficiencia podría estar relacionada con las diferencias en los factores principales que regulan la homeostasis de estos metales tales como la absorción gastrointestinal y excreción urinaria especialmente en diabetes mal controlada, esta deficiencia puede mejorar si se consume una dieta a base de alimentos que contengan Cu y Zn, y un tratamiento terapéutico que incluya estos minerales, aunado a un buen control y cuidado del paciente. Esto permite inferir que la alteración del metabolismo de carbohidratos y lípidos conlleva a niveles aumentados de Cu y disminuidos de Zn en personas con diabetes mellitus.

En la Tabla 5 se presentan las concentraciones de Cu y Zn para pacientes DPD y DSPD, así como también la relación Cu/Zn.

Tabla 5. Concentraciones de Cu y Zn y relación Cu/Zn en pacientes diabéticos con y sin pie diabético.

	Grupo DPD	Grupo DSPD
Cu	$1,075 \pm 0,083$	$1,032 \pm 0,088$
Zn	$0,958 \pm 0,072$	$0,734 \pm 0,103$
Cu/Zn	1,12	1,40

DPD = diabético con pie diabético, DSPD = diabético sin pie diabético
Concentraciones = media \pm DE (mg/L)

Los niveles de Cu y Zn en el grupo de DPD estuvieron entre $1,075 \pm 0,083$ mg/L y $0,958 \pm 0,072$ mg/L, respectivamente, con una relación Cu/Zn de 1,12, y para el grupo DSPD se

encontraron niveles de Cu y Zn en intervalos de $1,032 \pm 0,088$ mg/L y $0,734 \pm 0,103$ mg/L, respectivamente, con una relación de Cu/Zn de 1,40. Las relaciones Cu/Zn encontradas en este estudio concordaron con las obtenidas por Viktorinova y col.,³¹ en pacientes con DM (Cu/Zn=1,42), pero difieren de la reportada por Saha-Roy Santa y col.,² (Cu/Zn=-0,815).

Conclusiones

Se evaluaron de los niveles séricos de Cu y Zn de pacientes DPD y DSPD con edades comprendidas entre 55-75 años, empleando la espectrometría de absorción atómica con llama evidenció que los niveles de Cu y Zn están en concentraciones adecuadas para ambos grupos, sin embargo, la relación Cu/Zn obtenida está a expensa de los niveles de cobre, lo que permite inferir que, el metabolismo de estos oligoelementos se encuentra en equilibrio en los pacientes DPD y DSPD, como consecuencia de la buena ingesta de dichos minerales diariamente.

Conflictos de interés

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Referencias bibliográficas

1. Dorreh F, Rezvanfar M y Ghaseminejad S. Comparison of Serum Zinc Level in Patients with Diabetes Type 1 and 2 and Its' Relation to HbA1c. Zahedan J. Res. Med. Sci. 2014;16(1): 48-50 Disponible en: http://applications.emro.who.int/imemrf/Zahedan_J_Res_Med_Sci/Zahedan_J_Res_Med_Sci_2014_16_1_48_50.pdf
2. Saha-Roy, S., Pal, S., Bera, S., Choudhury, K. M., Bhattacharya, A., Sen, G., & Gupta, S. Status of Serum Magnesium, Zinc & Copper in Patients Suffering from Type -2 Diabetes mellitus. J. of Drug Deliv. Therap. 2014; 4(1), 70-72. Disponible en: <http://www.jddtonline.info/index.php/jddt/article/view/754/444>
3. Cipriani-Thorne E, Qunitanilla A. Diabetes Mellitus tipo 2 y resistencia a la insulina. Rev. Med. Hered. 2010; 21,: 160-170. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1018-130X2010000300008&script=sci_abstract.
4. Rojas E., Molina R, Rodríguez C. Definición, clasificación y diagnóstico de la diabetes mellitus. Rev. Venez. Endocrinol. Metabol. 2012; Volumen 10 (1): 7-12. Disponible en: <http://www.svemonline.org/wp-content/uploads/2015/07/revista-svem-vol-10-2.pdf>
5. Cabrera V. Diabetes y su impacto en los tejidos periodontales. Rev. Chil. Endocrinol. Diabetes. 2015, 8(2):63-69. Disponible en: http://revistasoched.cl/2_2015/4.pdf. Consulted June 2018.
6. Guía de práctica clínica. 2017. Pie Diabético. SEPID. Guayaquil-Ecuador. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/422299850/GPC-PIE-DIABETICO-2016-2017-Sociedad-Ecuatoriana-de-Pie-Diabetico>.
7. Lucha V, Paloma F, Fornés B, Sierra C. Manejo del paciente diabético con úlcera neuroisquémica. A propósito de un caso. Rev. Enferm. Dermatol. 2012; año 6, Nº 16, 34-38. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4069906>
8. Organización Mundial de la salud. Informe mundial sobre la diabetes. 2016. WHO/NMH/NVI/16.3. Disponible en: <https://www.who.int/diabetes/global-report/es/.pdf>
9. Thomas B, Prasad B, Kumari N, Radhakrishna V y Ramesh A. A comparative evaluation of the micronutrient profile in the serum of diabetes mellitus Type II patients and healthy individuals with periodontitis. Indian. Soc. Periodontol. 2019; 23(1): 12-20. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6334553/>
10. Hussain F, Arif, Sheikh M, Nawaz H, Jamil A. Trace elements status in type 2 diabetes. Bangl. J. Med. Sci. 2009; 8 (3): 1-5. Disponible en: <https://www.banglajol.info/index.php/BJMS/article/view/3983>.
11. Sreenivasan P, Prashant A, Nataraj S, Vishwanath P, Verma S, Chandru S. Assessment of serum trace metals and body mass indices in rural and urban healthy adult population: A pilot study.

- Internat. J. Health & Allied Sci. 2015; Vol. 4 (2): 89-93. Disponible en: <http://www.ijhas.in/article.asp?issn=2278-344X;year=2015;volume=4;issue=2;spage=89;epage=93;aulast=Sreenivasan>. Consulted May 2018
12. Sharma V. Copper Deficiency: Clinical Review of an Obscure Imitator. J. Med. Sci. 2012; 32 (1): 001-007. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/286196955_Copper_deficiency_Clinical_review_of_an_obscure_imitator
13. Xu J, Zhou Q, Liu G, Tan Y, Cai L. Analysis of Serum and Urinal Copper and Zinc in Chinese Northeast Population with the Prediabetes or Diabetes with and without Complications. Oxidat. Med. Cell. Longev. 2013, 1-11. Disponible : <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2013/635214/>.
14. Nriagu J. Zinc Deficiency in Human Health. Encyclopedia of Environmental Health. 2011; 789-800. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/291408562_Zinc_Deficiency_in_Human_Health
15. Miao X, Sun W, Fu Y, Miao L, y Cai L. Zinc homeostasis in the metabolic syndrome and diabetes. Front Med. 2013, 7(1): 31-52. Disponible en: <http://journal.hep.com.cn/fmd/EN/10.1007/s11684-013-0251-9>
16. Dosa M, Adumitresi C, Hangan L y Nechifor M. Copper, Zinc and Magnesium in Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus Treated with Metformin. InTech. Chapter. 2013 12. 211-228. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.5772/48230>
17. Rakhra G, Masih D, Vats A, Verma S, Singh V, Kirar V, Singh A, Manral M y Nath S. Copper, iron, zinc and magnesium status of physically active young Indian males. J. Sport. Physic. Ed. 2015; 2 (5): 25-32. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/286933737_Copper_iron_zinc_and_magnesium_status_of_physically_active_young_Indian_males
18. Pizarro C, Vázquez K, Salas F, Loeff T y Pérez F. Distribución del polimorfismo del gen del antígeno-4 del linfocito T citotóxico en población chilena con DM tipo 1. Rev. Chil. Endocrinol. Diabetes. 2015; 8(2):52-56. Disponible en: http://www.revistasoched.cl/2_2015/2.html
19. Lu J, Xie G, Jia W, Jia W. Metabolomics in human type 2 diabetes research. Front. Med. 2013; 7(1): 4–13. <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11684-013-0248-4>
20. Bermúdez V, Salazar J, Rojas J, Añez R, González R, Torres W, Mejía J, Bello L, López-Miranda J y Cabrera M. Prevalencia de diabetes mellitus tipo 2 y factores asociados en la ciudad de Maracaibo, Venezuela. Rev. Latinoam. Hipert. 2014; 9(2): 14-25. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/1702/170240765003.pdf>
21. American Society for Testing and Materials: Standard Specification for Water, Philadelphia. PA. ASTM D, 1977, p. 1193. Disponible en: <https://www.astm.org/search/fullsite-search.html?query=ASTM%20D1977%20Water&resStart=0&resLength=10&>
22. Semprún B, Fernández D, Cáceres A, Bermúdez V y Ganadillo V. Niveles de Cu y Zn en suero sanguíneo de pacientes con síndrome metabólico de la ciudad de Maracaibo. Multiciencias. 2010. Vol. 10 No. Extraordinario: 259–264. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/904/90430360041.pdf>
23. Martínez M, Sánchez-Villegas A, Toledo E y Faulin J. Bioestadística Amigable. 3^{era} Edición. Editorial ELSEVIER. 2014, 185-194. Disponible en: <https://www.unav.edu/documents/16089811/16155256/indice-bioestadistica-amigable-3-edicion.pdf>
24. Semprún B, Cáceres A, Fernández D, Campos G, Pérez H y Granadillo V. Desarrollo de un método rápido por inyección en flujo para la determinación de Cu en suero sanguíneo. Ciencia. 2013; 21: 14-24. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/327644724_Desarrollo_de_un_metodo_rapido_por_inyeccion_en_flujo_para_la_determinacion_de_Cu_en_suero_sanguineo
25. Lal M, Sudha K, Shetty B y Rao G. Influence of modified levels of plasma magnesium, Cu, Zn and Iron levels on thiols and protein status in diabetes mellitus and diabetic retinopathy. Int. J. Anal. Pharm. Biomed. Sci. 2013 ;2(1): 67-72. Disponible en: https://pdfs.semanticscholar.org/8dfd/c4aa7da462e7aa3a9d4a88ce8bd5a80a2d3c.pdf?_ga=2.68640856.838608272.1579840037-1487885632.1569336043
26. Arnaud J, De Lorgeril M, Akbaraly T, Salen P, Arnout J, Cappuccio F, Van Dongen M, Krogh D, Siani A y Iacoviello L. Gender differences in copper, zinc and selenium status in diabetic-free

- metabolic syndrome. *Nut. Metab. Cardio. Dis.* 2012; 22, 517-524. Disponible en: [https://www.nmcd-journal.com/article/S0939-4753\(10\)00217-6/fulltext](https://www.nmcd-journal.com/article/S0939-4753(10)00217-6/fulltext)
27. Al-Auqbi T, Al-Mussawi A y Al-Sammraie A. Serum Copper, Zinc and Cu/Zn Ratio in diabetes. *Iraqi J. Comm. Med.* JAN. 21(1):64-68. https://www.researchgate.net/publication/255791765_Serum_Copper_Zinc_and_CuZn_Ratio_in_Diabetics
28. Hasan B. Status of some trace elements in Iraqi diabetic women and its relationship with lipid profile. *Int. J. Sci. nat.* 2013. 4(1).188-191. Disponible en: https://pdfs.semanticscholar.org/70a5/17c94fa830c31a304fef40a8d83ea939d908.pdf?_ga=2.63448678.838608272.1579840037-1487885632.1569336043
29. Meaney E, Gutiérrez-Salmeán G, Fanghaënel G, Sánchez L, Nájera N, Rivera J, Alcocer A y Ceballos G. Once again, what's in a name? Redefining the concepts of the metabolic syndrome and obesity phenotypes. Part II. *Rev Mex Cardiol*; 2017; 28 (4): 154-162. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/cardio/h-2017/h174a.pdf>
30. Castro A, Muñoz R y López G. Cuantificación de Zn, Cu y Cr en suero sanguíneo para determinar su relación con la glucosa por espectrofotometría de A.A. en estudiantes de la sec. técnica no 25 "Felipe Santiago Xicoténcatl". *Rev. Iberoam. Prod. Acad. Gest. Educat.* 2015; 3:1-21. Disponible en: <https://www.paq.org.mx/index.php/PAG/article/view/389/428>
31. Viktorínová A, Tošerová E, Křižko M y Ďuračková Z. Altered metabolism of copper, zinc, and magnesium is associated with increased levels of glycated hemoglobin in patients with diabetes mellitus. *Metabol. Clin. Exp.* 2009; 58: 1477–1482. Disponible en: [https://www.metabolismjournal.com/article/S0026-0495\(09\)00190-5/fulltext](https://www.metabolismjournal.com/article/S0026-0495(09)00190-5/fulltext)