

Curso 2004/05  
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/15  
I.S.B.N.: 84-7756-645-3

MARÍA DEL CARMEN DURÁN CASTELLÓN  
Efecto del zinc en la osteopatía,  
hepatopatía y miopatía alcohólica

Directores

EMILIO GONZÁLEZ REIMERS  
FRANCISCO SANTOLARIA FERNÁNDEZ  
MELCHOR RODRÍGUEZ GASPAR



SOPORTES AUDIOVISUALES E INFORMÁTICOS  
Serie Tesis Doctorales

## AGRADECIMIENTOS.

Al Dr. Emilio González Reimers, por haber confiado en mí para la realización de este trabajo. Por su inestimable ayuda, gracias a ella verá la luz esta tesis. Y, sobre todo, por su paciencia y comprensión en los momentos en los que más lo he necesitado. Empecé siendo su alumna y ha conseguido que me sienta como una compañera.

Al Dr. Francisco Santolaria Fernández, por su apoyo y ánimo constante en mi desarrollo como profesional y persona. Merecedor de mi mayor admiración por su calidad humana y profesional, él ha sido pieza clave para mi formación como médico. Además tengo que agradecerle profundamente su ayuda y confianza en mí en todo momento.

Al Dr. Melchor Rodríguez Gaspar, por su inestimable colaboración en la realización de esta tesis. Por haberme mostrado el gran universo de cosas que aún me quedan por aprender y haber sido un buen maestro en todo momento. Y, ante todo, por su amistad.

Al Dr. Tomás González Hernández por dejar que invadiera parte de su laboratorio y me sintiera en él como en mi propia casa. Por su paciencia, por su ayuda en distintas fases del trabajo experimental, y por su enseñanza para el procesamiento de las muestras musculares.

Al Dr. Francisco Valladares Parrilla, por su colaboración en el procesamiento histológico de las muestras hepáticas.

A los Drs. Antonio Milena y María José de la Vega, por su ayuda y colaboración desinteresada en la obtención de los parámetros bioquímicos.

Al Dr. Luis Galindo Martín, por su gran colaboración en el procesamiento de los oligoelementos.

A las personas de la Unidad de Investigación que de alguna u otra manera han colaborado en la realización de la fase experimental y me han ayudado y cedido su espacio y tiempo (Carmen, Nuria,...).

A Ana López Lirola y a Raquel Martín Olivera por su inmensa e imprescindible colaboración en la realización del trabajo experimental.

A todas las personas del animalario que me ayudaron con el trabajo más escabroso de la fase experimental de esta tesis.

A mis compañeros y amigos del Servicio de Medicina Interna. A todos aquellos que de una u otra forma me han ayudado en la realización de esta tesis y en el ejercicio de mi profesión ofreciéndome apoyo, amistad, aliento, consejos y tiempo.

A mi familia, por estar siempre conmigo, por quererme, apoyarme y tolerarme en los momentos más difíciles y sobre todo por darme tiempo. Gracias a ellos este trabajo ha llegado a buen fin.

A mis padres, por su amor, esfuerzo y sacrificio continuo e incondicional. Por todo.

A mis hijos, Paula y Jorge. Gracias por no haberme tenido en cuenta la inmensidad de tiempo que os he quitado, y gracias, por esperarme siempre con una sonrisa.

A todos muchas gracias.

A MI MADRE

## ABREVIATURAS:

ROS: radicales libres

SODm: superoxidodismutada muscular

SODh: superoxidodismutasa hepática

GPXm: glutathionperoxidasa muscular

GPXh: glutathionperoxidasa hepática

MLDh: malonildialdehído hepático

MLDm: malonildialdehído muscular

ADH: alcohol deshidrogenasa

DMO: densidad mineral ósea

CCL4: tetracloruro de carbono

CTRL: grupo control

HIPO: grupo malnutrido

OH: grupo alcohólico

OHHIPO: grupo alcohólico y malnutrido

CTRL+ZN: grupo control con zinc

HIPO+ZN: grupo malnutrido con zinc

OH+ZN: grupo alcohólico con zinc

OHHIPO+ZN: grupo alcohólico y malnutrido con zinc

## **ÍNDICE**

1. INTRODUCCIÓN	1
<b>1.1. Malnutrición</b>	<b>3</b>
1.1.1. Concepto y tipos.	3
1.1.2. Fisiopatología .	4
1.1.3. Efectos orgánicos de la malnutrición.	6
<b>1.2. Alcoholismo</b>	<b>8</b>
1.2.1. Concepto y epidemiología.	8
1.2.2. Metabolismo del alcohol.	9
1.2.3. Efectos orgánicos del alcohol.	13
<b>1.3. Músculo</b>	<b>14</b>
1.3.1. Morfología y fisiología muscular.	14
1.3.2. Metabolismo muscular.	16
1.3.3. Miopatía alcohólica.	18
1.3.3.1. Etiopatogenia.	19
1.3.3.2. Efecto del alcohol sobre la síntesis proteica.	22
1.3.3.3. Efecto del alcohol sobre la degradación de proteínas.	24
1.3.3.4. Efectos mediados por radicales libres.	24
1.3.3.4.1. Radicales libres.	25
1.3.3.4.2. Mecanismos antioxidantes.	26
1.3.3.4.3. Radicales libres y miopatía.	27
1.3.4. Miopatía y malnutrición.	29
<b>1.4. Hueso</b>	<b>32</b>
1.4.1. Composición y remodelado óseo.	33
1.4.2. Metabolismo mineral óseo.	35
1.4.2.1. Calcio.	35
1.4.2.2. Fósforo.	36
1.4.2.3. Magnesio.	36
1.4.2.4. Hierro.	37
1.4.2.5. Cobre.	37
1.4.2.6. Zinc.	38
1.4.3. Sistemas hormonales implicados en la regulación del remodelado óseo.	38
1.4.3.1. PTH.	38
1.4.3.2. Calcitriol (1,25dihidroxitamina D).	39
1.4.3.3. Calcitonina.	40
1.4.3.4. Hormonas sexuales.	40
1.4.3.5. Otros sistemas hormonales.	41
1.4.4. Factores locales o sistémicos que influyen en el remodelado óseo	41
1.4.5. Osteopatía alcohólica.	43
1.4.6. Malnutrición y hueso.	48
<b>1.5. Hígado</b>	<b>52</b>
1.5.1. Anatomía microscópica hepática.	52
1.5.2. Función hepática.	54

1.5.3.	Hígado y alcohol.	58
1.5.4.	Hepatopatía alcohólica.	63
1.5.4.1.	Balanciamiento hepatocitario.	64
1.5.4.2.	Necrosis e inflamación hepática.	67
1.5.4.3.	Fibrogénesis hepática.	68
1.5.5.	Hígado y malnutrición.	69
<b>1.6.</b>	<b>Zinc</b>	<b>72</b>
1.6.1.	Metabolismo del zinc.	73
1.6.2.	Zinc y metaloenzimas.	74
1.6.3.	Propiedades antioxidantes del zinc.	75
1.6.4.	Zinc y hueso, músculo e hígado.	77
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>81</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODO</b>	<b>83</b>
<b>3.1.</b>	<b>Población a estudio</b>	<b>84</b>
3.1.1.	Animales y alimentación.	84
3.1.2.	Sacrificio y recogida de muestras.	88
<b>3.2.</b>	<b>Estudio del músculo</b>	<b>90</b>
3.2.1.	Estudio histológico	90
3.2.1.1.	ATP-ASA miofibrilar.	90
3.2.2.	Determinaciones enzimáticas.	91
3.2.3.	Determinación de oligoelementos.	92
<b>3.3.</b>	<b>Estudio del hueso</b>	<b>94</b>
3.3.1.	Análisis histológico.	94
3.3.1.1.	Inclusión en metil metacrilato.	94
3.3.1.2.	Tinción de tricrómico.	95
3.3.1.3.	Tinción de hematoxilina férrica de Weigert.	95
3.3.2.	Determinación de oligoelementos.	96
<b>3.4.</b>	<b>Estudio del hígado</b>	<b>97</b>
3.4.1.	Análisis histológico.	97
3.4.1.1.	Hematoxilina-eosina.	97
3.4.1.2.	Tricrómico de Masson.	98
3.4.2.	Determinaciones enzimáticas.	100
3.4.3.	Determinación de oligoelementos.	100
<b>3.5.</b>	<b>Determinaciones serológicas</b>	<b>101</b>
<b>3.6.</b>	<b>Determinaciones en orina</b>	<b>102</b>
<b>3.7.</b>	<b>Determinaciones en heces</b>	<b>102</b>
<b>3.8.</b>	<b>Análisis estadístico</b>	<b>103</b>

**4.1. Músculo 105**

---

4.1.1. Histomorfometría. ....	105
4.1.1.1. Área de los distintos tipos de fibras musculares.	105
4.1.1.2. Área de las fibras musculares tipo I.	105
4.1.1.3. Área de las fibras musculares tipo IIA.	106
4.1.1.4. Área de las fibras musculares tipo IIB.	107
4.1.2. Determinaciones enzimáticas. ....	110
4.1.2.1. Peroxidación lipídica, malonildialdehído muscular.	110
4.1.2.2. Superoxidodismutasa muscular (SODm).	112
4.1.2.3. Glutationperoxidasa muscular (GPXm).	113
4.1.3. Oligoelementos. ....	115
4.1.3.1. Selenio muscular.	115
4.1.3.2. Manganeso muscular.	117
4.1.3.3. Hierro muscular.	117
4.1.3.4. Cobre muscular.	119
4.1.3.5. Zinc muscular.	120
4.1.4. Hormonas. ....	122
4.1.4.1. Factor de crecimiento Insulin-Like tipo 1 (IGF-1).	122
4.1.4.2. Testosterona.	122
4.1.4.3. Corticosterona.	123

**4.2. Hueso 124**

---

4.2.1. Histomorfometría. ....	124
4.2.1.1. Volumen óseo trabecular.	124
4.2.1.2. Osteoide.	127
4.2.2. Determinaciones bioquímicas. ....	131
4.2.2.1. Calcio.	131
4.2.2.2. Magnesio.	131
4.2.2.3. Fósforo.	132
4.2.2.4. Fosfatasa alcalina.	132
4.2.2.5. Osteocalcina.	133
4.2.3. Determinaciones bioquímicas en orina. ....	135
4.2.3.1. Aclaramiento urinario de hidroxiprolina.	135
4.2.3.2. Calcio corregido por creatinina.	135
4.2.3.3. Fósforo corregido por creatinina.	135
4.2.3.4. Magnesio corregido por creatinina.	135
4.2.4. Oligoelementos en hueso. ....	136
4.2.4.1. Zinc óseo.	136
4.2.5. Hormonas. ....	137
4.2.5.1. PTH.	137
4.2.5.2. 1,25 dihidroxivitamina D.	137
4.2.5.3. Factor de crecimiento Insulin-Like 1.	139
4.2.5.4. Testosterona.	139
4.2.5.5. Corticosterona.	139

**4.3. Hígado 141**

---

4.3.1. Histomorfometría. ....	141
-------------------------------	-----

4.3.1.1. Fibrosis hepática.	141
4.3.1.2. Grasa hepática.	143
4.3.2. Determinaciones enzimáticas. ....	145
4.3.2.1. Superoxidodismutasa hepática (SODh).	145
4.3.2.2. Glutacionperoxidasa hepática(GPXh).	145
4.3.2.3. Productos de la peroxidación lipídica.	147
4.3.3. Oligoelementos hepáticos. ....	149
4.3.3.1. Hierro.	149
4.3.3.2. Zinc.	151
4.3.3.3. Cobre.	153
4.3.3.4. Selenio.	154
4.3.3.5. Manganeseo.	156
<b>4.4. Determinaciones bioquímicas</b> _____	<b>158</b>
4.4.1. Albúmina. ....	158
4.4.2. Zinc en heces. ....	159
4.4.3. Zinc en orina. ....	160
4.4.4. Creatinfosfoquinasa. ....	160
4.4.5. Lactatodeshidrogenasa. ....	160
<b>4.5. Peso</b> _____	<b>161</b>
4.5.1. Peso inicial. ....	161
4.5.2. Peso final. ....	161
<b>5. DISCUSIÓN</b> _____	<b>165</b>
<b>5.1. Músculo</b> _____	<b>166</b>
<b>5.2. Hueso</b> _____	<b>173</b>
<b>5.3. Hígado</b> _____	<b>177</b>
<b>6. CONCLUSIONES</b> _____	<b>180</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b> _____	<b>182</b>

## **1. INTRODUCCIÓN.**

El objetivo principal del presente trabajo es analizar el efecto del zinc sobre la miopatía y osteopatía del alcohólico. Como comentaremos hay algunos datos que sugieren que el zinc puede favorecer el normal desarrollo del hueso ya que aumenta su formación por lo que es posible que aminore la osteoporosis inducida por el alcohol. Por su efecto sobre enzimas que intervienen en la síntesis de proteínas es posible que también reduzca la intensidad de la atrofia muscular asociada al consumo de alcohol.

La alta prevalencia de la malnutrición calórico-proteica en el alcohólico nos obliga a incluir a ésta como variable a analizar en este estudio. Además es de sobra conocido que el alcohol provoca lesiones hepáticas pudiendo éstas influir en el desarrollo de la osteopatía y eventualmente en la miopatía de estos pacientes. Como comentaremos la atrofia muscular obedece tanto a una defectuosa síntesis proteica como a un aumento del catabolismo de éstas. Antioxidantes y peroxidación lipídica parecen influir en la patogenia de ambas alteraciones por lo que incluimos su estudio dentro del presente trabajo, máxime si recordamos que el zinc también puede influir en este sistema.

Por lo tanto procederemos en la introducción a revisar conceptualmente lo que es la malnutrición, el efecto del alcohol sobre hígado, músculo y hueso y el metabolismo del zinc y su posible influencia en la patología asociada al alcoholismo así como el papel de los antioxidantes y la peroxidación lipídica en la patogenia de estos procesos.

## **1.1. MALNUTRICIÓN.**

### **1.1.1 CONCEPTO Y TIPOS.**

La malnutrición se conoce por aquella situación en la que la cantidad de energía y proteínas de la que dispone el organismo es insuficiente para cubrir sus necesidades, lo cual va a provocar una pérdida tanto de masa magra corporal como de tejido adiposo, aunque predominando una sobre la otra según las circunstancias de cada individuo. Puede desarrollarse de dos formas dependiendo de las causas que la originen: a) de forma primaria, típica de los países en vías de desarrollo, donde está limitada la cantidad (aporte energético insuficiente), y calidad de los nutrientes (sobre todo a base proteínas de origen vegetal con bajo valor biológico) y donde la incidencia de enfermedades infecciosas es elevada; b) de forma secundaria, típica de los países desarrollados, en personas que estando bien nutridas previamente sufren una enfermedad aguda o crónica. Los factores predisponentes en este caso son múltiples: anorexia, malabsorción, abuso de drogas y alcohol, depresión, escasez de ingresos económicos, etc...

Atendiendo al hecho diferencial de que lo que predomine como factor etiopatogénico sea la pérdida proteica o no, podemos diferenciar dos síndromes de malnutrición calórico proteica:

A) Malnutrición tipo marasmo: se produce por deficiencia tanto de energía como de proteínas. El modelo ideal es el ayuno total y prolongado. Se caracteriza por: detención del crecimiento, adelgazamiento muy extremo (por la necesidad de consumir reservas de grasas), consunción generalizada de la masa de proteínas corporales, y ausencia de edemas, debido a la prioridad del organismo para mantener la síntesis de albúmina y otras proteínas necesarias (coagulación, reactantes de fase aguda, proteínas de transporte). Obedece a causas como: anorexia, demencia senil, depresión, trastornos deglutorios, síndromes de malabsorción, maldigestión o bajos recursos económicos.

B) Malnutrición tipo Kwashiorkor: por déficit selectivo de proteínas. En países subdesarrollados se suele asociar a una alimentación a base de cereales tras cese de la lactancia. En países desarrollados tiene lugar en situaciones de estrés orgánico (sepsis,

quemaduras, politraumatismos, pancreatitis, cirugía mayor, neoplasias, etc...). Se caracteriza por: retraso del crecimiento (por inhibición de las somatomedinas) con conservación del peso, hipoalbuminemia, edemas y hepatomegalia (por infiltración grasa secundaria a la inhibición de la síntesis de lipoproteínas de muy baja densidad, VLDL). La desnutrición se aprecia cuando, superada la respuesta de fase aguda, se elimina el agua.

### 1.1.2. FISIOPATOLOGÍA.

En aquellas situaciones en las que el aporte energético disminuye por debajo de las necesidades mínimas del organismo, el cuerpo responde con una serie de mecanismos adaptativos fisiológicos que tratan de movilizar los aminoácidos del tejido muscular y las grasas del tejido adiposo, necesario para la obtención de energía para mantener el metabolismo de los tejidos y en especial, del cerebro (Denke et al., 1998).

Durante la primera semana se suelen perder 4-5 kg de los cuales corresponden, un 25% a tejido graso, un 35% al líquido extracelular y un 40% a proteínas. Inicialmente se consumen las reservas de glucógeno (sólo suficientes para unas horas) y se ponen en marcha la gluconeogénesis, a partir fundamentalmente de aminoácidos musculares, con el fin de mantener inicialmente la glucemia. De esta forma se interrumpe la síntesis proteica y disminuye la masa corporal magra y el tejido adiposo. Se activa también la lipólisis; de esta forma se liberan ácidos grasos libres que serán utilizados por los tejidos periféricos como fuente energética y por el hígado para producir cuerpos cetónicos. Este comportamiento inicial está mediado por la hipoinsulinemia y el predominio de hormonas contrainsulares, sobre todo el glucagón.

En las semanas siguientes prosiguen las pérdidas, pero a ritmo más lento y los distintos compartimentos se reducen a distinta velocidad. A partir de la primera semana surgen los siguientes fenómenos adaptativos: a) adaptación del cerebro y otros tejidos a consumir como fuente de energía cuerpos cetónicos, en un intento de reducir al máximo el consumo de glucosa, y por tanto el de proteínas; b) aumento de la neoglucogénesis renal, a base de glutamina, adquiriendo tanta importancia como la hepática; c) reducción del metabolismo basal por aumento de la  $rT_3$ , tono simpático bajo y disminución de las

somatomedinas. La movilización de los aminoácidos esenciales musculares mantiene parcialmente la síntesis de albúmina por lo que la hipoalbuminemia aparece tardíamente.

Cuando el aporte de proteínas se ve seriamente comprometido, bien por aporte de proteínas con escaso valor biológico (proteínas vegetales), o bien por ausencia de este nutriente (administración única de glucosa como nutriente en nutrición parenteral, alimentación basada en cereales) la situación es más comprometida. Se produce un aumento de la secreción de insulina que inhibe la lipólisis en el tejido adiposo e inhibe la movilización de los aminoácidos musculares. Todo esto condiciona una menor disponibilidad de aminoácidos lo que provoca un deterioro en la síntesis de albúmina y otras proteínas (VLDL).

Los minerales del organismo se agotan debido a la reducción de masa corporal y de líquido extracelular, pero el potasio y el magnesio pueden perderse de forma desproporcionada con respecto a la masa magra corporal ya que salen de sus depósitos intracelulares.

La inanición es considerablemente más nociva en el contexto de un estrés orgánico. En esta circunstancia se eleva el metabolismo basal y se acelera la pérdida de peso, de nitrógeno y de micronutrientes, se induce una alta demanda de síntesis proteica para la función inmune y para reparar tejidos a partir de aminoácidos que son extraídos del compartimento muscular. Esto es debido a las consecuencias metabólicas de la inflamación, infección, fiebre y curación de las heridas con la consiguiente liberación de citocinas inflamatorias como el  $TNF_{\alpha}$ , la  $IL_2$  y la  $IL_6$  (Reid et al., 2001).

Por otro lado se ha observado en la desnutrición tipo Kwashiorkor un incremento marcado de la peroxidación lipídica (malondialdehído y hexanal) con un decremento en los antioxidantes y de la proporción de ácidos grasos poliinsaturados plasmáticos (Lenhartz et al., 1998), y también un descenso de las concentraciones eritrocitarias de glutatión (Jackson, 1986). Todo esto apunta a que la malnutrición provoca una depleción de los sistemas antioxidantes y por tanto una mayor predisposición al daño oxidativo (Grattagliano et al., 2000).

### 1.1.3. EFFECTOS ORGÁNICOS DE LA MALNUTRICIÓN.

#### Aparato locomotor.

Las consecuencias de la pérdida de proteínas óseas y musculares son la disminución de la masa muscular y osteoporosis, con frecuencia hay fatigabilidad y fracturas.

#### Cardiovascular.

Bradycardia e hipotensión arterial, atribuibles a la atrofia del miocardio, y que por otra parte mantiene una función adecuada para una situación en la que el metabolismo está disminuido. Puede aparecer insuficiencia cardíaca ante situaciones de estrés orgánico y también alteraciones de la conducción.

#### Pulmonar.

Amortiguación de la respuesta ventilatoria a la hipoxia. Son frecuentes las infecciones pulmonares por aparición de atelectasias secundarias a la insuficiencia de los músculos ventilatorios.

#### Renal.

Disminución del filtrado glomerular que es suficiente para una situación de metabolismo basal disminuido.

#### Hemático.

Aparece anemia secundaria al déficit de síntesis de proteínas y a la deficiencia de hierro, ácido fólico y vitamina D. Linfopenia, hipoalbuminemia y disminución de transferrina.

#### Metabolismo basal.

Suele aparecer hipotermia por disminución de la grasa subcutánea y de los niveles de hormonas tiroideas. La hipoglucemia aparece en fases terminales.

#### Tubo digestivo.

Malabsorción e intolerancia a la lactosa por atrofia de las vellosidades intestinales, disminución de las secreciones gástrica, pancreática y biliar, y

sobrecrecimiento bacteriano, hechos que no sólo derivan de la propia malnutrición sino de la menor estimulación del intestino por la escasez de nutrientes ingeridos. También produce un incremento en la traslocación bacteriana, y un mayor riesgo de desarrollar PBE en la cirrosis (Casafont et al., 1997).

#### Sistema inmune.

Hay depresión de la inmunidad celular mientras que la humoral se mantiene relativamente conservada. Se produce alteración de la función de los granulocitos: quimiotáctica y fagocitaria. Las infecciones por tanto son frecuentes y esto a su vez empeora el estado nutricional.

#### Sistema endocrino.

Se produce hipogonadismo por disfunción del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal, con descenso de la testosterona, los estrógenos circulantes, la LH y la FSH, así como alteraciones en la maduración de las células germinales (Herbert, 1980) y consecuentemente una disminución de la capacidad reproductora. Se encuentran también concentraciones reducidas de IGF-1.

También hay disminución de la  $T_3$  y  $T_4$  mientras que las concentraciones de  $T_3$  inversa se elevan, condicionando una disminución del metabolismo basal .

En lo que se refiere al páncreas se produce tanto una insuficiencia pancreática exocrina, que condiciona secundariamente malabsorción de nutrientes, como endocrina, con disminución de las concentraciones circulantes de insulina, hormona del crecimiento y glucagón.

#### Cicatrización de las heridas.

Se produce una incapacidad para depositar colágena en las heridas incluso en los primeros estadios de la cicatrización.

## **1.2. ALCOHOLISMO.**

### 1.2.1. CONCEPTO Y EPIDEMIOLOGÍA.

Los estragos producidos por la bebida son conocidos desde la antigüedad, pero es en 1849 cuando Magnus Huss acuña el término alcoholismo para referirse globalmente a todos los problemas derivados de la alcoholización y en 1960 Jellinek define el alcoholismo como todo uso o abuso de bebidas alcohólicas que originan un perjuicio al individuo, a la sociedad o a ambos.

El consumo excesivo de alcohol constituye uno de los problemas sanitarios más importantes en la mayoría de los países industrializados. El 90% de las personas ingiere alcohol, entre el 40 y el 50% de los varones tiene problemas temporales inducidos por el alcohol y el 10% de los varones y el 3,5% de las mujeres sufre problemas generales y persistentes producidos por el alcohol (Schuckit, 1998).

Hasta hace unos años el alcoholismo era considerado sobre todo un problema de conducta y social. Sin embargo el reconocimiento de la asociación entre alcoholismo y cirrosis hepática, y el hecho de que esta enfermedad constituya una de las primeras causas de muerte entre la población adulta han llevado a reconsiderar el problema. Posteriormente se ha ido demostrando cómo el alcohol puede afectar a la casi totalidad de órganos y sistemas de nuestro organismo, bien por efecto tóxico directo de él o sus metabolitos, o bien por la cantidad de factores que pueden asociarse a su consumo desmesurado, mereciendo especial atención el peculiar estilo de vida con destrucción de lazos sociales y familiares (malos tratos al cónyuge y a los hijos, marginación y abandono social) (De Onís y Villar, 1992) y unas irregularidades en los hábitos alimenticios que pueden llevar a la malnutrición (Santolaria et al., 2000a).

Actualmente el alcoholismo es considerado una de las principales causas de enfermedad evitable y de muerte prematura sobre todo por debajo de los 60 años. Entre las causas de muerte asociadas al alcoholismo cabe destacar cirrosis, cánceres de boca, laringe, esófago, faringe e hígado y lesiones por accidentes (Thun et al., 1997). En España, que ha sido tradicionalmente un país con gran consumo de bebidas alcohólicas, se calcula que los problemas de salud derivados del alcoholismo suponen: un 15-20%

de las consultas en atención primaria, un 15% de las urgencias atendidas en los hospitales y un 25-30% de las admisiones hospitalarias, lo cual se traduce en un coste directo que asciende a 228.429 millones de pesetas/año y una mortalidad que actualmente se acerca a las 20.000 defunciones/año.

### 1.2.2. METABOLISMO DEL ALCOHOL.

El alcohol es una molécula de carga débil que difunde con facilidad a través de las membranas celulares, equilibrándose con rapidez entre la sangre y los tejidos. La absorción del alcohol se produce en varios niveles del tubo digestivo en distinta cuantía: en la mucosa bucal y esofágica, en cantidades muy pequeñas, en el estómago y el intestino grueso en cantidades moderadas, pero es a través de la mucosa de la porción proximal del intestino delgado donde se produce la mayor absorción. Diversas circunstancias pueden modificar la absorción, aumentando ésta en caso de vaciamiento gástrico rápido, con la ingesta de bebidas espumosas o con la ausencia de grasas, proteínas o carbohidratos. El etanol se excreta directamente por los pulmones, el sudor y la orina (aproximadamente un 10%), pero es en el hígado donde se metaboliza la mayor parte. Existen tres vías para la metabolización del etanol con distinta importancia y distinta distribución celular (Fig. 1):

#### 1.- **Vía de la alcohol deshidrogenasa (ADH).**

Tiene lugar en el citosol y es la más importante desde el punto de vista cuantitativo. Partiendo del etanol y mediante la alcohol deshidrogenasa se obtiene una molécula de acetaldehído. Este proceso necesita como cofactor dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD) que será reducido durante el proceso a (NADH). Consecuentemente se provoca un exceso de equivalentes reducidos y este desequilibrio NAD/NADH es el responsable de muchos de los trastornos metabólicos celulares. Esta elevación del potencial redox provoca: a) **hiperlactacidemia** que a su vez: contribuye a la acidosis, inhibe la eliminación renal de ácido úrico provocando hiperuricemia y estimula posiblemente la producción de colágena, b) **inhibición de la neoglucogénesis** ya que el NAD es imprescindible para este proceso metabólico, con tendencia a la hipoglucemia, c) **disminución de la oxidación de ácidos grasos** condicionada por la

falta de NAD hecho que contribuye al depósito hepático de las grasas ingeridas en la dieta y los ácidos grasos de síntesis endógena; d) **aumento de la síntesis de ácidos grasos** (reacción metabólica que precisa de NADH) y e) **aumento de la concentración de alfa-glicerolfosfato** que conduce a un depósito de triglicéridos en los hepatocitos.

La alcohol deshidrogenasa es una zinc-metaloenzima cuya actividad se ha visto reducida en el hígado y otros órganos de ratas como consecuencia de un déficit de zinc. También en el humano se ha observado relación entre la actividad de la ADH y el contenido hepático de zinc.

Se han descrito diferentes isoenzimas de la ADH (ADH-1, ADH-2, ADH-3, ADH-4). La acción de la ADH-3 se localiza preferentemente en el hígado pero también en el riñón, pulmón y estómago donde supone un primer paso en la metabolización del etanol y una barrera protectora frente a los efectos sistémicos del etanol. La actividad de esta enzima en el estómago desaparece tras gastrectomía y se pierde parcialmente en el alcohólico por vaciamiento gástrico acelerado y dependiendo de la cantidad de alcohol consumido, ya que esta enzima necesita concentraciones relativamente altas de alcohol para desarrollar una actividad óptima. Otras circunstancias que pueden modificar su actividad disminuyéndola son: el sexo femenino, el ayuno y el consumo de fármacos como la aspirina, el paracetamol y algunos anti-H<sub>2</sub> (Lieber et al., 1994).

Este grupo de enzimas cataliza además la oxidación omega de ácidos grasos, incrementada por el alcohol (Ma et al., 1993) y la deshidrogenación de esteroides.

Especial atención merece también la ADH-4. Localizada en el tejido epitelial y en el tracto digestivo posee mayor eficiencia catalítica para la oxidación del retinol en el hombre. Presenta dos funciones fisiológicas de gran importancia. Por un lado contribuye en el primer paso del metabolismo del etanol en el estómago y por otro lado está involucrada en la síntesis de ácido retinoico, inhibida por el etanol. Esta perturbación en la síntesis del ácido retinoico puede contribuir a la patología del síndrome alcohólico-fetal y a la relación alcohol cáncer del tracto digestivo alto (Yin et al., 2003).

Recientemente se ha sugerido la asociación entre determinados polimorfismos de la ADH con ciertas enfermedades asociadas al alcoholismo, como la cirrosis (Frenzer et al., 2002).

## **2.- Vía del sistema microsómico oxidante del etanol (MEOS).**

Es la segunda en importancia. Por esta vía se metaboliza un 10% del etanol y tiene como soporte celular el retículo endoplásmico liso. A partir del etanol, en presencia de NADPH y consumiendo oxígeno genera acetaldehído, NADP y agua. Este sistema es capaz de metabolizar otros alcoholes de cadena alifática largas. Su actividad depende del citocromo P<sub>450</sub> y de la NADPH citocromo c reductasa.

En la ingestión crónica de alcohol se activa el sistema MEOS pudiendo llegar a encargarse de la metabolización del 50% del etanol. Esto conlleva dos hechos, en primer lugar el aumento en el consumo de oxígeno que puede ser suplido con facilidad en las áreas peri-portales y no así en las peri-centrales y por otro lado una alteración en el metabolismo de diversas sustancias como el ácido retinoico, cuya degradación se ve aumentada, y de algunos fármacos y carcinógenos.

## **3.- Vía de la catalasa.**

No parece ser una vía metabólica de gran importancia en el metabolismo del etanol. Tiene lugar en los peroxisomas y en las mitocondrias. El etanol se oxida generándose acetaldehído en presencia de agua oxigenada, la cual a su vez se genera por oxidación de la hipoxantina y NADPH, reacciones catalizadas por la xantino oxidasa y la NADPH oxidasas. Esta reacción está más limitada por la disponibilidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que por la de la propia enzima.

## **4.- Metabolismo del acetaldehído**

El 90% del acetaldehído es metabolizado en el hígado generándose acetato que posteriormente será convertido en el ciclo de Krebs a acetil-coenzima A. Existen dos vías enzimáticas que oxidan al acetaldehído:

**-La acetaldehído deshidrogenasa.** Localizada tanto en las mitocondrias como en el citosol. Precisa para su acción de NAD y es cuantitativamente la más importante.

**-La xantino-oxidasa,** que conduce a la reducción del oxígeno molecular generando radicales superóxido.

El acetaldehído es un compuesto por si mismo muy tóxico que actúa a través de varios mecanismos: a) uniéndose por enlaces covalentes, entre otros, a productos de la peroxidación lipídica, a proteínas de membrana y enzimáticas, alterando su función y estructura y de esta forma se generan neoantígenos que condicionan una respuesta inmune; b) también es capaz de unirse a proteínas circulantes como la albúmina y la transferrina afectando a la función de estas proteínas en el plasma; c) aumentando la peroxidación de los lípidos de membrana con producción secundaria de radicales libres capaces de multitud de efectos deletéreos; d) uniéndose a proteínas citosólicas alterando su función.

**Figura 1. Vías metabólicas del etanol y el acetaldehído**

Alcohol deshidrogenasa (citosol)	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} \xrightarrow{\text{NAD}} \text{CH}_3\text{CHO} + \text{H}^+$ $\text{NAD} \rightleftharpoons \text{NADH}$
MEOS (Retículo endoplásmico liso)	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{H}^+ + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{NADPH}} \text{CH}_3\text{CHO} + 2 \text{H}_2\text{O}$ $\text{NADPH} \rightleftharpoons \text{NADP}$
Catalasa (Peroxisomas y mitocondrias)	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{CH}_3\text{CHO} + 2\text{H}_2\text{O}$
Xantino-oxidasa	$\text{hipoxantina} + \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 \longrightarrow \text{xantina} + \text{H}_2\text{O}_2$
NADPH-oxidasa	$\text{NADPH} + \text{H}^+ + \text{O}_2 \longrightarrow \text{NADP} + \text{H}_2\text{O}_2$
Acetaldehído-deshidrogenasa	$\text{CH}_3\text{CHO} \xrightarrow{\text{NAD}} \text{CH}_3\text{COOH}$ $\text{NAD} \rightleftharpoons \text{NADH}$
Xantino-oxidasa	$\text{CH}_3\text{CHO} \xrightarrow{\text{O}_2} \text{CH}_3\text{COOH}$ $\text{O}_2 \rightleftharpoons \text{O}_2^-$

### 1.2.3. EFFECTOS ORGÁNICOS DEL ALCOHOL.

El etanol es un tóxico sistémico que bien por sí mismo, por sus metabolitos o por las deficiencias nutricionales derivadas de su consumo excesivo, provoca efectos intensos y deletéreos sobre el metabolismo proteico, probablemente en cualquier órgano o sistema. Los mecanismos mediante los cuales el etanol induce lesión orgánica son múltiples: alteración de la fluidez de membrana, daño oxidativo, puentes de acetaldehído, metabolismo de los eicosanoides, hipoxia, daño inmune, activación de células de Ito, etc (French, 1991). Más adelante pasaremos a describir dichos efectos prestando especial atención a los provocados en el hígado, órgano donde tiene lugar el metabolismo del alcohol; el músculo, principal reservorio proteico del organismo y el hueso, dado el interés creciente y la reciente controversia sobre los efectos provocados por el etanol en el esqueleto.

## 1.3. MÚSCULO.

### 1.3.1. MORFOLOGÍA Y FISIOLOGÍA MUSCULAR.

El músculo es el tejido más abundante de nuestro organismo. El 42% del cuerpo humano está constituido por músculo estriado y aproximadamente un 10% por músculo liso y cardiaco. Es la mayor reserva proteica de nuestro organismo, jugando un papel clave en el metabolismo energético y proteico. Contiene el 90% de los aminoácidos libres del organismo y sintetiza la mitad de las proteínas totales (Rennie et al., 1982). Está compuesto por: 72% de agua, 20% de proteínas, 5% de lípidos, 2% de constituyentes orgánicos e inorgánicos y un 1% de hidratos de carbono. Su función fundamental es la de desarrollar la fuerza necesaria para el mantenimiento de las actitudes corporales y permitir los desplazamientos. Además secundariamente producir calor, función que puede adquirir carácter prioritario en determinadas circunstancias como la fiebre.

La base estructural es la fibra muscular, que consta de los siguientes elementos: la membrana o *sarcolema*, los núcleos situados inmediatamente por debajo de ella, el *sarcoplasma* en el que se encuentra la mioglobina, las *miofibrillas*, las mitocondrias y una compleja red de túbulos. No todas las fibras musculares tienen la misma estructura y función. Se diferencian 3 tipos de fibras musculares:

**Fibras tipo I, de contracción lenta y sostenida o “slow twitch”**, ricas en mitocondrias y por tanto en enzimas oxidativas y pobres en glucógeno y fosforilasas, así como pobres en actividad ATPasa cuando son incubadas a pH 9.4. Obtienen su energía mediante el metabolismo aerobio de la glucosa y ácidos grasos (abundantes en este tipo de fibras) y están especialmente dispuestas para contraerse de forma lenta y sostenida. Tienen mayor proporción de capilares rodeándolas.

**Fibras tipo II A.** Poseen características intermedias. Poseen abundantes depósitos de glucógeno y mayor cantidad de mitocondrias que las II B. Son de metabolismo oxidativo-glucolítico y son aptas para una contracción rápida y relativamente sostenida.

**Fibras tipo II B, de contracción rápida y agotable o “fast twitch”**, con gran contenido de glucógeno y fosforilasa, con fuerte actividad ATPasa, mientras que son pobres en mitocondrias y por tanto en actividad oxidativa. Liberan la energía a base de glucólisis anaerobia con glucógeno como sustrato, son aptas para la contracción rápida y pasajera.

**Fibras tipo II C**. Son fibras precursoras de las maduras y tienen características intermedias entre las fibras II A y II B.

Existe gran variabilidad en el diámetro y la distribución de las fibra musculares. En humanos se produce un aumento lineal en el tamaño de las fibras musculares, llegando a alcanzar un diámetro aproximado de 40  $\mu\text{m}$  a los 20 años. También por sexos hay diferencias; en los varones el diámetro es mayor en los tres tipos de fibras. Además, si se analizan los distintos grupos musculares, se aprecia porcentajes variables de los distintos tipos de fibras, por lo que si queremos comparar la proporción de fibras de distintos animales tendremos que extraer muestras del mismo grupo muscular y aplicar técnicas de tinción iguales. El músculo gastrocnemio tiene mayor proporción de fibras de contracción rápida, modelo por tanto ideal para estudiar la atrofia de las fibras tipo II y por este motivo fue escogido en nuestro trabajo. Por el contrario, el músculo sóleo tiene preponderancia de fibras tipo I. Además estas fibras se distribuyen en el músculo en tres áreas bien definidas: área A, la más pequeña y con fibras tipo I y II B; área B, la más medial y con fibras tipo II A y II B y área C, la mayor y compuesta de fibras tipo II A y II B con ausencia de fibras tipo I (González Hernández et al., 1989). Además el músculo es un tejido en continua remodelación para adaptarse a las funciones que se le exige. Ejemplo de esto son los cambios musculares de los corredores de fondo en los que se produce un aumento de las fibras tipo I (Staron et al., 1984).

La inervación es especialmente importante, dada la dependencia que las fibras musculares mantienen con respecto al sistema nervioso para su función. Cada fibra nerviosa controla un número variable de fibras musculares, entre 10 y 150, que forman una unidad motora. Este control se establece mediante sinapsis con cada una. La estructura a nivel de la cual enlaza el nervio y el músculo es la placa motora.

La estimulación, contracción y relajación de la fibra muscular induce una serie de fenómenos que se inician con la despolarización de la membrana de la fibra muscular, desencadenada por la unión de la acetilcolina, liberada desde la fibra nerviosa, a sus receptores. Esta despolarización genera un potencial de acción que se extiende por toda la superficie de la fibra, y a través del sistema tubular transverso, alcanza el interior liberando Ca del retículo endoplásmico. El calcio, actuando sobre la troponina y tropomiosina liberan el freno que estas proteínas suponen para la interacción entre la actina y la miosina produciéndose el acoplamiento entre ambas y acortándose la fibra. El alcohol induce un efecto inhibitorio sobre el flujo de calcio a través del sarcolema provocando una reducción en el acoplamiento de los miofibrillos (Nicolas et al., 1998; Cofan et al., 2000). Cuando cesa la estimulación la membrana se repolariza, el Ca entra dentro del retículo endoplásmico y la fibra se relaja.

Este proceso consume energía, pero el músculo está especialmente dotado para obtener la energía que precisa. A continuación pasaremos a detallar las distintas fuentes energéticas de las que dispone el músculo para llevar a cabo su función.

### 1.3.2. METABOLISMO MUSCULAR.

La contracción muscular depende de la energía suministrada por el ATP. Pero el ATP del que dispone el músculo solo es suficiente para mantener la contracción durante unos segundos. Sin embargo, una vez que el ATP se desdobra a ADP, este puede ser fosforilado para generar de nuevo ATP. La refosforilación se puede llevar a cabo mediante distintas vías.

El glucógeno al degradarse enzimáticamente para generar ácido láctico y pirúvico libera energía para convertir ADP en ATP. Esta glucólisis genera ATP a una velocidad 2,5 veces más rápida que la síntesis de ATP a partir de combustibles orgánicos que reaccionan con el oxígeno. Además esta génesis de ATP puede lograrse en ausencia de oxígeno, de forma que, durante un corto periodo de tiempo aproximadamente 1 minuto, puede mantenerse la contracción en condiciones anaerobias. El ATP generado tras la degradación del glucógeno también puede emplearse para la formación de fosfocreatina. El alcohol produce un incremento en las

concentraciones de glucógeno y una disminución de la actividad de la piruvatocinasa (Vernet et al., 1995).

La fosfocreatina, sustancia de alto nivel energético que existe como depósito en el músculo en reposo, es también una fuente para la refosforilación al contener un enlace de fosfato de alta energía. Durante la contracción se desdobra en creatina y fosfato, pero sólo permite contracciones durante siete u ocho segundos.

La última fuente de energía y, la más importante, ya que supone un 95% de ésta, es la que procede de la combinación de sustratos como las proteínas, los carbohidratos y los lípidos con oxígeno para liberar ATP, mediante metabolismo oxidativo. A continuación pasamos a exponerlas:

### **Metabolismo de los carbohidratos.**

La glucosa, producto final de la absorción de los carbohidratos, una vez en el interior celular puede almacenarse en forma de glucógeno o sufrir un proceso de fosforilación mediado por la hexocinasa, transformándose en glucosa-6-fosfato, sustrato para la obtención de energía.

### **Metabolismo de los lípidos**

Constituye la fuente de energía más importante en el músculo en reposo y durante la contracción. La gran mayoría de la degradación inicial de los ácidos grasos ocurre en el hígado, pero este órgano no emplea esa cantidad de ácidos grasos para su propio metabolismo, sino que los exporta hacia otros, entre ellos el músculo, en forma de ácido acetoacético para su consumo. Una gran parte del ácido acetoacético se transforma en ácido beta-hidroxibutírico y en pequeñas cantidades de acetona. A estas tres últimas moléculas se les denominan cuerpos cetónicos y se acumulan en todas aquellas circunstancias en las que se produce una ausencia de metabolización de carbohidratos.

### **Metabolismo de las proteínas**

Todas las proteínas del organismo están en un continuo proceso de síntesis y degradación. La tasa de recambio proteico es de una a dos semanas en el músculo. Existen dos sistemas de degradación proteica uno intralisosomal, mediado por proteasas

ácidas e hidrolasa, y otro intracitoplasmático que incluye varios sistemas, el más importante de los cuales es la vía ubiquitina-proteasoma. El músculo es el principal reservorio de proteínas, que en situaciones de ayuno serán usadas para la neoglucogénesis y para la síntesis hepática de proteínas de transporte, reactantes de fase aguda, etc..., lo que provoca emaciación muscular.

### 1.3.3. MIOPATÍA ALCOHÓLICA.

El consumo crónico de alcohol provoca miopatía en el 50-60% de los alcohólicos (Preedy et al., 1990a). La miopatía alcohólica es la patología músculo esquelética más prevalente en Occidente (Preedy et al., 2001a). Muy probablemente casi todos los pacientes con una ingesta etílica mayor de 100 g/día durante varios años presentan cambios ultraestructurales musculares. De éstos, alrededor de la mitad presenta cambios en el microscopio óptico y entre un 30-40% del total refiere manifestaciones clínicas de miopatía. Estos cambios parecen estar relacionados con el consumo total de alcohol por kg de peso del paciente y son reversibles parcialmente con la abstinencia enólica (Fernández Sola et al., 1996) o con la reducción de la ingesta alcohólica (Fernández Sola et al., 1998) hasta valores de consumo menores de 60 g/día (Fernández Sola et al., 2000). El consumo de alcohol no afecta sólo al músculo esquelético sino también al cardíaco. Varios autores han relacionado estas dos entidades clínica e histológicamente (Fernández Sola et al., 1994; Urbano Márquez et al., 1995). Haller en 1984 describió dos síndromes asociados al consumo de alcohol, uno agudo caracterizado por necrosis muscular y otro crónico donde lo que predominaba era la debilidad y la atrofia muscular. Desde el punto de vista anatómico-clínico la podemos clasificar en dos grupos (aunque para algunos autores hay una tercera forma), que a continuación pasamos a describir:

**Miopatía alcohólica aguda.** Consiste en una necrosis muscular aguda cuya gravedad varía desde una rabdomiolisis intensa a formas asintomáticas, en las que sólo se observa una elevación transitoria de las transaminasas. La rabdomiolisis aguda suele aparecer tras un episodio de ingesta importante y se caracteriza por dolor súbito, hinchazón y debilidad en uno o varios grupos musculares (también denominado pseudotromboflebitis). La lesión muscular se refleja en una elevación de la aldolasa, la

aspartato-aminotransferasa, la creatincinasa, la lactatodeshidrogenasa y mioglobinuria. La complicación más frecuente es la insuficiencia renal por la mioglobinuria. Sin embargo, en la mayoría de los casos, el proceso es autolimitado. Microscópicamente se afectan tanto las fibras tipo I como las tipo II, pero predominantemente las primeras, y las lesiones que pueden aparecer varían desde la degeneración de Zenker a la destrucción total de la fibra. Ultraestructuralmente se caracteriza por la aparición de un infiltrado linfoplasmocitario y múltiples puntos de necrosis (Ferraz et al., 1989). La incidencia de este cuadro es baja, afectando aproximadamente a un 1% de los alcohólicos.

**Miopatía alcohólica crónica.** Se caracteriza por una progresiva pérdida de masa muscular, (hasta en un 30%) y debilidad que afecta de manera predominante a los grupos musculares proximales, especialmente en las piernas (Haller, 1984). Suele ser indoloro, muchas veces subclínica y se asocia con frecuencia a malnutrición. Microscópicamente se aprecia atrofia selectiva de las fibras tipo II (fibras glicolíticas y de contracción rápida) con una reducción media de el 33% de su diámetro, fundamentalmente la fibras II B (Martín et al., 1984), mientras que las tipo I se ven poco afectadas e incluso hipertrofiadas en fases iniciales. En la miopatía muy avanzada también se han descrito reducción del diámetro de las fibras tipo I. La atrofia de las fibras tipo II B coexiste con la depleción de algunas enzimas glicolíticas como la aldolasa, la piruvatocinasa y la lactatodeshidrogenasa (Trounce et al., 1990). La fibrosis e inflamación no son hallazgos frecuentes y ocasionalmente se encuentran depósitos de grasa. Ultraestructuralmente se aprecian alteraciones en las mitocondrias que aparecen con menor perímetro y área ya desde fases muy iniciales del proceso de daño muscular (Del Villar et al., 1984) y la necrosis de las fibras no se observa con frecuencia (Salisbury et al., 1992). La incidencia de esta forma de miopatía no es bien conocida dado su escasa sintomatología, pero se calcula en torno al 50% (Urbano Márquez et al., 1989).

#### 1.3.3.1. ETIOPATOGENIA.

Aunque estudiado de forma extensa, el mecanismo etiopatogénico de la miopatía alcohólica aún permanece por aclarar. Son muchos los factores que han contribuido a ralentizar el estudio de esta patología. Por un lado, la dificultad para obtener muestras

musculares humanas, para lo cual se tuvieron que desarrollar modelos animales en los cuales músculos esqueléticos anatómicamente distintos se han empleado para reflejar el comportamiento de las fibras tipo I (músculo sóleo) y las tipo II (músculo plantar); y por otro lado la complejidad de factores que rodean al alcoholismo y el metabolismo del alcohol como el peculiar estilo de vida del alcohólico, que provoca un deterioro nutricional que puede potenciar los efectos mediados por el alcohol, la presencia de patología concomitante que igualmente podría contribuir al establecimiento de la miopatía o el daño provocado por el etanol por sí mismo y por sus metabolitos. Entre los factores coexistentes descritos destacan:

**-Malnutrición.** El papel de la malnutrición proteica en la patogenia de la miopatía alcohólica es aún objeto de controversia a pesar de haber sido estudiada por diversos autores. Existen grupos que apoyan la teoría de que la malnutrición proteica no juega un papel relevante en la génesis de la miopatía pese a observar que esta entidad se expresa de forma más intensa en los pacientes con ingestas mayores, que son a su vez los peor nutridos. Las aportaciones científicas a este respecto serán discutidas en un apartado posterior.

**-Neuropatía alcohólica.** La neuropatía ha sido observada con mayor frecuencia en los pacientes con atrofia de las fibras tipo II, con respecto a los que no tienen atrofia. Sin embargo la mayoría de los pacientes que tienen atrofia de las fibras tipo II no tienen neuropatía periférica. En un estudio donde se comparan a 250 sujetos alcohólicos con sujetos con ingesta mínima de alcohol (menor de 20 g/d) se observó que un 16% de los alcohólicos frente a un 0% de los no alcohólicos, tenían criterios de neuropatía, mientras que la miopatía aparecía en un 47% de los alcohólicos frente a un 5% de los controles (Estruch et al., 1993). Andersen et al., en 1998 no encontraron relación alguna entre el desarrollo de atrofia muscular y el de neuropatía o la severidad de la enfermedad hepática. Igualmente Mills et al., en 1986 encontraron que la miopatía crónica alcohólica era debida al efecto del etanol sobre la fibra muscular y no secundariamente a la neuropatía periférica. Por tanto la neuropatía podría contribuir a los cambios histológicos del músculo del alcohólico, pero ocurre de forma independiente.

**-Hepatopatía.** La disfunción hepática se ha señalado mecanismo patogénico de la miopatía alcohólica. En un estudio en 44 pacientes alcohólicos se observó que la

cardiomiopatía y la cirrosis hepática eran más frecuentes en aquellos con miopatía alcohólica (Sacanella et al., 1995). Sin embargo otros como Andersen et al., en 1998, no encontraron relación entre el grado de disfunción hepática y la miopatía alcohólica. Tampoco Martín y Peters en 1985, en pacientes alcohólicos, ni Preedy et al., en 1990b en ratas con cirrosis inducida con tetracloruro de carbono (CCL4) encuentran que la miopatía se produzca en relación con la enfermedad hepática.

**-Alteraciones endocrinas.** El alcohol produce hipogonadismo en relación con el tiempo total de consumo (Villalta et al., 1997). Se han observado disminución de las concentraciones plasmáticas de testosterona y atrofia testicular, no solo por efecto directo del etanol sino también por la malnutrición concomitante (González Reimers et al., 1994). El alcohol no sólo origina un hipogonadismo primario sino un defecto en la secreción de gonadotrofinas (Van Thiel et al., 1980). También han sido descritas, aumento de las concentraciones plasmáticas de cortisol durante todo el tiempo que persiste la ingesta, inhibición de la secreción de vasopresina al ascender la concentración plasmática de alcohol y el fenómeno opuesto al descender al alcoholemia, disminución moderada de la T<sub>4</sub> y más acusada de la T<sub>3</sub> y reducciones en las concentraciones plasmáticas de IGF-1. Hay un estudio que demuestra que el IGF-1 está disminuido en alcohólicos y cirróticos y en éstos se relaciona más con el grado de insuficiencia hepática que con la malnutrición. Además se acompaña de un aumento de la GH (Santolaria et al., 1995).

**-Alcohol y sus metabolitos** que pueden ejercer efecto directo sobre el músculo y cualquier órgano mediante: disminución de la síntesis proteica por reducción del RNA ribosómico y por aumento de las RNAsas (Preedy et al., 2001a); perturbaciones en las membranas celulares (Adachi et al., 2003a) y en las proteínas de las membranas relacionadas con señales intracelulares, en particular las asociadas a la homeostasis del calcio (Ohlendieck et al., 2003); alteración del potencial transmembrana de las fibras musculares y reducción del contenido de fósforo, magnesio y potasio (Preedy et al., 2001a); formación de enlaces covalentes entre proteínas y acetaldehído y malonildialdehído en músculos con predominancia de fibras tipo II (Nimela et al., 2002); alteración de la proteólisis; disminución de los niveles de  $\alpha$  tocoferol que puede predisponer al daño tisular (Preedy et al., 2001a); daño por radicales libres (ROS); disminución de la proliferación celular muscular durante el inicio de esta fase y retraso

en la diferenciación del músculo esquelético (Garriga et al., 2000). Recientemente además se ha descrito presencia de la apoptosis en el músculo esquelético de grandes bebedores, sobre todo en aquellos afectados de miopatía (Fernández Sola et al., 2003) y se ha sugerido que la sobreexpresión de determinados pro-oncogenes (c-myc) inducida por el etanol y el acetaldehído pueden activar vías transcripcionales preapoptóticas proceso este que puede ser potenciado por la malnutrición (Nakahara et al., 2003).

#### 1.3.3.2. EFECTOS DEL ALCOHOL SOBRE LA SÍNTESIS PROTEICA.

El etanol y el acetaldehído son potentes inhibidores de la síntesis de proteínas tanto si se administra de forma aguda o crónica (Preedy et al., 1994a). Este deterioro de la síntesis proteica se ha objetivado tanto en el músculo liso gastrointestinal (Preedy et al., 1999a) como en el estriado esquelético (Preedy et al., 2001a), efecto compartido por la malnutrición proteica (Svanberg et al., 2000). Este deterioro de la síntesis de proteínas afecta tanto a las cadenas pesadas de miosina como a las de titina y nebulina causando disfunción muscular (Hunter et al., 2003). El efecto del alcohol sobre la síntesis de proteínas afecta predominantemente a los músculos con mayor contenido de fibras tipo II (Preedy et al., 1988). La reducción de la síntesis proteica puede llegar a ser de un 40% en alcohólicos con alto consumo de etanol, mayor de 100 g. durante más de 10 años, según pudieron observar Pacy et al., en 1991. Estudios recientes experimentales demuestran que el deterioro inducido sobre el metabolismo proteico por el consumo crónico de alcohol es reversible, demostrando una normalización de la síntesis de proteínas en el músculo esquelético y cardíaco tras la supresión del alcohol (Vary et al., 2004). Son varios los mecanismos implicados en este deterioro de la síntesis proteica :

A) Disminución del contenido de RNAm por aumento de la degradación de éste, (incremento de la actividad de las RNasa), fundamentalmente en los músculos con alto contenido en fibras tipo II como el plantar (Preedy et al., 2001b), aunque en algunos estudios, en ratas alimentadas con alcohol siguiendo el modelo de Lieber de Carli, se ha podido apreciar una disminución de la cantidad de RNAm total sin un efecto manifiesto sobre el RNAm que condiciona la síntesis de las proteínas de las miofibrillas a pesar de una marcada reducción en el contenido de miosina.

B) Alteración del proceso de traslación de proteínas que es modulado por el acetaldehído afectando tanto a proteínas contráctiles como no contráctiles y que en principio no depende de disponibilidad de los aminoácidos, disfunción endocrina o hepática ni malnutrición (Preedy et al., 1994b). Se cree que este deterioro de la traslación se debe a una reducción intensa del factor 4E provocada por el etanol (Molina et al., 2002) en el músculo y el factor de iniciación 2B en el hígado (Lang et al., 2000b). Dicho factor controla la unión del RNAm al complejo de preiniciación 43S, proceso del que depende el inicio de la síntesis de proteínas. Este efecto potenciado por el etanol es más marcado en los músculos ricos en fibras tipo II según se ha apreciado (Lang et al., 1999a). Se ha comprobado como este proceso molecular deteriorado por el alcohol se reestablece tras la abstinencia (Vary et al., 2004).

C) Resistencia periférica a la insulina. La insulina es un potente estimulador de la síntesis de proteínas. El consumo crónico de alcohol provoca un aumento de la insulina circulante. Este hiperinsulinismo, junto con el deterioro de la síntesis proteica en el alcoholismo, hace pensar en una situación de resistencia periférica (Preedy et al., 2001b). La administración aguda y crónica de alcohol provoca un descenso en la concentración de los niveles de IGF-1 (Lang et al., 2000a), quedando por definir el papel de estos factores de crecimiento. En este sentido, Hong-Brown et al., en 2001, observaron que la capacidad de estimular la síntesis proteica de el IGF-1 y la insulina se veía disminuida en un 30 y 60% respectivamente en miocitos incubados con etanol durante 72 horas. Por otro lado Lang et al., en 2001 apuntan que un defecto en la disponibilidad o efectividad de determinadas hormonas anabolizantes, como el IGF-1, pudiera estar relacionado con el deterioro de la síntesis proteica y el inicio de la traslación. Más recientemente en estudios in vivo se ha evidenciado que el aumento, hasta magnitudes similares a las observadas en circunstancias hipercatabólicas, de los valores de proteínas fijadoras del IGF-1 (IGFBP-1) (que provocan una disminución en las concentraciones de IGF-1 libre y una elevación del RNAm que codifica dichas proteínas fijadoras en el hígado y los riñones) es capaz de disminuir selectivamente la síntesis de proteínas en las fibras musculares tipo II (Lang et al., 2003). Todos estos datos parecen apoyar claramente el papel del IGF-1 como mediador de la miopatía crónica alcohólica (Lang et al., 2004).

1.3.3.3. EFECTOS DEL ALCOHOL SOBRE LA DEGRADACIÓN DE PROTEÍNAS.

La degradación proteica en el músculo sigue dos vías: A) la vía lisosomal, encargada de la destrucción de proteínas extracelulares, bacterianas y proteínas de las membranas celulares, como los receptores de membrana, a través de proteasas ácidas e hidrolasas presentes en los lisosomas. No es una vía importante cuantitativamente en lo que se refiere al recambio de la mayoría de las proteínas celulares o en situaciones de estrés catabólico. Está parcialmente inhibida por aminoácidos e insulina. B) Una vía citosólica que incluye varios sistema, de ellos el más importante el sistema ubiquitina/ proteosoma (Weber et al., 1992). Esta vía se encarga de la destrucción de proteínas anormales, proteínas de vida media corta como las enzimas y de vida media larga como las contráctiles del músculo y es la responsable de la destrucción proteica acelerada en las situaciones hipercatabólicas. La actividad de este sistema es estimulada por glucocorticoides, hormona tiroidea, PGE2 y varias citocinas como IL-1, IL-6 y TNF $\alpha$  liberadas en situaciones de sepsis, acidosis, ayuno, etc... (Mitch et al., 1996).

Existen estudios contradictorios a cerca del efecto del alcohol sobre la degradación de proteínas. En 1985 Martin y Peters no encontraron diferencias significativas en la degradación de proteínas musculares entre sujetos alcohólicos crónicos ni controles. Rodríguez Rodríguez et al., en 1995 encontraron niveles de citocinas aumentados en sujetos con hepatitis aguda alcohólica, estando bien establecida la situación de hipercatabolismo en el alcoholismo (Mendehall et al., 1984). Recientemente se ha observado que una administración aguda de alcohol añadida a una situación basal de consumo crónico de alcohol reduce la actividad de proteasas y aminopeptidasas citoplámicas (Koll et al., 2002).

1.3.3.4. EFECTOS MEDIADOS POR RADICALES LIBRES (ROS).

El alcohol y su metabolito más importante, el acetaldehído, favorecen no sólo un aumento en la producción de ROS sino también una importante alteración de los mecanismos de defensa frente a estos compuestos.

## 1.3.3.4.1. RADICALES LIBRES.

Se entiende por radical libre a aquella materia cuyas moléculas poseen un número impar de electrones y por ello son extremadamente inestables y efímeros. Cuando una molécula pierde uno o más electrones sufre una oxidación mientras que si los gana se trata de una reducción. Existen múltiples reacciones químicas que generan radicales libres: carbono trivalente, nitrógeno divalente, oxígeno monovalente, sustancias altamente reactivas, capaces de reaccionar con múltiples compuestos orgánicos y desarrollar daño celular. En general los radicales libres son tanto más peligrosos cuanto mayor es su agresividad química, persistencia, concentración y duración de su acción. Los radicales libres mas importantes son:

Radical superóxido ( $O_2^-$ ). Es una variedad del oxígeno molecular que se forma a partir del  $O_2$  por captura de un electrón. Relativamente inestable y con vida media de unos milisegundos.  $O_2 + e^- = O_2^-$

Peróxido de hidrógeno o agua oxigenada ( $H_2O_2$ ). Se forma del radical superóxido, proceso que es acelerado por la superóxidodismutasa. Es bastante estable.  $2 O_2 + 2 H^+ = H_2O_2 + O_2$

Radical oxhidrilo ( $OH^-$ ). Su precursor inmediato es el peróxido de hidrógeno que en presencia de ión ferroso libre da radical hidroxilo. Es uno de los radicales más lesivos con gran facilidad para la penetración en membranas celulares y destrucción de sus lípidos y proteínas.  $H_2O_2 + Fe^{2+} = HO^- + HO^- + Fe^{3+}$ .

La metabolización del acetaldehído a acetato mediante la enzima xantino-oxidasa, promueve la reducción de oxígeno molecular a anión superóxido, con el consiguiente aumento de éste a nivel intracelular.

Además el consumo crónico de alcohol produce activación de la enzima microsomal NADPH P<sub>450</sub> oxidasa, que activa al  $O_2$  en presencia de  $Fe^{2+}$  e induce específicamente un componente del citocromo p450 con transferencia electrónica espontánea al  $O_2$ .

Una vez formado el anión superóxido es transformado en agua oxigenada por el sistema enzimático de la superóxidodismutasa, grupo de metaloenzimas dependientes de zinc, cobre y manganeso.

El anión superóxido puede destruir grupos tioles y residuos de triptófano de proteínas, inactivar ribonucleasas y peroxidar lípidos insaturados de las membranas nucleares con la consiguiente producción de sustancias con toxicidad diversa como: cetonas, ésteres, agua oxigenada y aldehídos.

#### 1.3.3.4.2. MECANISMOS ANTIOXIDANTES

Se entiende por antioxidantes a aquellos compuestos capaces de oponerse a la acción del oxígeno y de ciertos radicales oxidantes. Los principales presentes en el organismo son las vitaminas C y E y el glutatión.

El glutatión. Es un tripéptido que contiene azufre. En presencia de glutatión peroxidasa, enzima que tiene como cofactor al selenio reduce el agua oxigenada a agua transformándose en glutatión oxidado, reacción en la que se producen radicales de azufre monovalentes y relativamente estables por lo que no son nocivos. El acetaldehído se une de forma covalente al glutatión reducido alterando su función. Por otro lado la deficiencia de selenio, que se ha asociado a la malnutrición proteica, puede jugar un papel relevante en la defensa frente a los ROS (Lee et al., 1994).

Vitamina C. Es hidrosoluble por lo que su efecto neutralizador de radicales libres se manifiesta en materia acuosa. Los radicales libres inertes reaccionan con la vitamina C. Destruye ciertos radicales formados en el propio organismo o de productos que se ingieren o inhalan así como otros originados por radiaciones ultravioletas.

Vitamina E (alfa tocoferol). Es liposoluble por lo que su función antioxidante se efectúa principalmente en los lípidos, jugando un papel fundamental en la protección de las membranas celulares. Interrumpe la cadena de peroxidación de los lípidos insaturados.

Superóxidodismutasa. Metaloenzima detoxificadora de radicales libres de oxígeno que cataliza una reacción en la que partiendo de dos aniones superóxido y dos hidrogeniones se forma una molécula de agua oxigenada y otra de oxígeno. Existe una forma que contiene manganeso localizada preferentemente en las mitocondrias y otra conteniendo zinc y cobre que se localiza fundamentalmente en el citosol. Los déficits dietéticos de zinc, cobre y manganeso podrían teóricamente aumentar la susceptibilidad al daño producido por el alcohol.

El etanol, por sí mismo o a través de otros factores asociados como la malnutrición o la deficiencia de ciertos oligoelementos puede alterar los mecanismos defensivos frente al exceso de radicales libres (Girre et al., 1990), disminuye las concentraciones intrahepatocitarias de glutathion (Fernández Checa et al., 1989), disminuye las concentraciones hepatocitarias y séricas de selenio (Dworkin et al., 1985; Boleda et al., 1989) afecta a la absorción de vitamina E bien de forma directa o bien a través de la malabsorción lipídica propia de la hepatopatía, disminuye la actividad de la superóxidodismutasa (Arthur et al., 1985) y provoca alteraciones en el ácido ascórbico (Kawase et al., 1989).

#### 1.3.3.4.3. RADICALES LIBRES Y MIOPATÍA.

Los ROS pueden contribuir a los cambios musculares que se producen en el alcoholismo. El daño oxidativo puede ser debido tanto al etanol y sus metabolitos como a la malnutrición proteica. Las fibras musculares tipo II son las más sensibles a este daño y las primeras en afectarse. Preedy et al., 1990a describieron concentraciones plasmáticas de selenio (cofactor de gran número de enzimas, entre ellas la GPX) y alfa tocoferol disminuidas en alcohólicos con miopatía e incluso una reducción en las concentraciones musculares de alfa tocoferol. Posteriormente en 1992 Ward et al. describen resultados similares a los previos de Preedy: encuentran reducción de los valores plasmáticos medios de  $\beta$ -carotenos, zinc y selenio en alcohólicos frente a controles y los  $\beta$ -carotenos disminuían en plasma a medida que era mayor el daño hepático existente. Sin embargo el  $\alpha$  tocoferol solo estaba descendido en pacientes con cirrosis, y cuando se analizó el estado antioxidante en pacientes con miopatía alcohólica se puso de nuevo en evidencia la descrita reducción de los valores de selenio y  $\alpha$  tocoferol, que no estaba presente en pacientes con biopsia muscular normal. Otros

autores, por el contrario, describen resultados opuestos, Fernández Sola et al en 1998 no encontraron diferencias significativas en los valores musculares y sérico de  $\alpha$  tocoferol, ácido ascórbico y retinol. El déficit de selenio y alfa tocoferol pueden causar miopatía (Lang et al., 1987), aunque los suplementos con alfa tocoferol no han mostrado que amortigüen los efectos deletéreos del alcoholismo sobre el metabolismo proteico en el músculo esquelético (Koll et al., 2003). Igualmente se ha descrito disminución de la carnosina plasmática, dipéptido con propiedades antioxidantes, en alcohólicos con miopatía. En ratas se han descrito elevaciones de los niveles circulantes de troponina T en presencia de alcohol, mecanismo éste adscrito al daño mediado por radicales libres (Preedy et al., 1999b). Además un estudio reciente en alcohólicos crónicos de Fernández Sola et al., en 2002, donde se analizaba la actividad de diversos sistemas antioxidantes (GPX y SOD) y la influencia sobre estos de la malnutrición, la miopatía y el alcoholismo, puso de manifiesto la existencia de una alteración de los sistemas antioxidantes que no se relacionaba con los parámetros nutricionales, la miopatía ni el consumo de alcohol. Todo lo comentado anteriormente ha contribuido a generar gran controversia sobre el papel de los ROS en la patogenia de la miopatía alcohólica. Quizás en este sentido juegue algún papel el manganeso, oligoelemento usado como cofactor de la SOD, y que en situaciones de malnutrición, asociadas con gran frecuencia al alcoholismo, puede verse disminuido.

También los radicales libres de oxígeno pueden conducir a un incremento en el catabolismo proteico a través del aumento de la actividad del sistema ubiquitina /proteasoma mediado por el TNF $\alpha$  (Reid y Li, 2001). Además el TNF $\alpha$  puede deteriorar la síntesis de proteínas del músculo esquelético (sarcoplásmicas y de las miofibrillas) y cardiaco también mediante disminución del proceso de traslación del RNAm, al provocar una menor disponibilidad de factores de iniciación de la traslación (Lang et al., 2002). Algunos datos sugieren que el consumo crónico de etanol incrementa el estrés oxidativo muscular (Fujita et al., 2002).

Recientemente se ha aportado evidencia de que el alcohol induce defectos en la biomembranas, incluida la formación de enlaces covalentes proteicos con el acetaldehído, principalmente en las fibras musculares tipo II (Niemela et al., 2002) e incremento en la actividad de la Ca ATPasa de los retículos sarcoplásmico y endoplásmico. Concomitantemente se ha observado un incremento de los

hidroxiperóxidos de colesterol y los oxisteroles reflejando posiblemente que el daño de las membranas es mediado por radicales libres (Adachi et al., 2003b).

#### 1.3.4. MIOPATIA Y MALNUTRICIÓN.

El papel que juega la malnutrición, patología que con alta frecuencia acompaña al alcoholismo, per se, en la génesis de la patología muscular alcohólica ha sido objeto de estudio y controversia. Algunos autores defienden que la toxicidad de la dosis acumulada del etanol tiene un efecto directo etiopatogénico en el desarrollo de las enfermedades relacionadas con el alcohol, como lo es la miopatía, mientras otros defienden el efecto coadyuvante de la malnutrición asociada sobre la aparición de la miopatía. La pérdida rápida de proteínas musculares durante la inanición se debe primordialmente a un incremento en las tasas de destrucción proteica y a una activación de los procesos proteolíticos dependientes de ATP no lisosomales, como es la vía ubiquitina-proteasoma (Wing et al., 1995), vía ésta que aumenta su expresión en músculos atróficos (Medina et al., 1995).

Como comentábamos previamente, algunos autores no han encontrado relación entre el estado nutricional, la presencia de cirrosis o neuropatía y la atrofia muscular del alcohólico (Preedy, 1990a). Estruch et al., en 1993 estudiando a 250 alcohólicos encontraron que la única variable que se asoció de forma independiente al desarrollo de complicaciones del alcoholismo, como cirrosis, miopatía, etc., fue la dosis acumulada de alcohol a lo largo de la vida, sin embargo sí encontraron que los pacientes que presentaban cirrosis y neuropatía mostraban parámetros antropométricos nutricionales e IMC más bajos. En otro estudio llevado a cabo en alcohólicos con y sin miopatía en el que se estudiaron varios parámetros relacionados con el estado nutricional, la atrofia de las fibras tipo II encontrada en el músculo cuádriceps no se relacionaba con el estado nutricional de los sujetos (Duane et al., 1988). Más recientemente, estudios que ponen de manifiesto el efecto directo del alcohol sobre las membranas celulares y la producción de radicales libres, no apoyan que las alteraciones musculares se deban a deficiencias nutricionales (Adachi et al., 2003a). Essen et al. en 1981 sugería en pacientes anoréxicos adolescentes que la reducción de peso e IMC que mostraban, se relacionaba con una pérdida de la masa muscular esquelética originada por una atrofia

de todos los tipos de fibras musculares y en especial las fibras tipo II A. También en estudios experimentales se ha apreciado que la malnutrición tiene efectos per ser en la estructura y funcionalidad de los músculos respiratorios (Kelsen, 1986) a expensas de una reducción del área de las fibras de contracción rápida (Kelsen et al., 1985), Martín et al., en 1985b encontró relación entre la intensidad de la atrofia de las fibras tipo II y parámetros nutricionales como el IMC y la circunferencia del brazo, aunque la atrofia de las fibras tipo II también se asoció a la presencia de marcadores del alcoholismo (VCM y GOT). En 1998 Andersen et al., en un estudio llevado a cabo con cirróticos alcohólicos coinciden con el previo al encontrar que las únicas dos variables que se relacionaban con la fuerza muscular eran la abstinencia durante un periodo medio de 90 días y el IMC bajo. Fernández Sola et al., en 1995 también encontraron que la malnutrición calórica ejercía un efecto independiente sobre la atrofia de las fibras tipo II; en la serie de Urbano-Márquez, en 1989 se encuentra que el pliegue tricípital está disminuido en pacientes alcohólicos con miopatía apreciando además una relación inversa entre el consumo de alcohol y la fuerza muscular. Por último, Nicolas et al., en 2003 encuentran que la malnutrición proteica puede jugar un papel coadyuvante en la génesis de la miopatía.

No obstante por parte de este grupo en Barcelona y del de Preedy et al., en Londres, ha prevalecido la idea de que es sólo el alcohol es el causante de la miopatía, en contraste con las observaciones realizadas por nuestro grupo, en las que se demuestra tanto experimentalmente como en estudios clínicos que la malnutrición tanto proteica como calórico proteica juega un papel determinante en su génesis. En este sentido en un estudio llevado a cabo en 60 alcohólicos a los que se les realizó biopsia muscular y mediciones antropométricas para valorar el estado nutricional se encontró, que aquellos pacientes que exhibían atrofia de las fibras musculares mostraban un peor estado nutricional, al presentar una reducción no sólo de la circunferencia del antebrazo sino también del pliegue tricípital apuntando a una desnutrición tipo marasmo (Romero et al., 1994). Posteriormente otro estudio realizado con 180 alcohólicos con ingesta muy superior a 80 g/día (aproximadamente 180 g/día) mostró una clara relación entre IMC y fuerza muscular, en especial en aquellos alcohólicos con hábitos alimenticios más irregulares (Santolaria et al., 2000b). Igualmente estudios experimentales realizados por nuestro grupo han puesto de manifiesto resultados similares. Se ha visto que ratas alimentadas con dietas hipoproteicas (dietas con un contenido proteico del 6%)

mostraban una proporción inferior de fibras tipo II y un diámetro menor de las fibras tipo II B que ratas controles (Conde Martel et al., 1998) y más recientemente en un estudio con ratas cirróticas, tras inducción con CCL4, que eran alimentadas con dietas hipoproteicas o normoproteicas, se aprecia como las ratas malnutridas presentan un grado de atrofia mayor, tanto de fibras tipo II A como II B. Además en este estudio se demostró que sólo la malnutrición proteica ejercía un efecto independiente, sobre el diámetro de ambas fibras (López Lirola et al., 2003).

## 1.4. HUESO.

El hueso es un tejido vivo que sufre un proceso de remodelación continuo a lo largo de la vida mediante el cual ciertas regiones del hueso son destruidas y reconstruidas de una forma sistemática (Frost , 1969). Este proceso sirve para reparar las microlesiones causadas por el uso normal o traumático y para que el hueso cumpla su función en la homeostasis calcio-fósforo. Durante el proceso normal de envejecimiento se pierde hueso y esta pérdida es habitualmente causada por un desequilibrio en este ciclo de remodelación ósea, en el cual la reabsorción ósea no se compensa adecuadamente con la subsecuente formación ósea .

La masa ósea no es constante a lo largo de la vida: durante las dos primeras décadas de la vida el hueso crece en longitud y anchura, y la formación ósea predomina sobre la reabsorción, lo que produce una continua acumulación de masa ósea. Una vez finalizada la pubertad el hueso continua creciendo en grosor y densidad hasta alcanzar un pico de valor de masa ósea en la tercera década de la vida. Una vez alcanzado este pico de masa ósea la pérdida de hueso comienza y no terminará hasta el final de la vida. Desde que se alcanza el pico de masa ósea hasta los cincuenta años se produce un ligero predominio de la reabsorción sobre la síntesis de tal manera que se produce una pérdida neta de masa ósea de 0.5%/año. A partir de los cincuenta, y en mujeres a partir de la menopausia, la pérdida es particularmente pronunciada, especialmente en los primeros 5-15 años. Se sabe que aquellos individuos que en su madurez alcanzan pronto el pico de masa ósea tendrán un riesgo más bajo de desarrollar osteoporosis posteriormente en sus vida. Un valor pico de masa ósea bajo seguido de una rápida pérdida relacionada con la edad predispone al desarrollo de osteoporosis. Desde que aparece una pérdida significativa de masa ósea en individuos de edad media hasta que aparece un riesgo elevado de fractura ósea transcurren como mucho dos décadas en las que no hay evidencia clínica alguna de problema.

En EEUU una sexta parte de las fracturas totales es debida a osteoporosis. Sin embargo, las consecuencias de una fractura osteoporótica pueden ser de distinta gravedad. Si nos referimos a las fracturas de cadera, las dos terceras partes de ellas son consecuencia de la osteoporosis, y una quinta parte de los pacientes que sufren este tipo

de fracturas, muere en los seis meses siguientes a la fractura. Esta mortalidad es mayor en hombres que en mujeres y condiciona una reducción en la expectativa de vida de aproximadamente 6 años (Trombetti et al., 2002). De los supervivientes una quinta parte va a requerir una institucionalización prolongada y otra quinta parte permanecerá discapacitado permanentemente.

La prevalencia de osteoporosis está alcanzando proporciones epidémicas entre otras causas por el incremento de la expectativa de vida de la población. Se espera que en América el número de fracturas de cadera sea de 4.5 millones en el año 2050 como consecuencia de la combinación de una vida más prolongada y el incremento en la tasa de nacimientos (Cooper y Melton, 1996).

#### 1.4.1. COMPOSICIÓN Y REMODELADO ÓSEO.

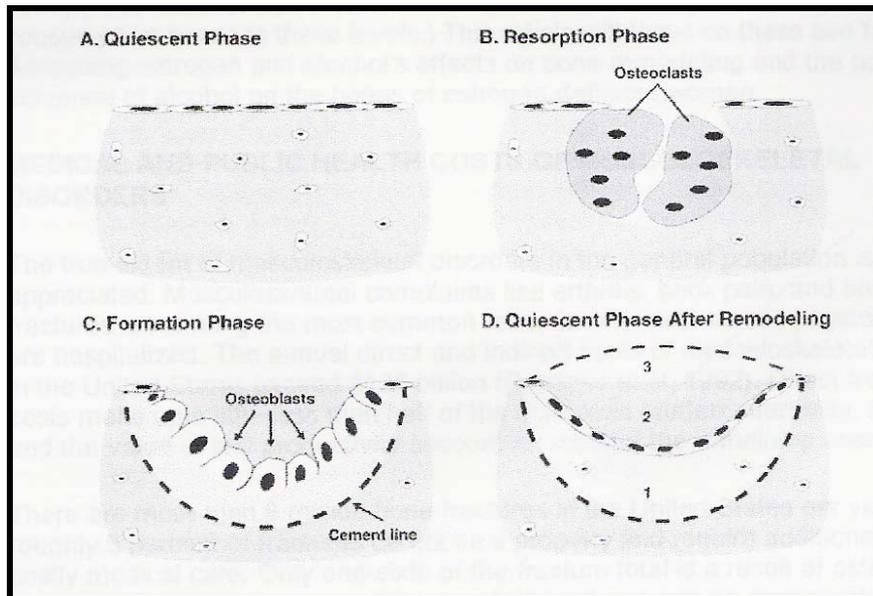
El hueso está formado por una matriz extracelular, que posee componentes orgánicos e inorgánicos, y por un conjunto de células de estirpe mesenquimatosa. Las fibras de colágena tipo I suponen el 90% de la matriz orgánica; el 10% restante corresponde a proteínas no colágenas, fundamentalmente proteoglicanos, glicoproteínas (osteocalcina, osteonectina, sialoproteína, osteopontina) y fosfoproteínas. En situación fisiológica el 99% de la matriz ósea está mineralizada (cristales de hidroxipatita). El 1% restante no presenta depósito de minerales y se conoce como osteoide.

En el hueso se distinguen tres tipos de células: a) los *osteoblastos*: responsables de la síntesis de la matriz orgánica, actúan como reguladores de la mineralización ósea. Son células mononucleares cuya membrana plasmática es muy rica en fosfatasa alcalina. Derivan del preosteoblasto. Parte de los osteoblastos quedan rodeados y enclaustrados por la matriz calcificada adquiriendo forma estrellada, en este momento cesa su actividad anabólica y se convierten en *osteocitos*; b) los *osteoclastos*: responsables de la reabsorción de tejido óseo, son células grandes multinucleadas que presentan un borde en cepillo en la zona de contacto con el hueso. Se originan a partir de los preosteoclastos, que proceden del sistema mononuclear fagocítico y son ricos en fosfatasa ácida tartrato resistente. La diferenciación de los osteoclastos está estimulada

por una amplia variedad de hormonas y citocinas entre ellas: calcitriol, PTH, TNF- $\alpha$  y las IL-1, IL-6 y IL-11.

El hueso es una estructura dinámica, renovándose cada año el 25% del hueso trabecular y el 3% del cortical, acción que se lleva a cabo gracias a la actuación coordinada de osteoblastos y osteoclastos en las llamadas unidades de remodelado. El ciclo de remodelado (Fig.2) se inicia en las células de revestimiento o *Lining cells* de la superficie ósea, células que favorecen la activación de los precursores de los osteoclastos. Los osteoclastos se fijan a la superficie a remodelar por la zona de sellado y mediante la acción de proteasas e iones de hidrógeno labran una pequeña cavidad de forma característica conocida con el nombre de *laguna de Howship* si se localiza en el hueso trabecular y como “cono penetrante” si lo hace en el cortical. Esta fase dura entre dos y tres semanas. Una vez completada la fase de reabsorción los osteoclastos sufren un proceso de apoptosis. A continuación y durante un periodo de unas dos semanas células fusiformes tapizan la cavidad; es la llamada “fase inversa”. Tras esta fase de inactividad aparente los precursores de los osteoblastos llegan a la cavidad y una vez transformados en osteoblastos comienzan a rellenar las cavidades previamente labradas con componentes orgánicos de la matriz ósea, que se depositan en forma de laminillas concéntricas o paralelas según se trate de hueso cortical o esponjoso respectivamente. Desde el inicio del depósito de osteoide hasta la mineralización transcurren 10 días. La mineralización comienza a producirse en la interfase entre el hueso preexistente y el osteoide y avanza en un plano de barrido que se denomina “frente de mineralización”. Esta fase de formación dura aproximadamente tres meses. Gran parte de los osteoblastos desaparecen posteriormente, probablemente por un fenómeno de apoptosis y el resto se transforman en osteocitos.

A la diferencia entre el volumen de hueso formado y destruido se la denomina balance óseo y se denomina “turnover” (o recambio) a la cantidad de hueso viejo que ha sido renovado por hueso nuevo por unidad de tiempo.

**Figura 2. Fases del remodelado óseo.**

#### 1.4.2. METABOLISMO MINERAL ÓSEO.

##### 1.4.2.1. CALCIO.

El cuerpo humano contiene de 1000 a 1500 g de calcio, del cual el 99% se encuentra en los huesos en forma de hidroxapatita. Las necesidades nutricionales de calcio están determinadas mayoritariamente por las necesidades del esqueleto y siguen un comportamiento según niveles umbrales para las distintas edades y situaciones. Una vez que la ingesta de calcio alcanza el umbral necesario para esa edad o condición, la excreción urinaria de calcio aumenta sugiriendo que se ha alcanzado la saturación del hueso (Matkovic et al., 1992).

Los aportes exógenos de calcio tienen distinta importancia dependiendo de la edad del individuo: variaciones en la ingesta de calcio durante las etapas precoces de la vida pueden suponer una diferencia entre un 5% a un 10% en el pico de masa ósea. Esta pequeña diferencia, sin embargo, puede potencialmente contribuir en más del 50% a las tasas de fracturas de cadera en etapas más tardías. Entre los 20 y los 50 años también el calcio de la dieta se correlaciona de manera directa con la masa ósea de tal forma que 1000 mg. de calcio diarios previenen la pérdida ósea en aproximadamente un

1% por año. Ya por encima de los 50 años las hormonas gonadales tienen un impacto marcado sobre la salud del hueso. El cese de la secreción de estrógenos y testosterona contribuye a acelerar la pérdida de masa ósea. La mujer puede perder entre un 20-30% de hueso esponjoso y un 5-10% de hueso cortical entre los 50 y los 60 años. Es en este grupo de edad donde los distintos estudios intervencionistas han mostrado que los suplementos dietéticos de calcio apenas tienen efecto sobre el hueso y este efecto queda confinado al hueso cortical casi exclusivamente. Por el contrario, en el periodo menopáusico tardío sí que se ha observado un efecto más pronunciado de la ingesta de calcio y se sugiere que 1 g. de calcio al día se asocia a una disminución del 24% en el riesgo de fractura de cadera.

#### 1.4.2.2. FÓSFORO.

El fósforo se encuentra en cantidades inferiores al calcio en el organismo y en un 85% se encuentra en el esqueleto. Las necesidades nutricionales de fósforo son de 700 mg/día. Aunque es un elemento nutricional esencial su ingesta en cantidades excesivas puede ser perjudicial para el hueso, ya que provoca un incremento de los niveles séricos, lo que condiciona una caída en las concentraciones de calcio con el subsecuente incremento de la secreción de PTH y de la reabsorción ósea. Una dieta rica en P y baja en Ca es deletérea para la masa ósea.

#### 1.4.2.3. MAGNESIO.

El cuerpo humano contiene aproximadamente 25 g. de magnesio, las dos terceras partes del cual se encuentra en el esqueleto y el resto en los tejidos blandos. Las necesidades diarias de magnesio son de 360 mg/día. El Mg contenido en el hueso no forma parte integral de los cristales de hidroxapatita, como sí lo hacen el calcio y el fósforo. Su importancia sin embargo radica en que juega un papel importante en el metabolismo del Ca y el hueso. La hipomagnesemia inhibe la secreción de PTH produciendo hipocalcemia. También provoca alteraciones en la vitamina D e hiperexcitabilidad neuromuscular. Estudios tanto sobre modelos experimentales (Creedon et al., 1999) como humanos (Tucker et al., 1999) han demostrado una relación directa entre la ingesta de Mg y la masa ósea. Por esta razón la deficiencia de magnesio debe ser considerado un factor de riesgo para osteoporosis.

1.4.2.4. HIERRO.

El hierro juega un papel importante en la formación del hueso ya que actúa como cofactor de enzimas involucradas en la síntesis de colágena. Se ha observado una mayor fragilidad ósea en ratas deficientes en hierro (Medeiros et al., 1997). La absorción de hierro puede ser inhibida por otros minerales y oligoelementos, particularmente por el calcio. Sin embargo no está claro cómo esa ingesta de Ca puede afectar a los depósitos de hierro y cual puede ser la consecuencia de esos depósitos depleccionados sobre la masa ósea.

Por otro lado el hierro puede ser un tóxico para las células óseas y contribuir al desarrollo de osteoporosis en individuos con alteraciones en el metabolismo del hierro o sobrecarga de este (hemocromatosis, hemosiderosis, enfermedades renales crónicas, transfusiones, etc.). No está todavía del todo claro si el daño sobre el hueso se produce por efecto directo del hierro, por la hipovitaminosis C que la sobrecarga férrica produce o por ambos. Conte et al., en 1989 compararon la DMO y la histomorfometría ósea en pacientes con hemocromatosis primaria, cirrosis hepática y controles observando que tanto los cirróticos como los afectados de hemocromatosis presentaron deterioro del hueso trabecular mientras que el hueso cortical sólo se vio afectado en los pacientes con hemocromatosis. Diamond et al., en 1989b, valorando parámetros histomorfométricos en pacientes afectados de hemocromatosis idiopática frente a controles, observaron osteoporosis en el 45% de los pacientes con descenso particularmente intenso de la DMO cuando coexistía con hipogonadismo. En aquellas circunstancias en las que coexiste la sobrecarga de hierro y el consumo de alcohol, no se conoce en qué medida los cambios inducidos sobre el hueso son debidos al hierro per se, al alcoholismo crónico, a la malnutrición o al hipogonadismo asociados.

1.4.2.5. COBRE.

El cobre influye sobre la maduración de la colágena y de esta forma puede influir sobre la composición y estructura óseas. La lisil-oxidasa, enzima que contiene cobre, cataliza el entrecruzamiento de lisina e hidroxiprolina en la colágena contribuyendo a la fuerza mecánica de las fibras de colágena. Se ha observado que la

deficiencia de cobre provoca una disminución en la resistencia del hueso en modelos animales (Jonas et al., 1993).

#### 1.4.2.6. ZINC.

El cuerpo humano contiene de uno a dos gramos de zinc. Aproximadamente el 90% se encuentra en el tejido muscular, óseo, en la piel y en el pelo, mientras que circulando en sangre se encuentra menos del 1%. El zinc juega un papel importante en el metabolismo del tejido conectivo, actuando como cofactor de enzimas como la fosfatasa alcalina (necesaria para la mineralización ósea) y las colagenasas (esenciales para el desarrollo de la estructura de colágena del hueso). Hay estudios que demuestran que el aporte de zinc aumenta el crecimiento óseo (Díaz Gómez et al., 2003).

El déficit de zinc, por otro lado, provoca un deterioro en la síntesis de DNA y del metabolismo proteico, lo cual conduce a un efecto negativo sobre la formación del hueso.

### 1.4.3. SISTEMAS HORMONALES IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN DEL REMODELADO ÓSEO.

#### 1.4.3.1. PTH.

Polipéptido de 84 aminoácidos, producido por las células principales de las glándulas paratiroides, cuya secreción está regulada por un mecanismo de retroalimentación negativo, de tal forma que niveles altos de calcio iónico inhiben su secreción y viceversa.

Su principal efecto sobre el hueso consiste en un aumento de la reabsorción ósea. Estimula la función osteoclástica al aumentar el número y la actividad de las células encargadas de reabsorber el hueso. Esta acción no es directa, ya que los osteoclastos carecen de receptor para la PTH, al parecer se produce por medio del RANK-L y necesitan de la presencia de osteoblastos que si poseen estos receptores, que liberarían sustancias activadoras de la reabsorción como la IL-6. También tiene una acción anabólica mediada en parte por un aumento en la síntesis de IGF-1 (polipéptido

dependiente de la hormona de crecimiento, que actúa estimulando la proliferación de precursores osteoblásticos y la actividad de los osteoblastos) y TGF- $\beta$  (que estimula la producción local de los precursores de los osteoblastos y la síntesis de colágeno, parece inhibir la reabsorción ósea y podría inducir la apoptosis de los osteoclastos).

La PTH en el riñón aumenta la reabsorción de calcio en el túbulo distal y disminuye la de fósforo en el túbulo proximal. Produce un aumento de la producción renal de calcitriol y de esta forma, sobre el intestino, induce un aumento de la absorción de calcio y fósforo.

#### 1.4.3.2. CALCITRIOL (1,25 DIHIDROXIVITAMINA D).

La vitamina D, procedente de la dieta y de la síntesis endógena de la piel, alcanza el hígado donde, mediante la acción de la 25-hidroxilasa, se convierte en 25-hidroxivitamina D o calcidiol. Posteriormente es captada por el riñón, donde experimenta una nueva hidroxilación transformándose en 1,25 dihidroxivitamina D o calcitriol.

La regulación de la secreción de calcitriol depende de las concentraciones séricas de calcio y fósforo. Cuando disminuye la calcemia, aumenta la secreción de PTH, que a su vez estimula la producción renal de calcitriol; ésta a su vez inhibe la formación de PTH, con lo que se cierra el mecanismo de autorregulación. El descenso de la fosfatemia aumenta igualmente la producción de 1,25 dihidroxivitamina D, pero esta vez no mediada por la acción de la PTH sino de forma directa.

Sobre el riñón produce un aumento de la reabsorción tubular de calcio y en el intestino promueve el transporte activo de calcio y de fósforo a través de la mucosa, facilitando su absorción. El calcitriol, sobre el hueso, estimula la reabsorción y posibilita la mineralización. Este efecto lo ejerce directamente a través de la diferenciación de los preosteoclastos, e indirectamente, a través de los osteoblastos, que activan los osteoclastos maduros. Está en discusión su papel sobre la formación ósea: se han demostrado la presencia de receptores para la vitamina D en los osteoblastos.

1.4.3.3. CALCITONINA.

Polipéptido secretado por las células C del tiroides en respuesta a la elevación de la concentración sérica del calcio. La calcitonina aumenta la excreción urinaria de calcio y fósforo e inhibe la reabsorción ósea mediante una disminución de la proliferación de los proosteoclastos y un bloqueo de la actividad citoplasmática de los osteoclastos.

1.4.3.4. HORMONAS SEXUALES.

Tanto los andrógenos como los estrógenos desempeñan un papel fundamental en la maduración del esqueleto y en la prevención de la pérdida de hueso. Los estrógenos actúan de manera directa sobre las células óseas a través de receptores específicos, disminuyendo el número y actividad de los osteoclastos y también, mediante receptores estrogénicos en los osteoblastos, parecen incrementar la liberación de IGF-1, TGF- $\beta$  y PGE<sub>2</sub> que inhibirían el reclutamiento osteoclástico. El papel protector de los estrógenos podría ser también consecuencia de su capacidad para disminuir la liberación por parte de las células mononucleares de citocinas como la IL-1, IL-6 y el TNF- $\alpha$ , inductores de la diferenciación osteoclástica, lo que inhibiría la resorción del hueso. La IL-1 y la IL-6 poseen capacidad de activar la maduración de osteoclastos (además la IL-1 favorece la producción de IL-6 por los osteoblastos), y el TNF- $\alpha$ , que además de inducir la diferenciación de los osteoclastos por acción directa sobre los precursores de los osteoclastos (Ragab et al., 2002), también produce un aumento en la reabsorción al estimular la producción de IL-1 e IL-6. El aumento de la reabsorción ósea producido por un déficit de estrógenos conduce a un aumento de la calcemia que da lugar a una serie de adaptaciones sistémicas como la disminución de la PTH, de la síntesis renal de vitamina D y de la absorción intestinal de calcio, que contribuyen aumentar todavía más la pérdida de masa ósea.

Por otro lado la deficiencia de andrógenos determina una disminución de la secreción de calcitonina y de la síntesis de calcitriol.

1.4.3.5. OTROS SISTEMAS HORMONALES.

Los glucocorticoides a concentraciones fisiológicas actúan como moduladores del remodelado óseo. Sin embargo a dosis suprafisiológicas inducen una pérdida ósea. Inhiben directamente a los osteoblastos, células con receptores específicos para ellos. Este efecto es mediado en gran parte por la PTH y el calcitriol. La insulina estimula la síntesis de la matriz ósea y es necesaria para que la mineralización se lleve a cabo. También activa los osteoclastos al parecer por medio del RANKL. La hormona de crecimiento es un polipéptido pituitario que favorece la formación de hueso a partir de la estimulación de la IGF-1, produciendo un aumento en el reclutamiento y la diferenciación de osteoblastos (Marie, 1997), sin embargo este efecto sobre la DMO no es igual para hombres y mujeres en edad avanzada, siendo el efecto positivo mayor sobre las últimas (Karasik et al., 2002; Langlois et al., 1998). Las hormonas tiroideas ejercen un papel fundamental sobre la formación del cartílago y sobre el hueso estimulan la actividad osteoclástica y aceleran la velocidad del recambio óseo.

1.4.4. FACTORES LOCALES O SISTÉMICOS QUE INFLUYEN EN EL REMODELADO ÓSEO.

El componente genético o familiar podría determinar alrededor del 50% de la variabilidad de la masa ósea. Se han encontrado factores genéticos que influyen directamente en la formación/reabsorción óseas, como alteraciones genéticas del colágeno tipo I. Diversos estudios demuestran la existencia de una anomalía estructural del procolágeno tipo I que podría justificar casos de osteoporosis grave (Spotila et al., 1994).

La malnutrición o la ingesta baja en calcio, sobre todo durante la etapa de desarrollo esquelético, también provocan efectos deletéreos sobre el hueso, ya que es en estas etapas cuando se alcanza el pico de masa ósea (Valimaki et al., 1994), pero igualmente una ingesta de calcio baja se correlaciona con pérdida de masa ósea en la adultez (Huuskonen et al., 2000) y no así en la vejez (Hannan et al., 2000a).

El alcohol y el tabaco producen también una disminución de la masa ósea. El tabaco parece que ejerce su efecto tóxico directamente sobre las células óseas, pero además provoca un aumento del metabolismo hepático de los estrógenos y se asocia a una menopausia precoz. El tabaquismo, y concretamente los años de consumo más que la cantidad consumida, aumenta el número de fracturas de cadera en mujeres postmenopáusicas (Baron et al., 2001). Igualmente el consumo de tabaco en hombres de mediana edad se asocia a disminución de la masa ósea (Benavid et al., 1996) y en la adolescencia y en la adultez temprana es un predictor independiente del pico de masa ósea para hombres, no así para mujeres (Valimaki et al., 1994). En un estudio llevado a cabo sobre 30.000 personas, el tabaco se mostró como factor de riesgo independiente de fracturas de cadera, siendo el responsable del 19% de las fracturas observadas, sin apreciarse diferencias en cuanto a género. Sin embargo, el cese del consumo de tabaco redujo el riesgo de fractura en los hombres a los 5 años mientras que el efecto negativo fue más duradero en el sexo femenino (Hoidrup et al., 2000). Un metaanálisis reciente demuestra que el tabaquismo provoca un aumento del riesgo de fracturas que es substancialmente mayor que el explicado por la disminución de la DMO (Kanis et al., 2004a).

La delgadez y la pérdida de peso tienen un efecto negativo sobre la masa ósea. El peso en la mujer es probablemente el determinante mayor de la masa ósea, por delante incluso la situación hormonal en la que se encuentren (pre, peri o postmenopausia (Rico et al., 2002). El peso y el índice de masa corporal pueden explicar una proporción sustancial de la variabilidad en la densidad mineral ósea a lo largo de la vida tanto en hombres como en mujeres, pero este efecto es mucho menor en los primeros (Felson et al., 1993; Hannan et al., 2000a).

Factores de tipo mecánico como la inmovilización, la debilidad muscular o la ingravidez ejercen un efecto negativo sobre la masa ósea. En 1994 Valimaki et al. apreciaron, en un estudio realizado en 264 sujetos entre 9 y 18 años a los que siguieron durante 10 años, que el ejercicio por sí solo condicionaba un aumento significativo de la DMO en cuello femoral, tanto en hombres como en mujeres, y en columna lumbar en hombres. En este estudio el peso, el ejercicio, el tabaquismo y la edad poseían un efecto independiente sobre la densidad mineral ósea y explicaban una variabilidad en la DMO del 38% en mujeres y del 46% en hombres. Bendavid et al. en 1996 encuentran un

efecto positivo del ejercicio físico y la ingesta adecuada de calcio al disminuir la pérdida ósea relacionada con la edad en individuos entre 50 y 64 años. La DMO se ha correlacionado de forma positiva con la fuerza muscular a diferentes niveles: tríceps, bíceps, rectos abdominales (Huuskonen et al., 2000) y con la masa muscular (Visser et al., 1998). Pero el ejercicio no ha mostrado efectos beneficiosos o protectores sobre los cambios histomorfométricos inducidos por el alcohol sobre el hueso (Reed et al., 2002).

Pese a conocerse que el consumo importante de alcohol puede resentir dramáticamente la salud ósea y que existen muchos otros factores que pueden afectar a la estructura de nuestros huesos, existen sin embargo muy pocos estudios que examinen la interacción entre éstos y cómo pueden influir positiva o negativamente sobre el hueso.

#### 1.4.5. OSTEOPATÍA ALCOHÓLICA.

El alcohol se considera un importante factor de riesgo para la osteoporosis y las fracturas óseas, aunque estudios recientes apoyan el efecto beneficioso de la ingesta moderada de alcohol sobre el hueso, en especial en mujeres ancianas (Feskanich et al., 1999; Baron et al., 2001) efecto este que pudiera deberse a un incremento de los niveles circulantes de estrógenos o a una inhibición de la iniciación del remodelado óseo (Turner et al., 2001c). El etanol no sólo induce cambios sobre el metabolismo y la histomorfometría ósea cuando es ingerido de forma continua y mantenida sino incluso tras intoxicaciones agudas (Diez et al., 1997). La duración del consumo abusivo de alcohol se asocia de manera positiva con la gravedad de la osteopenia (Pumarino et al., 1996) e independientemente del momento del inicio del consumo abusivo del alcohol (Hogan et al., 2001). Tradicionalmente la presencia de fracturas múltiples se ha asociado a alcoholismo. En 1977 Oppenheim definía el “síndrome del alcohólico maltratado” como la presencia de tres o más fracturas en el mismo individuo en diferente estadio cronológico de curación, y vio que el 62% de los pacientes que eran atendidos en un hospital con tres o más fracturas eran alcohólicos. Lindsell et al., en 1982 compararon la frecuencia de fracturas costales en pacientes con enfermedad hepática alcohólica y no alcohólica frente a controles. Los alcohólicos presentaron fracturas costales en un 28% de los casos, fracturas que además eran bilaterales y

múltiples y se diferenciaban de manera significativa respecto al resto de los grupos. La presencia de fracturas costales en pacientes con enfermedad hepática era un marcador de alcoholismo con un 95% de especificidad y un 28% de sensibilidad. Estudios amplios han identificado al consumo de alcohol como factor de riesgo significativo de fracturas en hombres (Kanis et al., 1999); sin embargo, en otros estudios no se ha encontrado esta asociación (Mussolino et al., 1998) o se ha encontrado que esta dicha asociación es dependiente del sexo (Hoidrup et al., 1999). Un estudio reciente llevado a cabo sobre una población de más de 16.000 personas ha puesto de manifiesto que la ingesta de alcohol mayor de 2 unidades/día se asocian tanto en hombres como en mujeres a un aumento significativo del riesgo de cualquier tipo de fracturas, osteoporóticas o no, y de fracturas de cadera, y que este riesgo es ligeramente mayor, e igualmente de manera significativa, en los hombres (Kanis et al., 2004b).

El efecto del alcohol sobre el hueso no solo depende del efecto que éste, per se, pueda ejercer sobre el conglomerado de factores bioquímicos, hormonales y celulares que intervienen en la formación y reabsorción ósea, sino también por la diversidad de circunstancias asociadas al alcoholismo, como: deficiencias nutricionales, hipogonadismo, mayor exposición a traumatismos, actividad física disminuida, masa y fuerza muscular reducidas, sobrecarga férrica o hepatopatía asociados, que también pueden ejercer un efecto directo o indirecto sobre el metabolismo óseo.

Diversos estudios relacionan la existencia de osteoporosis con la enfermedad hepática crónica. Jorge et al., en 1988 en pacientes cirróticos alcohólicos, encuentran relación entre la disminución del volumen óseo trabecular y los parámetros de función hepática, pero estos últimos no se relacionaron con ninguno de los valores hormonales y electrolitos que participan en el metabolismo calcio fósforo y los ejes hormonales que lo regulan. Para unos autores la enfermedad ósea en pacientes con hepatopatía no se correlaciona con las concentraciones séricas de la vitamina D o sus metabolitos o el efecto de estos metabolitos sobre la función osteoblástica (Diamond et al., 1989c). Sin embargo, otros (Mobarhan et al., 1984) sí encontraron respuesta favorable al tratamiento con calcidiol sobre la densidad mineral ósea.

La homeostasis mineral en los alcohólicos está afectada: el alcohol aumenta la excreción urinaria de calcio, magnesio y zinc (Rico, 1990). La intoxicación aguda

provoca hipocalcemia (Sampson et al., 1999) con hipo o hipermagnesemia. Esta hipocalcemia está condicionada por una inhibición del flujo de calcio desde el hueso y por la inhibición de la secreción de PTH por acción directa o indirectamente a través de la hipomagnesemia frecuentemente asociada (Jasminka et al., 2000). La ingesta aguda de alcohol también induce hiper calciuria e hipermagnesuria fundamentalmente por efecto directo sobre el riñón, aunque también con contribución del hipoparatiroidismo igualmente inducido por el alcohol (Laitinen et al., 1992a). En el alcoholismo crónico los niveles de calcemia tienden a ser normales.

El eje hormonal que regula el recambio óseo también se ve afectado por el alcoholismo. Mediante diversos mecanismos el alcohol provoca una disminución de los niveles plasmáticos de la vitamina D (Laitinen et al., 1991), hecho que se manifiesta independientemente de la presencia de hepatopatía. Así, el alcohol disminuye la absorción intestinal y la síntesis de los metabolitos hepáticos de esta vitamina, y cuyos niveles también disminuyen por deficiencias dietéticas. La ingesta aguda de alcohol sobre la PTH produce una disminución de sus valores plasmáticos (efecto dosis dependiente) tanto por acción directa o indirectamente a través de la hipomagnesemia como ya comentamos. Otros autores han observado, en intoxicaciones agudas por alcohol, niveles de PTH en rangos normales pero que traducen una respuesta anormal de las paratiroides a la hipocalcemia inducida por el alcohol (Laitinen et al., 1994). En lo que se refiere a la calcitonina, el alcohol puede inducir un aumento de su secreción y secundariamente una inhibición de la reabsorción ósea, pudiendo ser éste el mecanismo mediante el cual una ingesta moderada de alcohol pueden tener el comentado efecto beneficioso sobre la masa ósea (Rico, 1990).

El alcohol no sólo provoca cambios en las hormonas calciotropas sino también afecta a otros ejes hormonales los cuales a su vez pueden verse implicados en el metabolismo óseo. Estimula al eje adreno-hipófiso-hipotalámico con la consiguiente elevación de las concentraciones de corticoides cuyo efecto negativo sobre el hueso es conocido (Hodgson, 1990). Además la ingesta de alcohol induce en ambos sexos hipogonadismo, causa de osteoporosis secundaria. La deficiencia de estrógenos es el factor más importante en la patogenia de la osteoporosis tipo I o postmenopaúsica. En algunos estudios como el de Sampson et al., en 1998a, sin embargo, concluyen que no

son las alteraciones en estos ejes hormonales las que inducen los cambios óseos producidos por el alcohol.

Los mecanismos a través de los cuales el alcohol promueve pérdida ósea no están aclarados totalmente. Existe evidencia de que el alcohol induce osteoporosis mediante alteraciones tanto de la producción como de la reabsorción ósea, todo lo cual provoca una disminución del volumen óseo, del grosor y número de las trabéculas del hueso esponjoso y de la densidad ósea (Bikle et al., 1985; Diamond et al., 1989a; Dyer et al., 1998; Sampson et al., 1999). El deterioro de la formación ósea mediado por el alcohol es dosis dependiente (Turner et al., 2001b). El efecto tóxico directo del alcohol sobre el tejido óseo se debe entre otras causas a cambios en la fluidez de las membranas celulares de las células óseas (Farley et al., 1985) y está mediado entre otros por la IL-6 (Dai et al., 2000). El alcohol, por efecto tóxico directo, produce una disminución de la actividad (Bikle et al., 1993) y la proliferación de osteoblastos que conduce a una formación ósea deteriorada y a una defectuosa mineralización, pero sin tener efecto tóxico directo sobre los osteoblastos maduros (Klein et al., 1996). Esta proliferación osteoblástica deteriorada podría obedecer a una alteración en el metabolismo de las poliaminas inducido por el alcohol (Klein et al., 1995). Estudios in vitro han demostrado reducción en la síntesis de DNA y proteínas en los osteoblastos expuestos a etanol (Friday y Howard, 1991). Inicialmente se detectan concentraciones bajas de osteocalcina y posteriormente los cambios histomorfométricos. Diamond et al. en 1989a mostraron cómo la ingesta crónica de alcohol provocaba una disminución en la síntesis de osteoide. Muchos autores han encontrado disminución de los niveles de osteocalcina en alcohólicos -no cirróticos- en activo (Lindholm et al., 1991; Laitinen et al., 1993; González Calvin et al., 1993; Diez et al., 1994). García Sánchez et al., en 1995 encuentran niveles séricos de osteocalcina disminuidos en individuos sanos sometidos a una única dosis de alcohol. Diversos autores no sólo encuentran disminución de la formación de hueso sino también un aumento de la reabsorción que incluso persiste más allá del momento en el cual se suspenden la ingesta alcohólica. En modelos experimentales (Preedy et al., 1991) se ha constatado un aumento de la excreción urinaria de hidroxiprolina. Nyquist et al., en 1996, encuentran aumento de los niveles de deoxipiridinolina en orina (marcador de reabsorción ósea) de alcohólicos activos y de abstinentes durante más de 5 años, mientras que los niveles de osteocalcina se recuperan tras la abstinencia. Igualmente en modelos alcohólicos humanos se ha observado unas

concentraciones altas del telopéptido c terminal de la colágena humana tipo I (parámetro de degradación de la matriz ósea) que no se relacionan positivamente con las concentraciones de osteocalcina, como sí lo hacen en los individuos sanos (Laitinen et al., 1994). Estos datos sugieren la existencia de un desequilibrio entre formación y reabsorción ósea en alcohólicos, que puede conducir a una rápida pérdida ósea con la persistencia de un turnover óseo acelerado incluso tras 5 años de abstinencia. Sin embargo esta teoría de un remodelado óseo desacoplado, defendida por algunos investigadores, resulta difícil de conciliar con la aparente pérdida ósea gradual que se produce en el alcoholismo. No se puede por tanto excluir que la pérdida de hueso inducida por el alcohol se produzca en cortos periodos de rápida pérdida ósea seguidos de intervalos prolongados con cambios pequeños (o sin ellos) de la masa ósea (Turner, 2000).

También se ha observado en biopsias óseas en alcohólicos, aumento de la actividad osteoclástica, Bikle et al., en 1993 encontraron un aumento de la superficie total de reabsorción que se correlacionaba de manera positiva con los valores séricos de PTH, y en modelos animales inducción de osteoclastogénesis y de la formación de CFU-GM mediada por IL-6 (Dai et al., 2000). El alcohol induce necrosis de la cabeza femoral (Jacobs, 1992).

Se ha visto que el acetaldehído tiene un efecto teratogéno en ratas, con evidente retraso del crecimiento.

No está claro si el efecto del alcohol sobre el metabolismo mineral óseo puede ser reversible. Las concentraciones de osteocalcina (González Calvin et al., 1993) y la procolágena I se normalizan ya desde la segunda semana tras la abstinencia de alcohol (Laitinen et al., 1992); se elevan las de PTH y calcitriol (Lindholm et al., 1991). Peris et al., en 1994 observaron aumento de la osteocalcina y la densidad mineral ósea en alcohólicos tras dos años de abstinencia. También se han encontrado aumento de la formación ósea y de los niveles de RNAm que codifican las proteínas de la matriz ósea en ratas alcohólicas tratadas con PTH. Este hecho evidencia que los efectos del alcoholismo pueden ser reversibles (Turner et al., 2001a).

Los cambios inducidos por el alcohol sobre el tejido óseo pueden ser reducidos por la osteoprotegerina, receptor señuelo que se fija al RANKL (miembro de la superficie celular de la familia de los TNF, necesario y suficiente para la diferenciación osteoclástica). En modelos animales sobre ratones se ha visto que la osteoprotegerina reduce: la pérdida de la DMO, la disminución del volumen óseo esponjoso y de la anchura de la trabécula, el aumento del número de osteoclastos y de la formación de UFC-GM y la disminución de la formación osteoblástica, todos éstos efectos inducidos por el alcohol (Zhang et al., 2002).

Un estudio con ratas ha demostrado que la administración sistémica de antagonistas de la IL-1 y del TNF- $\alpha$  protege de los efectos deletéreos del alcohol sobre la osteogénesis acelerada inducida experimentalmente, pero no lo hace durante la homeostasis normal del hueso (Perrien et al., 2002).

#### 1.4.6. MALNUTRICIÓN Y HUESO.

La malnutrición es otro factor de riesgo para la osteoporosis. A pesar de que el hueso puede suplir las necesidades de calcio para mantener los niveles séricos, una dieta con cantidades suficientes de calcio es necesaria para mantener el metabolismo óseo. Ya hemos comentado como los aportes de calcio influyen de manera diferente sobre la masa ósea en las distintas etapas de la vida.

El déficit de vitamina D es otro de los factores a través de los cuales la malnutrición puede conducir a alteraciones óseas. Mucha población anciana tiene niveles bajos de vitamina D, no suficientes para causar osteomalacia y sí osteoporosis. Existe una disminución de los niveles de 25 hidroxivitamina D de 25-30 mg/ml de los 30 años hasta los 5-10 mg/ml en la década de los 80 años, lo que unido a un descenso del flujo renal y a una posible resistencia relacionada con la edad a la 1 alfa hidroxilasa, mantienen un estado de deficiencia del metabolito activo de la vitamina D. Un bajo nivel de la vitamina D empeora la capacidad del organismo de adaptarse a una baja ingesta de calcio y puede contribuir a la patogenia de la osteoporosis. Un estudio realizado en mujeres con deficiencia de vitamina D (<30 mmol/L) mostró que

desarrollaban un “turnover” óseo muy alto con elevación de los valores séricos de fósforo y una excreción urinaria de deoxipiridinolina muy alta (Diamond et al.,2002).

Muchos otros componentes de la dieta influyen en el estado de salud del hueso: potasio, magnesio, cobre, zinc, estroncio, vitaminas como la C, K y A, azúcares, ácidos grasos y proteínas (Tucker, 2003).

La malnutrición proteica contribuye al desarrollo de osteoporosis disminuyendo la masa ósea y alterando la fuerza muscular, que por sí sola también influye en el mantenimiento de la masa ósea. La dieta proteica constituye la fuente necesaria de aminoácidos y nitrógeno para la síntesis de proteínas del organismo. Estudios experimentales sobre la influencia de las dietas hipoproteicas han demostrado que tanto la malnutrición proteica como la calórico proteica disminuyen la proliferación y la maduración del cartílago, y reducen la actividad osteoblástica. Retrasos del crecimiento pueden ser revertidos con una dieta isocalórica suficiente en proteínas. Por el contrario se ha observado que las dietas hiperproteicas se asocian a un incremento en la eliminación urinaria de calcio, lo que a su vez puede inducir osteoporosis, pero si esas dietas ricas en proteínas lo son también en fósforo (dietas a base de cárnicos) el efecto hipercalcémico de las proteínas es compensado con el efecto hipocalcémico del fósforo. Se ha propuesto que el tejido óseo es un tampón tipo base para fijar la sobrecarga ácida impuestas por la ingestión de dietas ricas en proteínas. Ingestas grandes de determinados componentes de la dieta como el potasio y el magnesio, que contribuyen a generar un entorno alcalino, se asocian a DMO altas (Tucker et al., 1999).

Los mecanismos mediante los cuales la pérdida ósea acontece en la malnutrición proteica no están totalmente aclarados y pueden estar relacionados con unos niveles séricos disminuidos de IGF-1 y estrógenos (Ammann et al., 2000). La ingesta baja de proteínas deteriora tanto la producción como la acción del IGF-1, factor esencial para el crecimiento longitudinal del hueso, así como para la proliferación y diferenciación de los condrocitos. El IGF-1 puede ser considerado un factor clave en el ajuste del metabolismo calcio-fósforo así como para el desarrollo normal del esqueleto y la mineralización ósea durante el crecimiento. En niños y adolescentes sanos se ha visto una asociación positiva entre la cantidad de proteínas ingeridas y la masa ósea en ambos sexos, asociación particularmente significativa en prepúberes, sugiriendo que el

esqueleto responde particularmente a la ingesta proteica particularmente en los años previos al establecimiento de maduración puberal (Bonjour et al., 2001). Se ha observado como las alteraciones óseas inducidas por la malnutrición en estadios muy precoces de la vida pueden corregirse tras un aporte nutricional adecuado (Muzzo et al., 1995).

Algunos estudios sugieren que la ingesta proteica adecuada ayuda al mantenimiento de la masa ósea incluso en edades tardías de la vida (Rizzoli et al., 2001). En modelos humanos se ha apreciado que la ingesta baja de proteínas en ancianos se relacionan con pérdidas de masa ósea en fémur y vértebras (Hannan et al., 2000b). También en modelos humanos alcohólicos se ha apreciado modificaciones sobre la masa ósea que no se relacionaban ni con la intensidad del alcoholismo ni con la existencia de cirrosis hepática y sí lo hacen con la presencia de malnutrición (pérdida ósea que era especialmente marcada en aquellos alcohólicos con hábitos alimenticios irregulares) (Santolaria et al., 2000b). Por el contrario, Lalor et al., en 1986 en un estudio en pacientes alcohólicos con varios grados de enfermedad hepática encontró una relación entre la osteoporosis y el estadio de la función hepática así como con el tipo de alcohol consumido y los determinantes mayores del volumen óseo trabecular, ajustado por la edad, fueron la albúmina y la ingesta de calcio.

En modelos animales se ha comprobado que el déficit proteico produce una disminución de la densidad ósea, de la masa ósea esponjosa y del grosor de la trabécula, un adelgazamiento de la cortical y una disminución del osteoide y de la tasa de aposición mineral, todo lo cual se traduce en una pérdida de resistencia del tejido óseo (Bourrin et al., 2000a). De hecho se conoce que la malnutrición proteica genera una osteoporosis de bajo “turnover”, con reducción tanto de la síntesis como de la reabsorción ósea, que se acompaña de niveles plasmáticos bajos de IGF-1 y de resistencia de los osteoblastos a la acción de la IGF-1 (Bourrin et al., 2000b). Molina Pérez et al., en 2000, sobre ratas alcohólicas y malnutridas, apreciaron que la disminución de la masa ósea y de la síntesis de osteoide observada se relacionaba con la malnutrición y no así con el alcoholismo, aunque ambos, malnutrición y alcoholismo, conducían a un aumento en la hidroxiprolina en orina y a una disminución en la aposición mineral ósea.

La administración de suplementos proteicos tras facturas de cadera se asocian a un aumento de los niveles de IGF-1 y a una atenuación en la disminución de la masa ósea femoral proximal que presentan los sujetos que no reciben estos suplementos (Schurch et al., 1998).

Estudios animales, sobre ratas adultas con osteoporosis inducida, han observado que la administración de aminoácidos esenciales provoca un aumento de la masa ósea, una modificación de la arquitectura trabecular y un aumento del grosor de la cortical. Todo lo cual se traduce en un incremento de la resistencia ósea, posiblemente mediado por el IGF-1 (Ammann et al., 2002).

## 1.5. HÍGADO.

### 1.5.1. ANATOMÍA MICROSCÓPICA HEPÁTICA.

La arquitectura básica del hígado está constituida por los lobulillos hepáticos, estructura circunscrita consistente en: los *conductos hepático centrales* que contienen una tributaria central de la vena hepática, la vena centrolobulillar y su adventicia, rodeados por una lámina limitante de hepatocitos, y en la periferia, los *espacios porta* que contiene un conductillo biliar, una raicilla de la vena porta y una rama de la arteria hepática junto con unas pocas células redondas y algo de tejido conectivo, también rodeadas por una lámina limitante de hepatocitos. Entre estas dos estructuras se extienden columnas de hepatocitos que se irradian desde una vena central y se alinean de manera ordenada alrededor de los sinusoides, que contienen sangre capilar del hígado.

El tejido hepático está surcado por dos sistemas de túneles, los espacios porta y los conductos hepáticos centrales, que se afinan de modo que nunca se tocan entre sí. Los sinusoides se disponen perpendicularmente a las líneas que conectan a las venas centrales; en ellos es descargada la sangre procedentes de las ramas terminales de la porta y la dirección del flujo viene determinada por la mayor presión en la vena porta que en la central.

El hígado debe dividirse funcionalmente. Por tradición, la unidad se basa en una vena hepática central y sus hepatocitos circundantes, pero Rappaport contempla una serie de áreas funcionales, *los acinos*, de forma romboidal e integrados por tejido hepático de lobulillos contiguos. Cada acino está constituido por el tejido hepático subsidiario de un eje vascular, donde se definen tres zonas: la zona 1, alrededor del espacio porta, sería la mejor irrigada; la zona 3 (adyacente a las venas hepáticas terminales), la peor irrigada, por estar más alejada de los vasos nutricios; y una zona intermedia que sería la zona 2. Las periferias circulatorias de los acinos son las que más sufren las agresiones. Las regiones más próximas al eje formado por los vasos aferentes y los conductos biliares sobreviven más tiempo y con posterioridad pueden servir de centro a partir del cual ocurre la regeneración.

Las células hepáticas representan un 60% del hígado y viven aproximadamente 150 días en los animales de experimentación. El hepatocito tiene tres superficies, una que mira al sinusoides y al *espacio de Dissé*, espacio hístico comprendido entre los hepatocitos y las células endoteliales que recubren al sinusoides, otra que mira al conductillo y una tercera que mira al hepatocito adyacente. No existe membrana basal.

Las paredes de los sinusoides están formadas por: a) *células endoteliales*, que forman una pared continua y presentan unas fenestraciones que determinan el intercambio de líquido y el tamaño de las partículas que pueden pasar desde y hacia el espacio de Dissé, b) células fagocíticas del sistema reticuloendotelial que se conocen como *células de Kupffer*, macrófagos de gran movilidad, que fagocitan mediante endocitosis, poseen receptores de membrana para inmunoglobulinas y complemento, y ante determinados estímulos secretan sustancias como el TNF- $\alpha$ , interleucinas, colagenasas, hidrolasas lisosómica, metabolitos del ácido araquidónico y prostaglandinas, c) células de almacenamiento de grasa conocidas como *células de Ito*, que se encuentran en el espacio de Dissé y pueden contener grasa. Su ultraestructura semeja fibroblastos cuando están vacías. Almacenan el exceso de vitamina A, otras vitaminas liposolubles y otros retinoides. Cuando existe daño hepático, si es agudo, la población de células de Ito aumenta y expresa actina muscular. Si la agresión hepática es crónica las células de Ito se liberan de sus vesículas de retinoides, migran a la zona 3 donde se convierten en miofibroblastos y expresan de forma marcada actina y ocasionalmente desmina (Hautekeete et al., 1997). Estas células tienen una alta capacidad fibrogénica, secretan colágeno de los tipos I, III y IV y laminina y pueden además regular el flujo sanguíneo sinusoidal. La transformación de células de Ito a miofibroblastos está regulada por una gran variedad de señales intercelulares entre células de Ito y células de Kuffer, neutrófilos y linfocitos. Estos producen mediadores humorales como oxidantes, óxido nítrico, eicosanoides, citocinas y proteinasas que afectan a la proliferación, expresión genética y contractilidad de la célula de Ito y éstas a su vez elaboran señales que promueven la quimiotaxis y adherencia de los leucocitos, activándolos (Maher , 2001). d) Células punteadas, son linfocitos NK dotados de gran movilidad con citotoxicidad espontánea frente a hepatocitos infectados por virus.

El sistema excretor del hígado empieza en los *canalículos biliares*, conductillos que carecen de paredes y son simples surcos en las superficies de contacto entre los

hepatocitos. La red canalicular intralobulillar drena en unos conductillos biliares terminales denominados *conductos de Hering*, los cuales a su vez desembocan en otros mayores situados en los tractos portales.

La *matriz extracelular* es patente cuando existe enfermedad hepática, pero también existe de una forma sutil incluso en el hígado normal. Los constituyentes más importantes de ésta son el colágeno tipo IV, la fibronectina, la laminina, Heparán-sulfato y los proteoglicanos y contribuyen a su formación todas las células contiguas al sinusoide (Sherlock and Dooley, 1995).

### 1.5.2. FUNCIÓN HEPÁTICA.

El hígado desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis metabólica. Algunas funciones son más sensibles que otras, pero el hígado posee una capacidad de reserva considerable, de tal forma que una alteración mínima o moderada puede no reflejarse en alteraciones metabólicas detectables. Estas alteraciones son más notorias en los pacientes con hepatopatías avanzadas y sus manifestaciones se asemejan, independientemente del desencadenante etiológico inicial.

Los procesos bioquímicos en los que el hígado participa de un modo fundamental son: a) el metabolismo intermediario de los aminoácidos e hidratos de carbono, b) la síntesis y degradación de proteínas y glucoproteínas, c) el metabolismo y degradación de medicamentos y hormonas y d) la regulación del metabolismo de los lípidos y el colesterol.

Las funciones relativas de las células que están en la periferia circulatoria de los acinos (zona 3), junto a las venas hepáticas terminales son distintas de las que están en el área circulatoria alrededor a las arterias hepáticas y venas portales terminales (zona 1) (Fig.3). Las causas de las diferencias metabólicas entre las distintas zonas varían. Para algunas funciones (glucólisis, gluconeogénesis, cetogénesis) parece ser dependiente de la dirección del flujo sanguíneo a lo largo del sinusoide. Para otras (citocromo P450), la tasa de transcripción difiere entre los hepatocitos perivenosos y periportales. La expresión diferencial de la glutamina sintetasa a lo largo de los acinos está ya

establecida en el hígado fetal. También existen diferencias zonales en la celeridad del transporte hepático de sustancias desde los sinusoides hacia los canálculos.

En la zona 1 está la mayor concentración de enzimas del ciclo de Krebs y de las encargadas de la síntesis de la urea. En esta zona es mayor el aporte de oxígeno e igualmente la sangre que reciben tiene una alta concentración de sales biliares, revistiendo particular importancia en la síntesis de bilis dependiente de sales biliares. La zona 3 es una zona donde las enzimas P450 metabolizantes de drogas abundan, sobre todo tras la inducción enzimática con fenobarbital. Los hepatocitos de la zona 3 reciben una alta concentración de productos del metabolismo de las drogas, lo que junto con la menor concentración de glutatión que presentan los hace especialmente susceptibles a las reacciones hepáticas por drogas. Los hepatocitos del área 3 son también muy propensos al daño hepático anóxico por las razones comentadas previamente.

**Figura 3. Metabolismo del hepatocito en relación con la zona en la que se encuentre.**

	ZONA 1	ZONA 3
Hidratos de carbono	Gluconeogénesis	Glucolisis
Síntesis de proteínas	Albúmina y fibrinógeno	Albúmina y fibrinógeno
Citocromo P450	+	++
Tras fenobarbital	+	++++++
Glutatión	++	-
Aporte de O <sub>2</sub>	+++	+
Síntesis de bilis		
Dependiente de sales biliares	++	-
No Dependiente de sales biliares	-	++
Sinusoides	Pequeños	Rectos

**Metabolismo de los aminoácidos y de las proteínas.**

Los aminoácidos procedentes de la dieta y de la degradación tisular de proteínas llegan al hígado para metabolizarse; algunos son transaminados o desaminados a

cetoácidos que se metabolizan por muchas vías entre ellas las del ciclo del ácido cítrico de Krebs, imprescindible para que los aminoácidos puedan emplearse como fuente de energía. La desaminación tiene como consecuencia la producción de amoníaco que posteriormente se transformará en urea por el ciclo de la urea de Krebs-Henseleit.

El hígado es un lugar importante para la síntesis y degradación de proteínas, (posee la tasa más alta de síntesis por gramo de tejido) funciones éstas que se ven influenciada por hormonas como la insulina y el glucagón o diversas citocinas. El hepatocito produce albúmina (aproximadamente 10-12 g/día, lo que representa un 25% de la producción total de proteínas en el hígado), fibrinógeno, componente C3 del complemento,  $\alpha$ -1-antitripsina, haptoglobina, ceruloplasmina, transferrina y protrombina, factores de la coagulación, y  $\alpha$ -fetoproteína y  $\alpha$ <sub>2</sub>-macroglobulina entre otras; algunas de ellas, reactantes de fase aguda, son sintetizadas en respuesta a un daño tisular a través de un mecanismo complejo en el que intervienen diversas citocinas como el TNF-  $\alpha$ . IL-1 e IL-6, que estimulan la producción de éstas en detrimento de las restantes.

### **Metabolismo de los carbohidratos**

El hígado mantiene la glucemia dentro de límites normales mediante una combinación de glucogenogénesis, glucogenolisis, glucólisis y neoglucogénesis. Estas funciones están reguladas por diversas hormonas, sobre todo insulina, glucagón, hormona del crecimiento y algunas catecolaminas. En ayunas el hígado contribuye al mantenimiento de la glucemia mediante la glucogenolisis, pero los depósitos hepáticos de glucógeno se vacían al cabo de un día de ayuno. El mecanismo principal es la neoglucogénesis, proceso que guarda relación con el catabolismo proteico muscular, en respuesta a la hipoinsulinemia y la hiperglucagonemia. En la enfermedad hepática son frecuentes la hiperglucemia y la intolerancia a la glucosa con concentraciones plasmáticas de insulina aumentadas (Santolaria et al., 1983). Se cree que es debido a resistencia a la insulina por diversos mecanismos (Petrides et al., 1998; Aoki et al., 2000). Y en fases finales es más común la hipoglucemia por disminución de los depósitos hepáticos de glucógeno y de su síntesis y por disminución de la respuesta al glucagón.

### **Metabolismo de los lípidos y el colesterol.**

La mayor parte de los ácidos grasos captados por el hígado y esterificados en forma de triglicéridos proceden de la dieta y del tejido adiposo. Algunos ácidos grasos se sintetizan en el hígado a partir del acetato. Los ácidos grasos pueden convertirse en triglicéridos, esterificarse con colesterol, incorporarse a los fosfolípidos u oxidarse hasta originar CO<sub>2</sub> o cuerpos cetónicos. La mayoría de los triglicéridos se sintetizan para la exportación, pero para ello han de transformarse en lipoproteínas combinándose con moléculas de apoproteínas. El hígado es el principal responsable del catabolismo de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), de la secreción y degradación de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y podría intervenir en el catabolismo de las de alta densidad (HDL). El aumento del aporte de ácidos grasos hacia el hígado, el aumento de la síntesis o la disminución de la oxidación de ácidos grasos hepáticos o la disminución de la síntesis de apoproteínas contribuyen a la acumulación de lípidos y la formación de hígado graso. Diferentes trastornos que alteran el metabolismo hepático de las grasas pueden originar dos tipos distintos de depósito de grasa en forma de macrovesículas o microvesículas.

La síntesis de colesterol y de los ácidos biliares corre a cargo sobre todo del hígado. La enzima limitante de la biosíntesis es la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa. El colesterol existe en forma libre o combinado con ácidos grasos formando ésteres de colesterol. La alteración hepática grave origina disminución en la concentración de colesterol total, que puede deberse a una disminución de la síntesis de colesterol, y de ésteres de colesterol, a un descenso de la síntesis de apoproteínas o a ambos factores.

### **Metabolismo y degradación de medicamentos y hormonas.**

El hígado desempeña un papel importante en el metabolismo de muchos medicamentos y hormonas endógenas en relación con varios sistemas enzimáticos involucrados en las transformaciones bioquímicas y por el efecto de “primer paso” que sufre la sangre procedente de la práctica totalidad del tracto gastrointestinal y que alcanza el hígado a través de la circulación portal. Los determinantes principales de la depuración hepática de un medicamento son el flujo sanguíneo, su unión a proteínas y la capacidad intrínseca del hígado para eliminarlo. Existen dos tipos principales de reacciones. *Reacciones de fase I* suelen producir la inactivación de medicamentos pero

también pueden producir una activación. Estas reacciones suelen correr a cargo de los citocromos b<sub>5</sub> o el P450 y la glutathion-s-aciltransferasa. *Las reacciones de fase II* transforman los sustratos convirtiéndolos en hidrosolubles, lo que permite su excreción por bilis u orina. En las enfermedades hepáticas la detoxificación puede verse alterada por cortocircuito portosistémico, que disminuye el “primer paso” por la hipoalbuminemia, con el consecuente aumento de la forma libre de algunos medicamentos, y por la disminución de la actividad de los sistemas enzimáticos.

También a nivel hepático se produce la inactivación o modificación de varias hormonas endógenas por proteólisis o desaminación; son ejemplo de ello la tiroxina, la triyodotironina, los esteroides y la aldosterona. También a través del hígado se eliminan algunas sustancias vasoactivas como la adrenalina y la bradicinina.

### 1.5.3. HIGADO Y ALCOHOL.

Los mecanismos patogénicos de la lesión hepática que se observa tras la ingesta de alcohol no están totalmente aclarados en la actualidad. Se sabe que el alcohol induce daño hepático, principalmente porque es en este órgano donde se metaboliza la mayor parte del alcohol consumido, pero no todos los que abusan de forma crónica del alcohol sufren daño hepático. Se han identificado varios factores de riesgo que pueden explicar las diferencias interindividuales.

1) **Cantidad y duración de la ingesta de alcohol.** La dosis requerida de alcohol al día para el desarrollo de cirrosis es de 40g. para la mujer y 80 g. para el hombre durante 10-20 años aproximadamente. El riesgo se basa en la cantidad consumida y no en el tipo de bebida. La ingesta diaria es más peligrosa que el consumo intermitente, en el que se le da al hígado una oportunidad de recuperación. En aquellos pacientes que consumen más de 230 g. de etanol al día por lo menos durante 20 años, al menos el 80% desarrolla un hígado graso y el 50% presenta lesiones compatibles con cirrosis o precirrosis (Lelbach, 1975). La mitad de los consumidores de cantidades importantes no desarrolla lesiones hepáticas graves, lo cual implica que deben existir otros factores que reducen o aceleran el riesgo de ello.

2) **Coexistencia de infección por virus de la hepatitis B y C.** La prevalencia de la infección por virus de la hepatitis C en pacientes con enfermedad hepática por alcohol es del 30%, y por el virus de la hepatitis B es mucho menor. La concurrencia de hepatitis viral puede acelerar la enfermedad hepática en alcohólicos teniendo ambas un efecto aditivo sobre el riesgo de desarrollo de hepatocarcinoma. La presencia de anticuerpos frente al virus de la hepatitis C en alcohólicos con enfermedad hepática se ha correlacionado con la gravedad de la enfermedad (Mendenhall et al., 1991).

3) **Factores genéticos.** Han sido identificados varios factores genéticos que incrementan el riesgo de lesión hepática en alcohólicos. Así el sexo femenino tiene mayor riesgo de desarrollo de lesión hepática para similares cantidades ingeridas y tiempo de ingesta que los hombres y además la lesión hepática progresa a mayor velocidad (Gaveler et al., 1995). La mujer tiene menos ADH gástrica y los niveles plasmáticos, para una dosis standard de alcohol, son mayores que para los hombres. Los individuos de raza asiática parecen estar protegidos frente al alcohol debido a que presentan una deficiencia relativa de la isoenzima ALDH 2 lo que ocasiona una acumulación de acetaldehído que crea una reacción de malestar y enrojecimiento facial que origina una aversión a la ingesta de alcohol (Enomoto et al., 1991). Ciertos fenotipos HLA parecen también incrementar el riesgo de enfermedad hepática (Morgan et al., 1980; Doffoel et al., 1986) así como un polimorfismo del TNF- $\alpha$  que se encuentra más comúnmente en pacientes con esteatohepatitis alcohólica que en controles (Grove et al., 1997). Además las tasas de eliminación del alcohol varían hasta el triple entre unos individuos y otros, lo que puede estar relacionado con el polimorfismo genético de los dos sistemas de metabolización del alcohol, el MEOS y la ADH.

4) **Obesidad.** Puede ser un factor de riesgo de enfermedad hepática alcohólica. En un estudio llevado a cabo en alcohólicos se observó que un IMC  $> 25 \text{ kg/m}^2$  por lo menos durante 10 años era factor independiente de riesgo para esteatosis, hepatitis alcohólica y cirrosis (Naveau et al., 1997). En estudios experimentales se ha demostrado que ratones genéticamente obesos presentan un incremento de riesgo de lesión hepática por endotoxinas (Yang et al., 1997). Otro estudio más reciente llevado a cabo en alcohólicos mostró que el IMC, la glucemia y los depósitos hepáticos de hierro eran predictores independientes de fibrosis (Raynard et al., 2002).

5) **Exposición a hepatotoxinas**. En general dos agentes hepatotóxicos, actuando conjuntamente, se potencian y aumentan el riesgo de lesión hepática por encima de lo que lo haría cada uno por separado. Así, en alcohólicos, el paracetamol puede inducir hepatotoxicidad a dosis terapéuticas, aunque hay estudios que no confirman esta aseveración.

6) **Sobrecarga férrica**. Potencia el desarrollo de la enfermedad hepática alcohólica debido a la capacidad del hierro de actuar como donante de electrones; de esta manera favorece la formación de radicales libres inestables que lesionan las membranas y al mismo tiempo estimulan la producción de agentes quimiotácticos para los neutrófilos lo que contribuye a aumentar la respuesta inflamatoria (Stal et al., 1993; Hultcrantz et al., 1991). La sobrecarga hepática de hierro se ha asociado a un aumento de la peroxidación lipídica y del depósito de grasas en hígado (Sadrzadesh et al., 1994) no sólo en el alcoholismo sino que también se correlaciona positivamente con la severidad del daño hepático en la esteato-hepatitis no alcohólica (George et al., 1998).

7) **Malnutrición**. Lo referente a este tema se comentará en un apartado posterior.

Existen varias teorías a cerca de los mecanismos mediante los cuales el alcohol puede inducir daño hepático, estos mecanismos no son autoexcluyentes y pueden actuar conjuntamente: a) **Hipoxia centrolobulillar**: esta teoría sugiere el desarrollo de una zona hipoxémica alrededor de las venas centrales, ya que es esta zona la más alejada de la sangre oxigenada y donde con mayor probabilidad puede faltar oxígeno al ser este consumido para el metabolismo del etanol. Estudios experimentales han demostrado la existencia de un gradiente de oxígeno entre las áreas periportales y pericentrales y también cómo el propiltiouracilo, sustancia con capacidad para disminuir el consumo de oxígeno, reduce el daño hipóxico relacionado con el alcohol (Ross et al., 1995). También en estudios humanos se vio inicialmente que el PTU podría disminuir la lesión hepática pericentral, observaciones que no se han confirmado posteriormente (Orrego et al., 1994). El alcohol podría producir citotoxicidad en hepatocitos hipóxicos al incrementar el sodio intracelular (Carini et al., 2000). b) **Infiltración y activación de células inflamatorias**: los mediadores de la inflamación liberados por las células de Kupffer pueden jugar un papel en el daño hepático inducido por el etanol. Estudios

experimentales han mostrado en ratas alimentadas con alcohol una sobreexpresión del RNAm de la COX 2 (Nanji et al., 1997a), enzima clave para la regulación de la producción de tromboxanos y cómo inhibidores de los tromboxanos pueden atenuar parte de los cambios patológicos inducidos en estos animales (Nanji et al., 1997b). **c) Formación de puentes antigénicos:** tanto los radicales oxhidrilos como las moléculas de acetaldehído, productos ambos del metabolismo del etanol, pueden unirse por enlaces covalentes a proteínas originando puentes con capacidad antigénica que poseen propiedades proinflamatorias y fibrogénicas (Tuma, 2002). Esta unión se puede producir con múltiples moléculas proteicas como la colágena o la tubulina y las consecuencias de la formación de estos, así llamados “aductos” pueden ser dos: por un lado pueden provocar alteraciones en la función de las proteínas a las que se une (Niemela et al., 1994), por otro, estos puentes pueden ejercer como neoantígenos provocando una respuesta inmune tanto celular como humoral frente a las células que los expresan (Bird et al., 1995; Clot et al., 1997; Willis et al., 2002). Sin embargo también se han encontrado puentes de proteínas con acetaldehído en pacientes con enfermedad hepática no alcohólica. En la actualidad y con los datos disponibles no se puede determinar si los aductos tienen un papel patogénico o si sólo son un epifenómeno de la ingesta de alcohol aunque un estudio reciente ha demostrado la destrucción de hepatocitos producida por una reacción citotóxica mediada por células desencadenada por complejos antígeno-anticuerpo, formados por aductos entre proteínas y radicales oxhidrilos. **d) Infiltración y activación de neutrófilos:** dado que es muy característico de la hepatitis alcohólica la infiltración por neutrófilos, por otro lado ausente en otras enfermedades hepáticas inflamatorias, se piensa que estos neutrófilos puedan liberar radicales libres y proteasas que contribuyan al daño hepático. En este sentido se ha observado que la IL-8, citocina con efecto quimiotáctico frente a los neutrófilos, se ha identificado en el hígado de pacientes alcohólicos y se encuentra elevada en el suero de pacientes con hepatitis alcohólica y que la severidad de la lesión hepática se relaciona con los niveles plasmáticos de IL-8 (Sheron et al., 1993). **e) Activación de célula no parenquimatosas hepáticas:** como los macrófagos y las células endoteliales de los sinusoides hepáticos, capaces de secretar mediadores inflamatorios, han sido implicadas en la patogénesis de la lesión hepática. Se ha apreciado, recientemente que cuando las células endoteliales son expuestas a aductos de malonildialdehído, incrementan la secreción de TNF alfa y otras citocinas y se incrementa la secreción de fibronectina resultando en la liberación de colágena por la

célula de Ito (Thiele et al., 2004). También se sugiere que una interacción citotóxica entre linfocitos T y hepatocitos puede generar o perpetuar la enfermedad hepática inducida por el alcohol (Chedid et al., 1993). **f) Endotoxinas:** se cree que niveles elevados de lipopolisacáridos puedan contribuir al desarrollo de enfermedad hepática alcohólica mediante la estimulación de citocinas inflamatorias. Tanto en la sangre de humanos como en la de animales de experimentación expuestos al alcohol se han detectado cantidades elevadas de polisacáridos. Modelos experimentales han observado como tras la infusión de lipopolisacáridos se produce una respuesta de citocinas pro y antiinflamatorias (Jarvelainen et al., 1999). El alcohol incrementa la permeabilidad intestinal a endotoxinas derivadas de bacterias intestinales gram negativas que activan a las células de Kupffer, mediante su unión al receptor 4 toll-like (Uesugi et al., 2001), produciendo la liberación de citocinas, mediadores de la inflamación y ROS, derivados del incremento de la actividad de la xantino-oxidasa y la NADPH-oxidasa (Kono et al., 2000), que finalmente activarán al TNF alfa, que a su vez aumenta aún más la permeabilidad intestinal. **g) Citocinas:** está documentada la existencia de niveles elevados de IL-6 y TNF- $\alpha$  en la enfermedad hepática alcohólica. El papel de estas en la lesión hepática no está probado del todo pero en un estudio experimental se ha observado cómo la inflamación y necrosis hepática presente en ratas alcohólicas mejoraba tras la administración de anticuerpos neutralizadores del TNF- $\alpha$ . (Iimuro et al., 1997). Posteriormente en un estudio animal se observó que la lesión hepática precoz inducida por el alcohol se mitigaba casi por completo en ratones a los que se les eliminaba el receptor 1 del TNF- $\alpha$  (Yin et al., 1999), apoyando la teoría de que los ROS actúan como señales redox para la producción de TNF- $\alpha$  y no lesionan directamente la célula (Yin et al., 2001). El TNF- $\alpha$  es proapoptótico y mitogénico para el hepatocito probablemente porque activa a proto-oncogenes como el Ras (Isayama et al., 2004). También el TNF alfa activa la lipólisis periférica y la síntesis lipídica en el hígado (Feingold et al., 1992), aumentando la carga de ácidos grasos que llegan al hígado y de esta forma contribuyendo a la esteatosis hepática.

#### 1.5.4. HEPATOPATÍA ALCOHÓLICA.

Los principales estadios patológicos de la enfermedad hepática ocasionada por el alcohol son tres:

1) **Hígado graso.** Es la consecuencia a corto plazo de la ingesta de alcohol, puede desarrollarse incluso a las pocas horas de una ingesta muy importante de alcohol y con independencia de un estado nutricional adecuado. Los cambios más precoces incluyen: acumulación de gotas de grasa como micro o macrovesículas, proliferación del retículo endoplásmico liso y alteraciones de la estructura mitocondrial (el defecto observado con mayor frecuencia es la inhibición de la oxidación beta de los ácidos grasos). La inflamación en este estadio es mínima salvo algunos linfogramas en las zonas pericentrales. En un estudio en pacientes alcohólicos con hígado graso puro se observó que la presencia de mitocondrias gigantes y la existencia de macro y microvesículas eran factores independientes predictores de progresión histológica si no cesaba el consumo de alcohol (Teli et al., 1995a). El hígado graso no es patognomónico de la ingesta de alcohol y se puede desarrollar en otras muchas circunstancias como el embarazo, tóxicos, la malnutrición, síndrome de Reye entre otros (Hautekeete et al., 1990). Sin embargo en el hígado graso no alcohólico no se ha visto progresión a estadios histológicos más avanzados (Teli et al., 1995b). La etiología de la enfermedad es por tanto importante para definir el pronóstico, ya que el hígado graso alcohólico tiene mucho mayor riesgo de progresión y mortalidad que el no alcohólico y esto es particularmente importante en aquellos grupos de individuos que tienen alto riesgo de acelerar el daño hepático por el alcohol como los obesos, las mujeres y los infectados por el virus de la hepatitis C (Maher, 2002).

2) **Hepatitis alcohólica.** Las características histopatológicas incluyen: la necrosis hepatocitaria, presencia de cuerpos de Mallory, la infiltración por neutrófilos y la inflamación perivenular. Otros cambios histológicos que pueden aparecer pero no son esenciales son proliferación de conductillos biliares, colestasis y puentes de necrosis. La presencia de hialina de Mallory es un marcador de lesión hepática inducida por alcohol, aparece en un 75% de la hepatitis alcohólicas y en el 95% de las cirrosis, pero no son específicos de ellas; también se pueden observar ocasionalmente en la esteatohepatitis no alcohólica, entidad que con baja frecuencia puede presentarse con fibrosis hepática y

progresar hacia estadios finales de enfermedad hepática y donde la edad avanzada, la obesidad, la diabetes y el cociente GOT/GPT >1 se han mostrado como predictores de fibrosis grave (Angulo et al., 1999).

3) **Fibrosis y/o cirrosis hepática.** Inicialmente aparece en la zona pericentral y progresa hasta la afectación de todo el lobulillo si no cesa la ingesta alcohólica. La aparición precoz de esta fibrosis predice con alta probabilidad la evolución a cirrosis. La fibrosis, originada por acumulación de matriz extracelular, es potencialmente reversible si se interrumpe el consumo de alcohol; la cirrosis no lo es. La matriz extracelular en los hígados fibróticos está compuesta por moléculas de colágena tipo I y III, laminina, fibronectina y proteoglicanos y son las células de Ito su principal fuente de producción, las cuales son activadas ante diversos estímulos. La fibrosis perivenular y perisinusoidal que caracteriza a la cirrosis alcohólica es distinta de la observada en otros tipos de hepatopatías fibrosas, sin embargo, los mecanismos celulares y reguladores que la originan son similares en todos los tipos de fibrosis hepática. La fibrosis puede ser el resultado de la acción directa del etanol y sus metabolitos sobre una población celular diana, presumiblemente los lipocitos, o puede iniciarse indirectamente en respuesta a la inflamación hepática, a través de citocinas liberadas de las células inflamatorias las cuales a su vez pueden alterar la matriz extracelular normal hepática, pudiendo en sí misma actuar como estímulo para la fibrogénesis. Este último hecho podría explicar la perpetuación de la fibrosis en ausencia de inflamación continuada, lo cual explicaría la progresión de la fibrosis en algunos pacientes alcohólicos en ausencia de hepatitis alcohólica (Maher, 1990).

#### 1.5.4.1. BALONAMIENTO HEPATOCITARIO.

El aumento del tamaño del hepatocito obedece a dos fenómenos: al incremento de su contenido en grasas y a una acumulación de proteínas y agua. Este proceso conduce a hepatomegalia y puede causar hipertensión portal por compresión de los sinusoides. Ya en 1975, Baraona y colaboradores observaron que al menos el 50 % de este crecimiento celular era debido al incremento en el contenido proteico intracelular, lo que supone un aumento de la presión oncótica celular con retención de agua y crecimiento hepatocitario. El incremento de la concentración proteica intracelular es

resultado de un desequilibrio entre la síntesis y secreción de proteínas y su catabolismo, procesos estos que pueden verse afectados por el etanol.

### **Efectos del alcohol sobre la síntesis y secreción de proteínas.**

El alcohol puede disminuir la síntesis tanto de proteínas propias del hígado como aquellas destinadas a ser exportadas desde el hígado (Lieber, 1980). La administración aguda de alcohol puede provocar una inhibición de la síntesis proteica al originar modificaciones del estado redox intracelular derivadas del metabolismo del etanol a través del sistema enzimático de la alcohol deshidrogenasa. El exceso de equivalentes reducidos en el citoplasma promueve el uso de piruvato y otros aminoácidos implicados en los sistemas lanzadera necesarios para transportar a estos equivalentes reducidos hasta las mitocondrias e incrementan la transformación de piruvato a lactato, derivando de esta forma aminoácidos de la síntesis de proteínas hacia otras vías metabólicas. Estos efectos sin embargo no son tan claros y marcados en los estudios realizados in vivo, al igual que tampoco los son en estudios en los que la administración de alcohol es crónica (probablemente reflejando de esta forma que la vía de la alcohol deshidrogenasa es menos importante en el metabolismo del alcohol cuando este es ingerido de forma crónica). Se ha observado en ratas alimentadas de forma crónica con dietas que contienen alcohol que éste no induce cambios en la incorporación de los aminoácidos a las proteínas en los hepatocitos (Baraona et al., 1980) e incluso se ha observado que ingestas agudas de alcohol en ratas alimentadas crónicamente con alcohol exhiben una capacidad aumentada de incorporar aminoácido a las proteínas, mientras el efecto opuesto se ha observado en animales NAIVE. Estudios más recientes indican, sin embargo, que tanto la administración aguda como crónica de alcohol disminuye de forma significativa la síntesis proteica, en parte debido a una alteración en la iniciación de la traslación debida a alteraciones en factores de iniciación (Lang et al., 1999b). Como comentábamos la producción de algunas de las proteínas que se exportan desde el hígado también está disminuida pero esto parece ser más dependiente de la inhibición de la secreción de proteínas que de la propia síntesis (Baraona et al., 1980).

El efecto del etanol sobre la secreción de proteínas es provocado por la toxicidad del acetaldehído, capaz de inhibir la polimerización de la tubulina, principal proteína involucrada en la integridad de los microtúbulos, y causar crecimiento del aparato de Golgi. El etanol reduce significativamente la capacidad de la mitocondria para oxidar el

acetaldehído. Esto conduce a una elevación de las concentraciones sanguíneas y hepáticas de acetaldehído y secundariamente a una disfunción mitocondrial al reducir la actividad de varios sistemas lanzaderas involucrados en la disposición de equivalentes reducidos y al inhibir la fosforilación oxidativa. Todos estos hechos suponen aún mayor elevación de las concentraciones de acetaldehído y una perpetuación del daño hepático y sobre la secreción proteica (Lieber, 1980). De esta forma aumenta el contenido hepatocitario de proteínas como la albúmina y la transferrina, lo cual, unido a la proliferación de las membranas del retículo endoplásmico liso y a la presencia de megamitocondrias, contribuye al incremento del contenido proteico de la célula hepática (Lieber, 1980).

#### **Efectos del alcohol sobre el catabolismo proteico.**

El principal factor responsable de la acumulación de proteínas en el hígado parece estar relacionado con la disminución en la tasa de degradación proteica afectando a las dos vías proteolíticas, la lisosomal y la extralisosomal. Dentro del sistema de proteólisis citoplásmica cabe destacar a las calpaínas, proteínas dependientes de calcio relacionadas con la degradación de enzimas y proteínas del citoesqueleto, y el complejo multicatalítico proteosoma 26 S que a su vez incluye al 20 S y que son los principales componentes de la actividad citoplásmica proteasa alcalina. La mayor parte de los sustratos del proteosoma 26 S necesitan previamente ser ubiquitinados antes de ser degradados. Pues bien, se ha visto que la actividad citoplasmática proteasa alcalina está disminuida en el hígado de las ratas alimentadas con etanol mediante instilación intragástrico, siguiendo el modelo de Tsukamoto y French (Fataccioli et al., 1999). El descenso de la actividad proteolítica citosólica se relaciona con un incremento en la peroxidación lipídica debido a la inducción del citocromo P450 (CYP 2E1) por el etanol.

#### **Efectos del alcohol sobre el metabolismo de las grasas.**

El contenido total de lípidos en hígados sometidos al alcohol de forma crónica está aumentado, también se observan cambios en la composición de lípidos (aumento de la cantidad de grasa no saturadas) (Takahashi et al., 1991). El alcohol induce un aumento de la lipólisis mediado por un aumento del tono adrenérgico y por el TNF- $\alpha$ . Además, el exceso de equivalentes reducidos a nivel citosólico, resultado del

metabolismo del etanol, favorece la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos e inhibe la oxidación de ácidos grasos y la secreción de lipoproteínas.

#### 1.5.4.2. NECROSIS E INFLAMACIÓN HEPÁTICA.

El incremento de los productos derivados de la peroxidación lipídica es un paso clave en la progresión de la lesión hepática inducida por el alcohol. Estudios experimentales han mostrado que la metabolización del etanol a través del sistema microsómico oxidante induce al citocromo P450 2E1, genera radicales hidroxietilos y que la inhibición de esta inducción disminuye las concentraciones hepáticas y plasmáticas de los productos de la peroxidación lipídica (Albano et al., 1996). Estos radicales hidroxietilos generan daño oxidativo y estimulan la peroxidación lipídica. Esto provoca la formación de enlaces covalentes entre acetaldehído, malonildialdehído y los propios radicales con proteínas de membrana y citosólicas, los llamados aductos, que por un lado alteran la función de estas proteínas, y por otro sirven como sustratos con capacidad antigénica capaces de inducir lesiones celulares mediadas por mecanismos inmunológicos, hechos éstos que han sido observados tanto en estudios animales (Albano et al., 1999) como en humanos (Rolla et al., 2000; Albano, 2002). Además estos aductos generan la producción de diversas citocinas, incluido el TNF- $\alpha$ , capaces a su vez de estimular la secreción de fibronectina y de esta forma activar a las células de Ito (Tuma, 2002). Recientemente se ha descrito como nuevo marcador de alcoholismo y daño oxidativo las concentraciones plasmáticas de hidróxido de fosfatidilcolina (Adachi et al., 2004).

Paralelamente a este aumento en la producción de radicales libres se reduce la actividad de los sistemas antioxidantes hepáticos. Han sido descritas reducciones en la concentración de  $\alpha$ -tocoferol (Rouach et al., 1997), en las actividades de la SOD y GPX hepáticas (Polavarapu et al., 1998; Zima et al., 2001) y disminución en la actividad del sistema de reciclaje de la glutatión (Oh et al., 1997). Además el acetaldehído puede formar aductos con la cisteína y la glutatión, y de esta forma contribuir a la depresión de los sistemas antioxidantes. Así se incrementa la oxidación de proteínas y la peroxidación lipídica.

1.5.4.3. FIBROGÉNESIS HEPÁTICA.

Como consecuencia de variadas noxas (virus C, alcohol), aumenta en el hígado la producción y el depósito de la matriz extracelular, constituida fundamentalmente por fibras de colágeno. Este depósito exagerado de colágeno distorsiona la arquitectura y con ello la función del órgano y es debido a un desequilibrio entre la síntesis y la degradación de colágeno. La fibrosis es uno de los componentes fundamentales del daño hepático crónico, cuya fase final es la cirrosis. Varias son las estirpes celulares involucradas en la fibrogénesis los hepatocitos, las células de Kupffer, las células del endotelio sinusoidal, los miofibroblastos y las células de Ito, principal fuente matriz extracelular con papel fundamental en este proceso. Precozmente se produce cambios en la composición la matriz del espacio de Dissé, que se enriquece en fibronectina, y colágeno tipo III y tipo I, en vez de colágena tipo IV, constituyente normal. La colágena tipo I y la fibronectina son potentes estímulos quimiotácticos para las células de Ito, que en respuesta migran hacia el espacio de Dissé, proceso éste intensamente aumentado por diversos factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico, el factor de crecimiento derivado de las plaquetas o el TGF- $\beta$ 1 (Yang et al., 2003). La sobreexpresión de los receptores de estos factores de crecimiento sobre la célula estrellada está provocada por el TNF- $\alpha$ , derivado en su mayoría tras la activación de la célula de Kupffer, y que también es capaz de actuar sobre las células de Ito no activas induciendo su división y su transformación en células secretoras de colágeno. Una vez activadas las células de Ito también secretan citocinas y factores de crecimiento, lo que conduce a una perpetuación de este ciclo y consecuentemente a una fibrosis progresiva.

Por otro lado, la disminución de la degradación de la colágena puede también contribuir al fenómeno de fibrogénesis. En el hígado normal este proceso está regulado por las metaloproteinasas de la matriz y sus inhibidores. Sin embargo, el metabolismo de este sistema regulador sólo se conoce parcialmente en la enfermedad hepática fibrosa. Estudios iniciales en este sentido apuntan a un incremento de la actividad de la colagenasa en ratas tratadas con etanol (Lieber, 1980). Más recientemente se apunta a que el depósito de tejido fibroso se asocia a un incremento inicial de la actividad de las metaloproteinasas, para posteriormente decrecer esta actividad al mismo tiempo que se produce un incremento en la actividad del inhibidor tisular de las metaloproteinasas

(TIMP). De esta forma globalmente la degradación de la colágena está deprimida en las enfermedades hepáticas fibróticas (Alcolado et al., 1997).

El etanol induce la expresión del RNAm de la  $\alpha$ -1 procolágena de una forma dosis dependiente (Fontana et al., 1997), proceso también activado por el acetaldehído en cultivos celulares de células de Ito, (Greenwel et al., 2000), donde induce la expresión de los genes de la  $\alpha$ -1 colágena y de la fibronectina (Svegliati-Baroni et al., 2001).

Diversas citocinas y ROS se han involucrado en la patogenia de la fibrosis hepática. Se ha observado en la hepatitis alcohólica que la producción de ROS por los neutrófilos contribuye al desarrollo de fibrosis hepática, pero dicha activación de los neutrófilos también induce la producción de óxido nítrico el cual pudiera ejercer un efecto protector antioxidante (Casini et al., 1997). También estudios experimentales han mostrado que hepatocitos que expresan el citocromo P450 2E1 (CYP2E1) presentan un aumento de la producción de ROS (Nieto et al., 1999) capaces de activar a las células hepáticas estrelladas (Nieto et al., 2002).

Igualmente los productos de la peroxidación lipídica se han propuesto como mediadores de la fibrosis hepática, no como iniciadores de este fenómeno sino como potenciadores (Maher et al., 1994).

Recientemente además se ha sugerido una relación entre fibrogénesis y apoptosis (Cambay et al., 2002).

#### 1.5.5. HIGADO Y MALNUTRICIÓN.

Alcoholismo y malnutrición son dos entidades intensamente asociadas. En el individuo alcohólico está alterada la ingesta de determinados micronutrientes (zinc, selenio, vitamina C, E y A y folatos), así como el porcentaje de calorías ingeridas en forma de proteínas o grasas, que también se ven reducidos (Bergheim et al., 2003; Manari et al., 2003).

La prevalencia de la malnutrición en el alcoholismo es muy variable en los distintos estudios habiéndose llegado a documentar rasgos de algún tipo de malnutrición, calórica o proteica, hasta en un 100% de los pacientes con hepatitis alcohólica (Mendenhall et al., 1984). Sin embargo, la prevalencia estimada en la mayoría de los trabajos está alrededor del 30%. Además la malnutrición que se relaciona con el alcoholismo es multifactorial en su patogenia. Santolaria et al., en 2000a encontraron como únicos factores independientes para el desarrollo de ella, los hábitos irregulares alimenticios y la cirrosis descompensada (ascitis). Otros encuentran que son la dosis total de etanol, la ingesta calórica y la cirrosis las variables que se asociaron de forma independiente al desarrollo de malnutrición en alcohólico (Nicolas et al., 1993). También se han encontrado concentraciones elevadas de leptina, hormona involucrada en la regulación del apetito, en el alcoholismo crónico de una forma dosis dependiente, independientemente del estado nutricional y de la presencia de enfermedad hepática compensada (Nicolas et al. 2001). Nuestro grupo, en un trabajo reciente en el que se incluyeron 80 pacientes alcohólicos, encontró una disminución de las concentraciones de leptina que se relacionaba con la masa grasa de estos pacientes (Santolaria et al., 2003).

Es sabido que la malnutrición proteica se asocia a cambios histológicos hepáticos similares a los inducidos por el alcohol y que incluyen la esteatosis, necrosis y fibrosis hepática. De hecho ambos, malnutrición y alcohol, pueden interactuar potenciando la lesión hepática. La malnutrición proteica induce lesión hepática por varios mecanismos que incluyen: a) la disminución de la síntesis de proteínas, efecto este compartido por el etanol; b) la reducción del aclaramiento hepático del etanol, al disminuir las actividades de la alcohol deshidrogenasa y del sistema microsómico oxidante del etanol, aunque el efecto opuesto se ha observado cuando concurren alcoholismo y malnutrición proteica (Wilson et al., 1986); c) aumento de la peroxidación lipídica ; d) disminución de los depósitos de glutatión y de la actividad de los sistemas antioxidantes hepáticos, en mayor intensidad incluso si la malnutrición actúa sobre un hígado graso (Grattagliano et al., 2000); e) disminución de las concentraciones de selenio y zinc, ambos cofactores de la GPX, cuya actividad depende intensamente de las concentraciones de selenio: f) aumentando las concentraciones hepáticas de hierro, lo que se ha relacionado con la esteatosis hepática (Conde Martel et al., 1993), la malnutrición potencia la sobrecarga férrica hepática inducida por el etanol

(Conde Martel et al., 1992), lo que favorece la peroxidación lipídica y la fibrosis hepática (George et al., 1998). Además el hierro prepara a las células de Kupffer para la activación del factor nuclear Kappa y la expresión de genes proinflamatorios en la lesión hepática alcohólica (Tsukamoto et al., 1999).

## 1.6. ZINC.

Fueron Todd, Elvehjem y Hart, en 1934, trabajando sobre modelos experimentales los primeros en apuntar que el zinc era necesario para el crecimiento y bienestar de los animales. Ya en 1967 Prasad describió que la deficiencia nutricional de zinc en humanos se manifestaba con retraso de crecimiento grave e hipofunción sexual.

El zinc es imprescindible para el normal crecimiento y desarrollo de animales y plantas y en el hombre es el segundo oligoelemento en importancia tras el hierro. Es uno de oligoelementos esenciales, y como tal, uno de los miembros del principal grupo de micro-nutrientes que ha adquirido gran importancia en la nutrición y estado de salud en al hombre. Es muy ubicuo en el metabolismo subcelular y posee gran versatilidad. Actualmente se conoce que el zinc es componente esencial de numerosas proteínas y metaloenzimas (más de 150) y que su presencia es esencial para numerosos procesos de síntesis y degradación de proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos (DNA, RNA). Por ello el zinc está implicado en el mantenimiento de membranas celulares, en la protección frente a radicales libres, en el mantenimiento de la división, crecimiento y diferenciación celular, en el mantenimiento de la respuesta inmune y en general en el buen funcionamiento de muchos órganos, tejidos (epidérmico, SNC, esquelético, gastrointestinal) y sistemas como el inmune o el reproductivo.

Toda esta ubicuidad y versatilidad sugiere que la deficiencia de zinc puede producir un deterioro generalizado de la gran mayoría de las funciones metabólicas. La deficiencia de zinc se ha implicado en el retraso de crecimiento, lineal y de peso; en el aumento de incidencia de diarreas, neumonías y otras infecciones como la malaria; en el retraso en el desarrollo cerebral y aumento de la morbilidad en niños y, durante el embarazo con anomalías morfológicas y del desarrollo cerebral en el feto y alteraciones en el desarrollo neuropsicológico.

### 1.6.1. METABOLISMO DEL ZINC.

Los requerimientos diarios medios de zinc son de 1-2 mg/día, cantidad que puede variar según el estado de salud, la edad y el grado de actividad.

Solamente una pequeña porción del zinc ingerido es absorbido, aproximadamente un 5-10%. Esta absorción se lleva a cabo en las porciones más distales del intestino delgado y está regulada por la presencia de ligandos fijadores de metales, sugiriendo algunos autores que pudieran ser prostaglandinas o sustancias parecidas a las prostaglandinas (Song et al., 1978). La absorción de zinc puede verse influenciada por distintos factores y componentes de la dieta. Así valores elevados de fosfatos, el exceso de calcio en la dieta (Dursun et al., 1994), los fitatos (Adams et al., 2002) y las fibras reducen la absorción de zinc, mientras que ciertos aminoácidos (histidina y cisteína) y péptidos la aumentan (Lonnerdal, 2000). También un aumento del zinc en la dieta aumenta la excreción porcentual de este oligoelemento. Esto es debido a dos mecanismos: por un lado se satura el mecanismo absorbivo y por otro aumenta la secreción activa desde el intestino (King et al., 2000).

Se calcula que un cuerpo humano de 70 kg. contiene de 1.4 a 2.3 gramos de zinc. La concentración plasmática media de zinc es de 100 µg/ml y es similar en hombres y mujeres. El 90% del zinc corporal se encuentra en el músculo, hueso, pelo y piel, mientras que en la sangre circula menos del 1%. El zinc que circula en sangre va unido a eritrocitos (75-88%), a leucocitos (3%) y en plasma (12-22%) donde se encuentra fijado a proteínas de dos formas: débilmente a la albúmina y fuertemente a la transferrina. También se ha encontrado zinc fijado a la alfa-2-macroglobulina y a varios aminoácidos como histidina, glutamina, cistina y lisina.

La mayoría de los órganos humanos contienen entre 20-30 µg de zinc por gramo de tejido seco. El zinc está presente en concentraciones relativamente más altas en el hueso, la retina y la coroides, la próstata, el hígado, el músculo y la piel. En el hígado y en las células mamarias está presente en el núcleo, las mitocondrias y como sobrenadante, con mayor concentración a este nivel y en los microsomas. La leche humana contiene 3-4 mg/litro mientras que el calostro, 20 mg de zinc por litro.

El zinc se excreta principalmente por las heces. De esta forma el zinc fecal supone el no absorbido por la dieta y el eliminado por las secreciones pancreáticas, biliares y otras secreciones digestivas. La excreción urinaria de zinc es baja y se puede ver incrementada en circunstancias como diabetes, nefrosis, cirrosis hepática alcohólica, postoperatorio, quemaduras y fracturas de huesos largos. Dado que el zinc total urinario se correlaciona estrechamente con la excreción urinaria de nitrógeno algunos autores como Fell et al., en 1973 postularon que el zinc urinario podría resultar en un índice adicional del catabolismo proteico muscular. También el zinc es eliminado por el sudor, pudiendo llegar esta pérdida en ocasiones a ser considerable.

#### 1.6.2. ZINC METALOENZIMAS.

Como ya hemos comentado el zinc forma parte de gran cantidad de metaloenzimas. A continuación pasamos a comentar algunas de ellas por su particular importancia en tejidos humanos:

.-**La anhidrasa carbónica.** Enzima encargada de la rápida deshidratación del bicarbonato en el pulmón y de la hidratación del dióxido de carbono en otros tejidos. El ión zinc de esta enzima puede ser sustituido por gran variedad de iones metálicos, pero sólo su sustitución por cobalto mantiene su actividad catalítica con la misma intensidad.

.-**La alcohol deshidrogenasa.** Cataliza la oxidación del etanol, metanol y etilenglicol, vitamina A y ciertos esteroides, así como la reducción de aldehídos y cetonas. La extracción del zinc de esta enzima resulta en una pérdida de la actividad enzimática. Se ha evidenciado una estrecha relación entre la actividad de esta enzima y la concentración hepática de zinc (Higueret et al., 1989).

.-**Carboxipeptidasa.** Enzima proteolítica encargada de la hidrólisis del terminal carboxil de péptidos y proteínas. La extracción del zinc también provoca una inactivación, aunque éste puede sustituirse por otros metales.

.-**Fosfatasa alcalinas.** Bajo este término se agrupan un número importante de fosfomonoesterasas cuya actividad óptima se desarrolla a pH alcalino. Catalizan la

hidrólisis de gran variedad de ésteres de fosfato. Varios iones divalentes como Mn, Co, Cu y Ni pueden sustituir al zinc, pero sólo el Co la mantiene con una actividad significativa. Esta enzima es inhibida por agentes quelantes del zinc como EDTA o cisteína.

.-**Nucleótido polimerasas.** Se han identificado 3 de ellas como zinc-metaloenzimas: La DNA polimerasa, La RNA polimerasa dependiente de DNA y la DNA polimerasa dependiente de RNA (transcriptasa inversa). La síntesis de DNA se inhibe en presencia de EDTA y este efecto inhibitorio del EDTA pueda ser revertido por el zinc.

.-**Las superóxidodismutasas.** Grupo de enzimas fundamentales en la recogida de radicales libres de O<sub>2</sub>. La depleción de zinc puede disminuir la actividad de esta enzima con lo que podría acentuarse el daño inducido por los ROS.

.-**Las colagenasas.** Metaloenzimas dependientes del zinc, que intervienen en la degradación de la colágena, ven disminuida su actividad en situaciones de deficiencia de éste.

### 1.6.3. PROPIEDADES ANTIOXIDANTES DEL ZINC.

Las propiedades antioxidantes del zinc han sido claramente demostradas, y en su mayor parte son independientes de las derivadas de la actividad de sus metaloenzimas. El zinc no puede ser considerado un agente antioxidante como tal, ya que nunca se ha visto que interactúe directamente con radicales libres, sino que ejerce sus efectos de una forma indirecta, la función antioxidante del zinc es evidente tanto cuando es administrado crónicamente o se está en situación de deficiencia crónica, como cuando se está en situación de sobrecarga aguda (Powell, 2000).

La administración crónica de zinc induce la expresión de las metalotioneínas en hígado, riñón e intestino. Las metalotioneínas son proteínas de bajo peso molecular, ricas en cisteína, muy potentes como antioxidantes y cuyo mecanismo de acción no está aclarado por completo. Son las únicas proteínas que están implicadas en la distribución del zinc y se ha observado que en situaciones de stress oxidativo el zinc es liberado

desde las metalotioneínas (Jiang et al., 1998). Muchos estudios han demostrado que la sobreexpresión de estas proteínas inducida por el zinc aporta una protección efectiva frente a la hepatotoxicidad provocada por gran variedad de circunstancias como son: la exposición a la radiación, la toxicidad frente a ciertos fármacos como el paracetamol, sustancias anticancerígenas como la doxorrubicina o el alcohol (Harris, 1990). En este sentido un estudio llevado a cabo en ratones con concentraciones hepáticas disminuidas de metalotioneínas y controles, a los que se les administraba inicialmente etanol y posteriormente zinc, puso de manifiesto que el alcohol inducía cambios degenerativos morfológicos de mayor gravedad y mayor daño oxidativo (concentraciones hepáticas disminuidas de GPX y aumentadas de productos de la peroxidación lipídica) en los ratones con deficiencia de metalotioneínas y que el zinc amortiguaba de manera significativa estos efectos tóxicos del alcohol en ambos grupos (Zhou et al., 2002). Esto sugiere que el zinc posee un efecto protector frente al daño hepático inducido por el alcohol, independiente de las metalotioneínas, pero a su vez éstas requieren altas concentraciones hepáticas de zinc, lo que sugiere que la acción protectora es mediada por el zinc.

Por otro lado, la privación crónica de zinc hace al organismo más susceptible al daño mediado por el stress oxidativo. Estudios animales han mostrado un incremento en la producción de radicales libres o un incremento en el daño derivado de la exposición al stress oxidativo en situaciones de deficiencia de zinc.

También en aquellas circunstancias en las que se produce un incremento a corto plazo de las concentraciones de este metal, el zinc ha demostrado su capacidad antioxidante por medio de dos mecanismos: la estabilización de grupos sulfhidrilos proteicos, protegiéndolos de la oxidación, y mediante antagonismo de las propiedades catalíticas del hierro y el cobre en lo que respecta a sus capacidades para promover la formación de  $\text{OH}^-$  a partir de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y superóxido. Existe evidencia de peso de que la formación de  $\text{OH}^-$  puede iniciar un proceso lesivo. Numerosos estudios han demostrado que tanto el hierro como el cobre juegan un papel crítico en la iniciación y propagación de la peroxidación lipídica y en la oxidación de proteínas.

El papel del zinc como antioxidante se ha implicado también en la protección frente al cáncer de colon, sobre todo en alcohólicos (Lee et al., 2004). Igualmente ha

demostrado reducir los efectos deletéreos del alcohol sobre el feto, reduciendo las anomalías del desarrollo inducidas por éste (Carey et al., 2003).

#### 1.6.4. ZINC Y HUESO, MÚSCULO E HÍGADO.

El zinc, como ya comentamos, es un oligoelemento esencial para el crecimiento y desarrollo del organismo. Se requiere para la producción de gran variedad de enzimas involucradas en la síntesis proteica y en el metabolismo de los ácidos nucleicos. También se le ha implicado en funciones inmunes (Hershkovitz et al., 1999; Ninh et al., 1996; Kikafunda et al., 1998) y juega un importante papel en la transcripción genética (Hambidge, 2000). En este sentido existen varios factores de transcripción que contienen regiones denominadas “zinc-finger domains” que son importantes en la interacción proteínas-DNA o proteínas-RNA y que controlan la proliferación, diferenciación y muerte celular (Dreosti et al., 2001).

El zinc juega un papel fundamental en el metabolismo del tejido conectivo, actuando como cofactor de enzimas como las fosfatasas alcalinas (necesarias para la mineralización ósea), colagenasas (necesarias para el desarrollo de la estructura de colágena del hueso) y nucleótido polimerasas (necesarias para la síntesis de DNA y secundariamente la de proteínas).

El papel del zinc en la formación ósea está bien documentado en estudios animales (Yamaguchi et al., 1986a). La deficiencia de zinc produce retraso del crecimiento y disminución de la supervivencia (Norii et al., 2002). Es conocido que la deficiencia de zinc produce retraso en el desarrollo del hueso. Sin embargo, el papel exacto que juega el zinc en la formación ósea y calcificación no está aclarado totalmente. Estudios experimentales apuntan a que el zinc estimula la síntesis proteica y la formación ósea al incrementar la actividad de la fosfatasa alcalina y de otras enzimas claves en este proceso (Yamaguchi y Yamaguchi, 1986b). Esta inducción de la síntesis proteica se produce a nivel del proceso de traslación (Yamaguchi et al., 1989). Se ha observado, en situación de deficiencia de zinc, disminución en la actividad osteoblástica en huesos largos así como una defectuosa condrogénesis. Además estudios in vitro con osteoclastos de ratas han mostrado como el zinc es un inhibidor potente y selectivo de la

actividad osteoclástica disminuyendo la reabsorción ósea (Moonga et al., 1995), y de la formación de osteoclastos en etapas iniciales (Yamaguchi et al., 1996). El zinc reduce la síntesis de IL-6 en los osteoblastos (Hatakeyama et al., 2002) e incrementa las concentraciones plasmáticas de IGF-1 que si bien no parecen mejorar el crecimiento en niños en buen estado de desarrollo (Hershkovitz et al., 1999), se asocian a un aumento de la velocidad del crecimiento en niños malnutridos (Ninh et al., 1996).

En los últimos años se han llevado a cabo un gran número de ensayos experimentales y clínicos para valorar el efecto de dietas enriquecidas con zinc sobre el crecimiento en niños. Sin embargo los resultados son contradictorios. Se ha documentado un efecto positivo de los suplementos de zinc sobre el crecimiento en lactantes prematuros (Friel et al., 1985; Díaz Gómez et al., 2003), en grandes prematuros de muy bajo peso (Friel et al., 1993), en lactantes de Guatemala con baja talla (Rivera et al., 1998), en niños preescolares de bajo nivel socioeconómico en Chile (Ruz et al., 1997), en prepúberes (Perrone et al., 1999). Mientras tanto otros estudios en niños preescolares con bajo peso de Uganda (Kikafunda et al., 1998) o en malnutridos del África occidental (Muller et al., 2003), en niños normo-desarrollados en Israel (Hershkovitz et al., 1999) o en niñas en la peri-pubertad (Clark et al., 1999) no encuentran efecto sobre el crecimiento.

Se han documentado relación entre valores séricos de zinc bajos y excreciones urinarias altas de zinc en pacientes con osteoporosis (Herzberg et al., 1990) e igualmente en pacientes inmovilizados con osteopenia. También se ha observado que las concentraciones óseas de zinc se reducen intensamente si hay deficiente aporte de zinc.

Además la deficiencia de zinc se acompaña de hipogonadismo, lo cual causa también osteopenia. El hipogonadismo no sólo se produce por atrofia testicular sino también porque la deficiencia de zinc altera la secreción de gonadotrofinas. Se ha observado cómo los suplementos de zinc amplifican el efecto de los estrógenos sobre el hueso. Hay evidencia constatada de una pérdida de masa ósea y aumento de fracturas de stress en los atletas de élite; se cree que es debido al hipogonadismo provocado por carencia de zinc secundaria a grandes pérdidas de éste por el sudor, a dietas pobres en minerales y a estar sometidos a estrés continuado. En este sentido se ha descrito un

efecto beneficioso de los suplementos de zinc sobre la masa ósea vertebral y femoral en ratas durante un ejercicio extenuante (Seco et al., 1998).

Como comentábamos previamente el zinc es cofactor de múltiples enzimas, entre ellas las colagenasas. Su deficiencia conlleva una inhibición de la degradación de la colágena (Solis, 1988). Las concentraciones hepáticas bajas de zinc aumentan la actividad de la propil-4-hidroxilasa, favoreciéndose de esta manera el depósito hepático de colágena. Así en ratas cirróticas mediante inducción con CCl<sub>4</sub> se demuestra que los suplementos orales de zinc reducen el depósito de colágeno no sólo en el hígado sino también en la piel (Anttinen et al., 1984) e igualmente reduce la peroxidación lipídica y la actividad de la prolina-hidroxilasa (Camps et al., 1992). En ratas con deficiencia de zinc se describe un aumento de las concentraciones musculares, hepáticas y renales de malonildialdehído (Ozturk et al., 2003). En modelos alcohólicos, estudios animales también se ha observado que la administración de zinc revierte el incremento de la peroxidación lipídica y el aumento de la actividad de la SOD y la GPX inducidos por el alcohol (Pathak et al., 2002), así como, la inhibición de la síntesis de DNA igualmente inducida por el alcohol (Crilly et al., 2000). Por otro lado el zinc es capaz de disminuir el incremento de la permeabilidad intestinal producido por la ingesta de alcohol y de esta manera reducir la endotoxemia, mecanismo que ha sido propuesto como factor patogénico, entre otros, del daño hepático inducido por el alcohol (Lambert et al., 2003a). Otro mecanismo propuesto en la patogénesis de la lesión hepática inducida por el etanol es la apoptosis celular. El alcohol produce la activación de la caspasa-3, proteasa que es la principal responsable de la apoptosis hepática. Pues bien, también recientemente se ha descrito que el zinc provoca una supresión de la caspasa-3 (Lambert et al., 2003b) inhibiendo la apoptosis hepática (Liu, 2004).

Se dispone de escasa información acerca del papel del zinc sobre el músculo. El zinc, tanto por sus propiedades antioxidantes como por ser cofactor de las DNA y RNA polimerasas involucradas en la síntesis proteica, teóricamente debería ejercer un efecto protector sobre la atrofia muscular mediada por el alcohol. La deficiencia de zinc en pacientes cirróticos se asocia a la aparición de calambres musculares, los cuales mejoran tras la administración de zinc (Kugelmas, 2000). Por otro lado se sabe que el alcohol disminuye las concentraciones tisulares de zinc en hueso (Brzoska et al., 2002), pulmón, hígado, bazo, corazón, riñón y músculo (Florianczyk, 2000), y esta disminución del

contenido muscular de zinc se ha relacionado con los cambios histoquímicos y morfológicos observados en la miopatía alcohólica, como la atrofia de las fibras musculares tipo II así como la reducción en la proporción de las fibras tipo IIb (González Reimers et al., 1993). Otros estudios más recientes, sin embargo, no han encontrado beneficio del tratamiento con zinc sobre la atrofia muscular aunque sí sobre la fibrosis muscular en modelos experimentales sobre la miopatía relacionada con la cirrosis no alcohólica y la malnutrición (López Lirola et al., 2003).

## **2. OBJETIVOS.**

Por todo lo expuesto previamente en la introducción hemos planteado la realización de este trabajo a fin de conseguir los siguientes objetivos:

1.- Analizar los efectos combinados y relativos del alcohol y la malnutrición sobre el músculo, hueso e hígado, analizando al mismo tiempo el posible efecto protector del tratamiento con zinc sobre la miopatía, osteopatía y hepatopatía alcohólica.

2.- Determinar el papel combinado y relativo de la malnutrición proteica, etanol y eventualmente el efecto protector del zinc sobre la peroxidación lipídica y la actividad antioxidante hepática y muscular. Como paso previo nos planteamos analizar la relación existente entre peroxidación lipídica y actividad enzimática antioxidante (GPX y SOD) y lesión histológica hepática, ósea y muscular.

3.- Determinar si existe o no relación entre la afectación muscular y hepática y la afectación ósea en el modelo experimental referido.

### **3. MATERIAL Y MÉTODO.**

### 3.1. POBLACIÓN A ESTUDIO.

#### 3.1.1. ANIMALES Y ALIMENTACIÓN.

Se incluyeron 79 ratas macho de la raza Sprague-Dawley cuyo peso medio fue de 297.7 g., no presentando diferencias significativas entre grupos (Tabla 1).

Los animales fueron distribuidos en jaulas de metacrilato tipo 500 de macrolón apilables con rejas de acero inoxidable, usando como base viruta de madera tratada a tal fin. Fueron expuestas a ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad a temperatura ambiente constante de  $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ .

Previo a la inclusión en el estudio los animales fueron alimentadas con pienso estándar y agua a demanda hasta alcanzar un peso aproximado de 300 g., momento en el que fueron incluidas y distribuidas al azar en los distintos grupos de estudio. Desde entonces fueron alimentadas exclusivamente con dieta líquida, según el modelo de Lieber deCarli, suministrada por Dyets Inc. (25208 Easton Avenue, Bethlehem, Pennsylvania 18087).

Se establecieron 8 grupos de aproximadamente 10 ratas cada uno y un noveno ad libitum de 5 ejemplares que fueron alimentados durante 30 días previo al sacrificio.

- Grupo 1.**- control (18% de proteínas) (CTRL).
- Grupo 2.**- control, suplementada con sulfato de Zn (CTRL.+ZN).
- Grupo 3.**- hipoproteico (2% de proteínas) (HIPO).
- Grupo 4.**- hipoproteico, suplementada con sulfato de Zn (HIPO+ZN).
- Grupo 5.**- alcohólico (36%) (OH).
- Grupo 6.**- alcohólico, suplementada con sulfato de Zn (OH+ZN).
- Grupo 7.**- alcohólico-hipoproteico (OHHIPO).
- Grupo 8.**- alcohólico-hipoproteico, suplementada con sulfato de Zn (OHHIPO+ZN).
- Grupo 9.**- ad libitum.

La dieta se adquirió en forma de polvo hidrosoluble, al igual que los oligoelementos y las vitaminas, que venían envasados de forma independiente para garantizar su estabilidad, y fueron conservados a temperatura de 4°C. Para su preparación se disolvieron dichos elementos en agua Milli-Q a lo que se añadió adicionalmente alcohol etílico al 95%, en cantidad de 5 g/dl lo que suponía un 36% de la energía total suministrada por la dieta (Lieber y De Carli, 1989), y Zn en aquellos grupos que lo precisasen. Cada semana se preparaba una nueva dieta y se conservaba en nevera a 4°C.

La dieta era administrada, mediante biberones, cada 48 horas (tabla 2). Para proporcionar una ingesta calórica similar en los distintos grupos se procedió a aportar la cantidad consumida por el grupo que menos ingería (alcohólico-hipoproteico) al resto de los animales, repitiéndose el proceso cada 36-48 horas hasta el final del experimento (pair feeding).

**Tabla 1. Peso medio por grupos.**

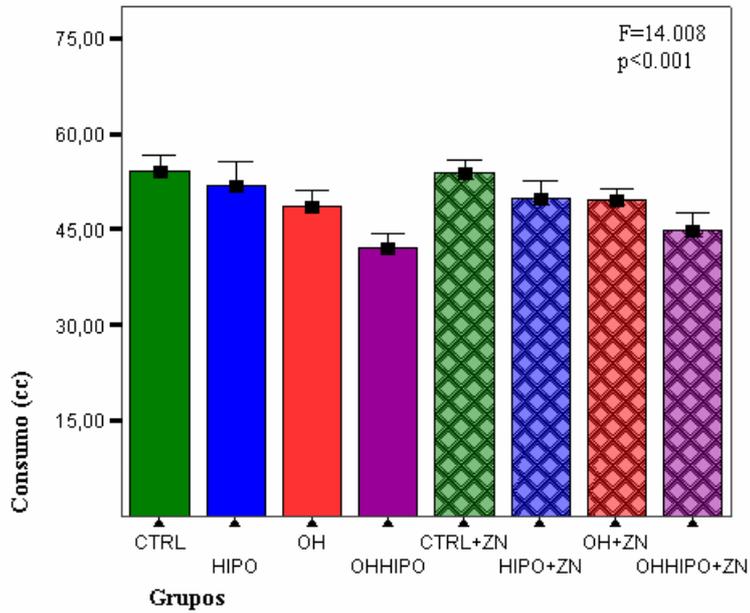
GRUPOS		PESO INICIAL (g)	NÚMERO EJEMPLARES
CTRL	Media	298.60	10
	Desv tip	10.06	
HIPO	Media	302.80	10
	Desv tip	13.43	
OH	Media	297.66	6
	Desv tip	3.88	
OHHIPO	Media	298.00	9
	Desv tip	5.21	
CTRL.+ZN	Media	294.00	10
	Desv tip	11.77	
HIPO+ZN	Media	296.40	10
	Desv tip	14.10	
OH+ZN	Media	296.20	10
	Desv tip	4.36	
OHHIPO+ZN	Media	298.44	9
	Desv tip	4.33	
F P		0.700	
		0.672	
AD LIBITUM	T	-0.806	5
	P	0.435	

Sin embargo, hubo diferencias en el consumo total de nuestros animales ( $F=14.008$ ,  $p<0.001$ ) (Fig.4). Las ratas alcohólicas hipoproteicas fueron las que menos consumieron. Tanto el alcohol ( $F=49.898$ ,  $p<0.001$ ) como la malnutrición ( $F=24.878$ ,  $p<0.001$ ) ejercieron un efecto independiente sobre la cantidad de alimento consumida por nuestros animales.

Los animales se manipularon siguiendo las normas del Comité de Cuidados para Animales de Experimentación de La Universidad de La Laguna.

**Tabla 2. Media de consumo diario de dieta por grupos.**

GRUPOS		CONSUMO DIARIO (CC)
CTRL	Media	54.09
	Desv. Tip.	3.53
HIPO	Media	51.94
	Desv. Tip	5.22
OH	Media	48.68
	Desv. Tip	2.22
OHHIPO	Media	42.15
	Desv. Tip	3.23
CTRL.+ZN	Media	53.86
	Desv. Tip	2.96
HIPO+ZN	Media	49.85
	Desv. Tip	3.94
OH+ZN	Media	49.59
	Desv. Tip	2.61
OHHIPO+ZN	Media	44.71
	Desv. Tip	3.67
AD LIBITUM	Media	83.99
	Desv. Tip	1.47
F		9.79
p		0.008
Diferencias ad libitum y control	T	-23.24
	p	<0.001

**Figura 4. Consumo diario por grupos.**

A continuación pasamos a reseñar la composición de las dietas (tabla 3) y la cantidad de hidratos de carbono, proteínas, grasas, vitaminas, oligoelementos (tabla 4), así como las características nutricionales de cada grupo de estudio (tabla 5).

**Tabla 3. Composición de la dieta líquida Lieber de Carli (Dyets Inc.).**

COMPONENTES DE LA DIETA (G/L/1000 CAL)	CONTROL	HIPOPROTEICA
Caseína	41.4	4.6
L-cisteína	0.5	0.06
DL- metionina	0.3	0.03
Aceite de maíz	8.5	8.5
Aceite de oliva	28.4	28.4
Aceite de alazo	2.7	2.7
Dextrina de maltosa	25.6	64.8
Fibra (celulosa)	10	10
Minerales	8.75	8.75
Bitrato de colina	0.53	0.53

**Tabla 4. Composición en minerales oligoelementos y vitaminas (Dyets Inc.).**

MINERALES Y OLIGOELEMENTOS (mg/1000 cal)	VITAMINAS (mg/1000 cal.)
Calcio ....1300	Tiamina ....1.5
Sodio ....255	Riboflavina ....1.5
Magnesio ....125	Piridoxina ....1.75
Hierro ....8.8	Ácido nicotínico ....7.5
Cobre ....1.5	Pantetonato cálcico ....4
Yodo ....0.05	Vitamina A(UI) ....6000
Cloruro ....390	Vitamina D ....400
Fluoruro ....0.25	Vitamina B12(mcg) ....25
Fósforo ....1000	Biotina ....0.05
Potasio ....900	Paba ....12.5
Manganeso ....13.5	Ácido fólico ....0.5
Zinc ....7.5	Inositol ....25
Selenio ....0.025	Colina ....250
Cromo ....0.5	Vitamina K(mcg) ....125
Sulfato ....250	Vitamina E ....30

**Tabla 5. Características nutricionales de la dieta de los grupos de estudio.**

GRUPOS DE ESTUDIO	PROTEINAS (%)	LÍPIDOS (%)	HIDRATOS DE CARBONO (%)	ZINC (mg/l)	OH 36%
CONTROL (CTRL.)	18	35	47	0	NO
HIPOPROTEÍCA (HIPO)	2	35	63	0	NO
ALCOHÓLICA (OH)	18	35	47	0	SI
ALCOHÓLICA –HIPOPROTEÍCA (OH-HP)	2	35	63	0	SI
CTRL.+ZN	18	35	47	227	NO
HIPO+ZN	2	35	63	227	NO
OH+ZN	18	35	47	227	SI
OH-HP +ZN	2	35	63	227	SI
AD LIBITUM	18	35	47	0	NO

### 3.1.2.SACRIFICIO Y RECOGIDA DE MUESTRAS.

Las ratas fueron sacrificadas tras 30 días de fase experimental, mediante inyección intraperitoneal de dosis letales de ketamina (5 ml).

Durante las 24-48 horas previas al sacrificio los animales fueron emplazados en jaulas metabólicas lo que permitió obtener la orina y las heces excretadas durante ese periodo para posterior análisis.

Tras el sacrificio se tomaron las siguientes muestras:

1.- **Músculo:** se extrajo el músculo gastrocnemio derecho que fue introducido en nitrógeno líquido de manera inmediata y posteriormente conservado en congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su corte, tinción y análisis histomorfométrico. Los cortes realizados, empleando un criostato a  $-40^{\circ}\text{C}$ , fueron de 8 micras. Se tomaron muestras de el gastrocnemio izquierdo que se mantuvieron a  $-80^{\circ}\text{C}$  en tubos de Ependorff para la realización de determinaciones enzimáticas. Por último se extrajeron muestras de musculatura paravertebral que se conservó en formol al 10% y en nevera a  $4^{\circ}\text{C}$  para cuantificación de oligoelementos.

2.-**Hígado:** se tomó muestra de parénquima hepático que se dividió en tres partes distintas. La primera se conservó en congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$  distribuida en tubos de Ependorff para análisis enzimático. La segunda porción se conservó en formol al 10 % a  $4^{\circ}\text{C}$  y posteriormente se incluyo en parafina, obteniéndose cortes seriados de 5 micras de grosor para tinción y análisis histomorfométrico posterior. La última pieza se conservó también en formol al 10% y en nevera para cuantificación de oligoelementos.

3.-**Hueso:** se extrajeron la primera y segunda vértebras lumbares y se conservaron en alcohol al 70% y a  $4^{\circ}\text{C}$  para posterior inclusión en metil-metacrilato, corte posterior con microtomo de 7 micras y tinción ulterior para estudio histomorfométrico. También se procedió a la extracción de la tibia derecha y conservación a  $4^{\circ}\text{C}$  en formol al 10 % para posterior cuantificación de oligoelementos.

4.-**Sangre:** se obtuvo muestra de sangre por punción intracardiaca que posteriormente se centrifugó y conservó en congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$  para determinación de parámetros bioquímicos y hormonales.

## 3.2. ESTUDIO DEL MÚSCULO.

### 3.2.1. ESTUDIO HISTOLÓGICO.

Las muestras congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  fueron teñidas a fin de poder determinar las áreas de los distintos tipos de fibras musculares: tipo I (lenta oxidativa), tipo II A (rápida oxidativa y glicolítica) y tipo II B (glicolítica rápida), para lo cual se realizó una tinción de ATP-asa miofibrilar a pH 4,45 que permitió clasificarlas según su sensibilidad ácido-base. Posteriormente se procedió a su medición usando un analizador de imágenes VIDS II. Se tomó una media de 20 fibras musculares de cada tipo por animal, teniendo en cuenta previamente que tuvieran un factor forma (esfericidad) mayor o igual a 0.9. Fueron medidas usando un aumento 20x.

A continuación se detallan los procesos de tinción.

#### 3.2.1.1. ATP-ASA MIOFIBRILAR.

##### A) Preincubación:

Tampón acetato-acético:

-Solución A: 1.64 g. de acetato sódico en 100 ml. de agua destilada.

-Solución B: 1.2 ml. De ácido acético en 100 ml. de agua destilada.

-Para preparar una solución a pH 4.45 se mezclaron 9 ml. de solución A con 17 ml de solución B.

##### B) Incubación:

-Medio: 30 mg de ATP + 20 cc de solución Tris -Buffer a pH 9.4-9.6.

-Solución Tris-Buffer (TRIS\_CIH BUFFER 0.1 M con  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  0.018 M):

-TRIS .....1.21 g.

- $\text{Cl}_2\text{Ca}$  (2  $\text{H}_2\text{O}$ ) .....0.26 g.

-Agua destilada .....100 ml.

-Añadir ácido clorhídrico para ajustar a pH 9.4-9.6

C) Cloruro de calcio al 1%:

- Cloruro de calcio dihidrato .....1.324 g.
- Agua destilada .....100 cc.

D) Nitrato de cobalto al 2%:

- (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>+6 H<sub>2</sub>O .....3.18 g.
- Agua destilada .....100 ml.

Técnica:

- Preincubar las muestras en tampón acetato-acético a pH 4.45-4.3 durante 20 a 25 minutos a temperatura ambiente.
- Incubar a 37°C y durante una hora en el medio ATP/Tris-Buffer.
- Pasar por solución de cloruro cálcico al 1 % durante 3-5 minutos.
- Pasar por solución de nitrato de cobalto al 2% a temperatura ambiente de 1 a 3 minutos.
- Lavar con agua destilada.
- Pasar por sulfuro de amonio durante 10 a 20 sg.
- Lavar en agua destilada.

### 3.2.2.DETERMINACIONES ENZIMÁTICAS.

Se realizó determinación de los productos de la peroxidación lipídica (malonilaldehído + 4-hidroxiálquenos (MLD)) y de la actividad de la glutatiónperoxidasa (GPX) y superoxidodismutasa (SOD) de la siguiente manera.

Las muestras congeladas a tal fin se lavaron con solución de cloruro sódico (0.9%) y heparina y/o EDTA, se secaron con papel absorbente y se pesaron para determinar la actividad de:

.- **Malonilaldehído + 4-hidroxiálquenos (MLD)** con el kit de Calbiochem® (San Diego, California, USA) con una absorbancia a una longitud de onda de 586nm en el espectrofotómetro ultravioleta.

.-**Superoxidodismutasa Cu/Zn (SOD)** con el kit de Calbiochem® (San Diego, California, USA), en el que se usa la autooxidación alcalina del 5,6,6,11 tetrahidro, 3,9,19 trihidroxibenzofluoreno, cuyo proceso se acelera por la SOD, con lo que se obtiene un cromóforo con absorbancia máxima a una longitud de onda de 525nm.

.-**Glutationperoxidasa (GPX)** con el Kit de Calbiochem® (San Diego, California, USA) se midió de forma indirecta usando la oxidación de NADPH a NADP con una absorbancia a una longitud de onda de 340 nm.

### 3.2.3.DETERMINACIÓN DE OLIGOELEMENTOS.

Se estudió el contenido de los siguientes oligoelementos: zinc, cobre, selenio, manganeso e hierro.

Las muestras de músculo se sometieron tras su conservación en formol al siguiente proceso:

- .-Pesado de la muestra.
- .-Desecación en estufa a 100°C durante 7 días.
- .-Pesado de la muestra seca.
- .-En vaso de precipitado adición 10 ml de ácido nítrico al 65% y calentamiento en placa hasta evaporación casi total.
- .-Adición de 5 ml de agua oxigenada al 10% y calentamiento hasta casi sequedad.
- .-Enrasar en matraz aforado hasta 10 ml con agua ultrapura (sistema de deionización Milli-Q OM-140).
- .-Conservación de las muestras a 4°C hasta análisis ulterior.

La medición de los oligoelementos se realizó mediante espectrofotometría de absorción atómica con un espectrofotómetro marca Varian modelo Spectra AA (Victoria, Australia). Los límites de detección en esta técnica para los oligoelementos estudiados fueron los siguientes:

Zinc.....0.009 mg/kg.  
Cobre.....0.026 mg/kg.  
Selenio.....0.0003 mg/kg.  
Manganeso.....0.021 mg/kg.  
Hierro.....0.039 mg/kg.

### 3.3. ESTUDIO DEL HUESO.

#### 3.3.1. ANÁLISIS HISTOLÓGICO.

Las muestras de tejido óseo vertebral destinado a tal fin se incluyeron en metilmetacrilato para posteriormente teñirse con tricrómico (Fig.5).

##### 3.3.1.1. INCLUSIÓN EN METIL-METACRILATO.

##### Mezcla de metil- metacrilato.

- .-100 ml de M-metacrilato (monómero estabilizado con hidroquinona).
- .-20 ml de nonifenol poliglicol-eter acetato.
- .-2 ml dibutil-ftalato.
- .-5g. de peróxido de benzoilo.

El catalizador (peróxido de benzoilo) se adiciona de inmediato. Una vez preparada la mezcla se guarda en frasco cerrado a 4°. Antes de abrir la botella esperar a que se atempere.

##### Técnica.

.-Antes de incluir la muestra, deshidratarla completamente. De etanol 70° se pasaban a etanol 96° durante un día y después a etanol absoluto durante tres días, cambiándoselo cada día.

.-Colocar la muestra en la mezcla de metil-metacrilato a 4°C durante 48 horas para infiltrar bien la muestra. Usar recipiente de vidrio.

.-Pasadas las 48 horas cambiar la mezcla por otra nueva mezcla de metilmetacrilato y colocarla en estufa a 32°C esperando a que el metilmetacrilato endurezca, esto suele durar entre tres y cuatro días aproximadamente.

.-Romper, posteriormente los recipientes de vidrio y obtener el bloque de metilmetacrilato.

.-Se cortan las muestras en el Polycut con un grosos de 7 micras y se colocan en portas.

3.3.1.2. TINCIÓN DE TRICRÓMICO.

- .-Hidratar la muestra con agua destilada.
- .-Teñir en hematoxilina férrica durante 5 minutos.
- .-Lavar con agua corriente durante 10 minutos.
- .-Ponceau de Xilidina durante 45 minutos.
- .-Lavado rápido en ácido acético y posteriormente en agua destilada.
- .-Diferenciar en ácido Fosfotungstico-Orange G durante 10 minutos.
- .-Lavado rápido en ácido acético al 1%.
- .-Lavado rápido en agua destilada .
- .-Verde luz al 2% durante 15 minutos.
- .-lavado rápido en ácido acético al 1% y posteriormente lavar con agua destilada.
- .-Deshidratar la muestra y montar.

3.3.1.3. TINCIÓN DE HEMATOXILINA FÉRRICA DE WEIGERT.

a) Soluciones de Stock:

.-Solución I:

- Hematoxilina cristalizada.....1g.
- Etanol 95%.....100ml.

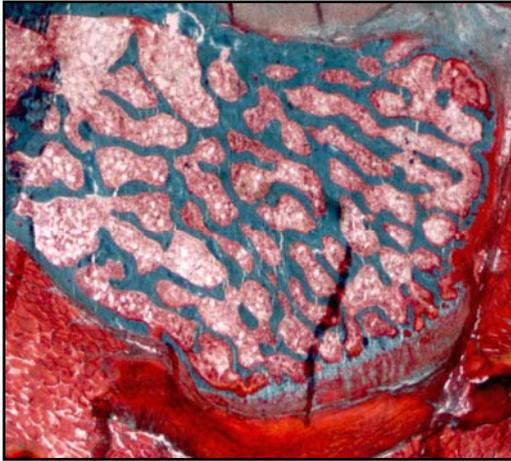
.-Solución II:

- Cloruro férrico anhidro.....1.5g.
- 6 moléculas de agua.....2.48g.
- Agua destilada.....100ml.

b) Solución de trabajo:

- Mezclar a partes iguales las soluciones I y II. La solución se torna de color negro-azulado que rápidamente vira a pardo-negruzco.
- Preparar en fresco y añadir 1 ml de ácido clorhídrico concentrado.

**Figura 5. Corte histológico de tejido óseo.**



### 3.3.2.DETERMINACION DE OLIGOELEMENTOS.

Las muestras de tejido óseo (tibias) conservadas a tal fin fueron sometidas al mismo procesamiento y técnicas de medida que las muestras de músculo.

Se determinó el zinc óseo, conservándose los mismos límites de detección detallados en el apartado anterior del músculo (pg. 92).

### 3.4. ESTUDIO DEL HÍGADO.

#### 3.4.1. ANÁLISIS HISTOLÓGICO.

Con el tejido hepático que se incluyó en parafina se realizaron cortes seriados de 5 micras con un microtomo Reichert-jung 1130 Biocut y se hicieron las distintas tinciones.

En las muestras teñidas con hematoxilina-eosina y el tricrómico de Masson se cuantificó lo siguiente:

.-La proporción de fibrosis hepática en el analizador de imágenes VIDS-II a un aumento de 40x (área de fibrosis x100/área total).

.-La cantidad de grasa, midiendo el área de las gotas de grasa x 100/área total.

Las tinciones llevadas a tal fin se detallan a continuación

##### 3.4.1.1. TINCIÓN DE HEMATOXILINA-EOSINA.

###### A.1) Hematoxilina de Harris

Solución A:

Hematoxilina en polvo.....5 g.

Alcohol absoluto.....50 ml.

Solución B:

Alumbre potásico cristalizado.....100 g.

Agua destilada.....800ml.

Veinticuatro horas después de haber preparado las soluciones se añadieron 2.5 g. de óxido de mercurio rojo. La mezcla se mantuvo en ebullición durante 20 minutos e inmediatamente después se introdujo en un matraz aforado que se sumergió en agua fría.

###### A.2) Eosina.

Eosina.....2 g.

Agua destilada.....160 ml.

Alcohol al 95%.....640 ml.

Ácido acético.....10 gotas.

Técnica.

- Desparafinar mediante dos pases en xilol durante 10 minutos.
- Hidratar mediante tres pases en alcohol absoluto de 96° y 90° durante cinco minutos.
- Lavar con agua durante dos minutos.
- Teñir con hematoxilina de Harris durante tres minutos.
- Lavar con agua durante cinco minutos.
- Teñir con eosina durante tres minutos.
- Sin lavar realizar pases rápidos por alcohol a 90°, 96° y absoluto.
- Aclarar con carboxilol.
- Hacer dos pases por xilol.
- realizar el montaje en un kit.

3.4.1.2.TRICRÓMICO DE MASSON.

A)Solución de Bowin. (preparada a 60°C):

Ácido pícrico saturado en solución acuosa.....	750 ml.
Formol al 37%.....	250 ml.
Ácido acético glacial.....	50 ml.

B)Solución de hematoxilina de Weigert:

Solución A:

Cristales de hematoxilina.....	1 g.
Alcohol de 95°.....	100 ml.

Solución B:

Cloruro férrico al 29%.....	4 ml.
Agua destilada.....	95 ml.
Ácido clorhídrico concentrado.....	1 ml.

Mezclar la solución A y la B a partes iguales para obtener la solución de trabajo.

C)Fucsina ácida de Biebrich:

Biebrich Scarlet acuosa al 1%.....	90 ml.
Ácido fucsínico acuoso al 1%.....	10 ml.

Ácido acético glacial .....1 ml.

D) Solución de ácido fosfomolibdico- ácido fosfotungstico:

Ácido fosfomolibdico .....5 g.

Ácido fosfotungstico .....5 g.

Agua destilada.....200 ml.

E) Solución de azul de anilina:

Azul de anilina .....2.5 g.

Ácido acético glacial .....2 ml.

Agua destilada .....100 ml.

F) Solución de ácido acético glacial:

Ácido acético glacial .....1 ml.

Agua destilada .....100 ml.

**Técnica:**

- Se desparafina con dos pases de xilol de 10 minutos cada uno.
- Se hidrata con pases sucesivos de 5 minutos cada uno con alcohol de 90 °, alcohol de 96 ° y alcohol absoluto.
- Se lava con agua durante 2 minutos.
- Se incluye en solución Bowin a temperatura ambiente.
- Se aclara con agua destilada hasta que desaparezca el color amarillo.
- Se tiñe con hematoxilina de Weigert durante 10 minutos.
- Se aclara con agua destilada.
- Se pasa por Fucsina ácida de Biebrich durante dos minutos.
- Se pasa por Ácido fosfomolibdico y fosfotungstico durante 12 min.
- Se tiñe con anilina durante 5 min. y se lava con agua destilada.
- Se pasa por ácido acético glacial.
- Se hidrata en pases sucesivos por alcohol de 90°, 96° y absoluto.
- Se aclara en carboxilol.
- Se añade xilol en dos pases y se monta en un kit.

#### 3.4.2.DETERMINACIONES ENZIMÁTICAS.

Se realizó determinación de la actividad de la glutathionperoxidasa (GPX) y superoxidodismutasa (SOD) y de los productos de la peroxidación lipídica (Malonilaldehído + 4-hidroxi-alquenos (MLD)) de la misma forma y siguiendo el mismo procedimiento detallado en la sección del músculo (pg. 91).

#### 3.4.3.DETERMINACIÓN DE OLIGOELEMENTOS.

Se determinaron los siguientes oligoelementos hepáticos: hierro, zinc, cobre, selenio y manganeso.

Las muestras de tejido hepático conservadas a tal fin fueron sometidas al mismo procesamiento y técnicas de medida que las muestras de músculo, conservando los mismos límites de detección detallados en el apartado anterior (pg. 92).

### 3.5. DETERMINACIONES SEROLÓGICAS.

Las determinaciones serológicas llevadas a cabo en los distintos grupos de estudio fueron:

.-**Albúmina** mediante la técnica colorimétrica con kit de Roche® que muestra sensibilidad analítica de 0,2 g/dl.

.-**Creatinfosfoquinasa (CPK)** mediante la técnica colorimétrica enzimática, (Roche®), con sensibilidad de 2 U/L.

.-**Lactato deshidrogenasa (LDH)** mediante la técnica colorimétrica enzimática, (Roche®), con sensibilidad de 6 U/L.

.-**Calcio** por fotometría con test colorimétrico con determinación del punto final usando el kit de Roche Diagnostics® con una sensibilidad de 0,2 mg/dl.

.-**Magnesio** por fotometría con test-color con método de punto final usando el kit de Roche Diagnostics® con una sensibilidad de 0,03 mmol/dl.

.-**Fósforo** por fotometría con método de punto final con muestra en blanco mediante el kit de Roche Diagnostics® con una sensibilidad de 0,3 mg/dl.

.-**Creatinina** mediante test color enzimático por fotometría utilizando el kit de Roche Diagnostics® con una sensibilidad de 0,03 mg/dl.

.-**Fosfatasa alcalina** por test color según método estandarizado y fotometría con el kit de Roche Diagnostics® con una sensibilidad de 0,67 U/L.

.-**IGF-1 o somatomedina C** por radioinmunoensayo (RIA) con el kit de Nichols Institute Diagnostics® (San Juan Capistrano California) que tiene una sensibilidad calculada de 0,06 ng/ml.

.-**Osteocalcina** por análisis inmunométrico, quimioluminiscente usando el kit para el analizador IMMULITE de Diagnostic Products Corporation® (Los Angeles, California), con sensibilidad de 0,1 ng/ml.

.-**Testosterona libre** por Ria mediante kit de Diagnostic Products Corporation® (Los Angeles, California) con sensibilidad de 0,15 pg/ml.

.-**Corticosterona** por RIA usando el kit InmucheM de Diagnostic Product Corporation ® (Los Angeles, California).

.-**PTH** por ensayo secuencial inmunométrico quimioluminiscente en fase sólida con el kit IMMULITE2000 PTH intacta de Diagnóstico Product Corporation® (Los Angeles, California) con sensibilidad de 3,0 pg/ml.

.-**1,25 dihidroxivitamina D** por radioinmunoensayo.

### **3.6. DETERMINACIONES EN ORINA.**

Las determinaciones en orina de calcio fósforo, creatinina y magnesio se realizaron con los mismos test, las mismas técnicas e idénticos kit que las realizadas en sangre, sólo variaron los límites de detección inferiores (sensibilidades) para el fósforo (5,0 mg/dl) y la creatinina (0,3 mg/dl).

.-Se determinó también la hidroxiprolina en orina por cromatografía líquida de alta resolución

.- El zinc en orina se determinó tras procesamiento de la muestra según los pasos comentados en el apartado de músculo omitiendo la desecación.

### **3.7. DETERMINACIONES EN HECES.**

Sólo se determinó el zinc según lo ya comentado previamente.

### **3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Utilizamos un test de análisis de la varianza para valorar las diferencias entre los grupos experimentales. Si las diferencias tenían significación estadística se realizaba un análisis post hoc (Test de Student-Newman-Keuls) para determinar los grupos de estudio entre los que se establecían las diferencias.

Para valorar el peso específico del efecto del alcohol, la malnutrición y el tratamiento con zinc sobre las diversas variables objeto de nuestro estudio y además valorar las interacciones de estas tres variables entre sí, se hizo un análisis de varianza de dos vías.

Para determinar la relación entre las variables objeto de estudio se realizó un análisis de correlación simple ( $r$  de Pearson).

Comparamos todas las variables analizadas en nuestro estudio entre el grupo control y el grupo alimentado ad libitum, para ello se hizo uso de el test de la  $t$  de Student para variables independientes.

## **4. RESULTADOS.**

## 4.1. MÚSCULO.

### 4.1.1. HISTOMORFOMETRÍA.

#### 4.1.1.1. ÁREA DE LOS DISTINTOS TIPOS DE FIBRAS MUSCULARES.

La media de las áreas de las distintas fibras musculares quedan reflejadas en la siguiente tabla (tabla 6).

**Tabla 6. Área media de los diferentes tipos de fibras musculares por grupos.**

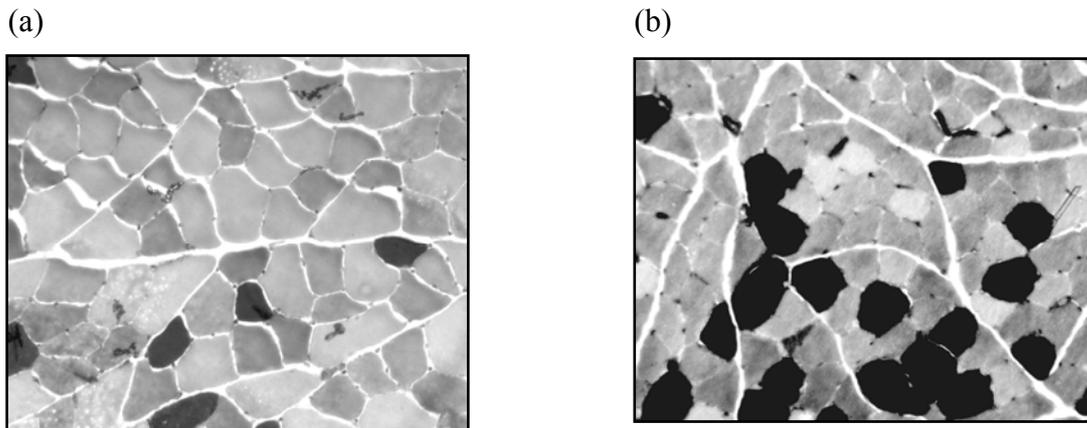
GRUPOS		ÁREA FIBRAS TIPO I ( $\mu^2$ )	ÁREA FIBRAS TIPO IIA ( $\mu^2$ )	ÁREA FIBRAS TIPO IIB ( $\mu^2$ )
CTRL	Media	1868.595	1876.310	1569.187
	Desv tip	207.247	313.558	418.723
HIPO	Media	1668.813	1382.218	1555.396
	Desv tip	185.933	424.333	535.696
OH	Media	1773.096	1895.971	1526.276
	Desv tip	427.817	481.471	121.331
OHHIPO	Media	1616.613	1549.793	1130.645
	Desv tip	342.747	372.318	321.662
CTRL.+ZN	Media	1901.495	1644.424	1723.276
	Desv tip	327.410	303.758	322.986
HIPO+ZN	Media	1494.430	1336.143	1439.875
	Desv tip	210.376	203.511	267.565
OH+ZN	Media	1798.422	2092.988	1586.150
	Desv tip	340.467	542.823	394.957
OHHIPO+ZN	Media	1734.305	1483.207	1309.115
	Desv tip	334.012	239.950	185.964
TOTAL	Media	1741.729	1649.063	1491.843
	Desv tip	314.915	416.067	370.259
F		1.411	3.98	2.263
p		0.221	<0.001	0.045
Diferencias ad libitum y control	T	-2.776	1.115	-1.928
	p	0.020	0.291	0.083

Se observaron diferencias significativas entre grupos en las áreas de las fibras tipo II A ( $F=3.98$ ,  $p=0.001$ ) y las áreas de las fibras tipo II B ( $F=2.263$ ,  $p=0.045$ ), no observándose diferencia con significación estadística en las áreas de las fibras tipo I entre grupos ( $F=1.411$ ,  $p=0.221$ ) (Fig. 6).

#### 4.1.1.2. ÁREA DE LAS FIBRAS MUSCULARES TIPO I.

Tras análisis por correlación de Pearson se observó relación directa con el peso final ( $r=0.328$ ,  $p<0.01$ ), el área de las fibras II B ( $r=0.466$ ,  $p<0.01$ ) y los niveles de albúmina ( $r=0.320$ ,  $p<0.05$ ).

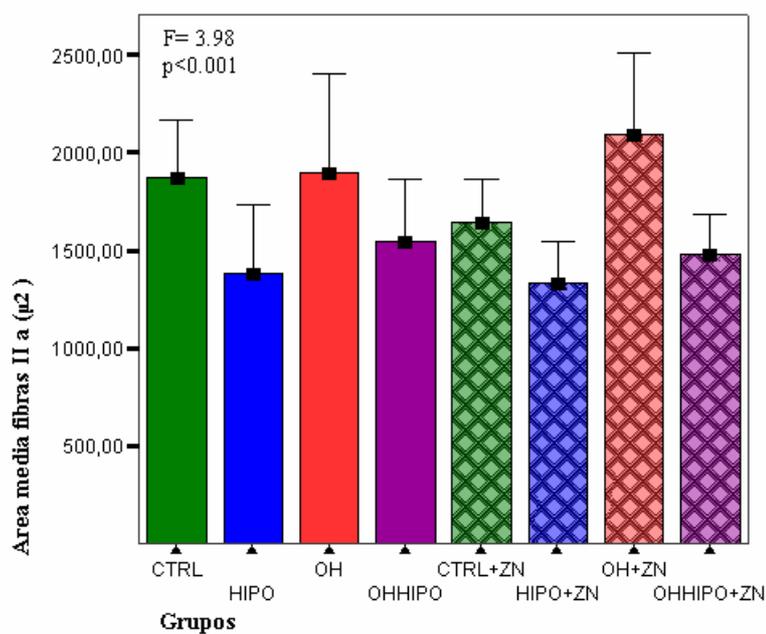
**Figura 6. Cortes histológicos teñidos con ATPasa-miofibrilar correspondientes a músculo del grupo control (a) y alcohol-hipoproteico (b).**



#### 4.1.1.3. ÁREA DE LAS FIBRAS MUSCULARES TIPO II A.

Las áreas de las fibras tipo II A fueron más bajas en las ratas malnutridas, alcohólicas o no, e independientemente del zinc, diferenciándose de manera significativa sólo de las ratas alcohólicas con suplementos de zinc en el análisis *post hoc* (Fig. 7).

**Figura 7. Área media de las fibras musculares tipo II A.**

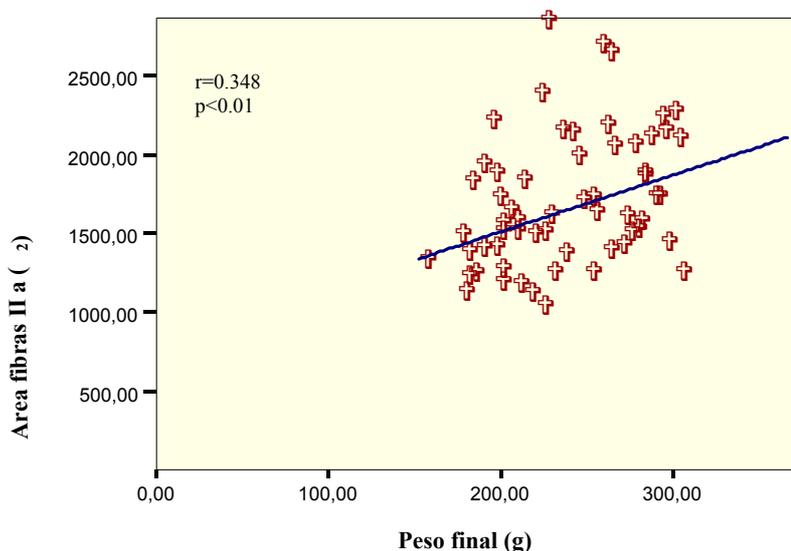


Tras aplicar el test de varianza de dos vías se apreció que tanto la malnutrición como el alcohol mostraron un efecto independiente sobre el área de estas fibras de manera significativa ( $F=22.09$ ,  $p<0.01$ ) y ( $F=4.38$ ,  $p<0.05$ ) respectivamente. La malnutrición disminuye el área y el alcohol la aumenta.

El área de las fibras tipo II A se correlacionó directamente y de manera significativa en todos los casos ( $p<0.01$ ) con:

- El peso final ( $r=0.348$ ,  $p<0.01$ ) (Fig. 8).
- El área de las fibras tipo II B ( $r=0.397$ ,  $p<0.01$ ).
- La albúmina ( $r=0.401$ ,  $p<0.01$ ).

**Figura 8. Relación área fibras II A con el peso final.**

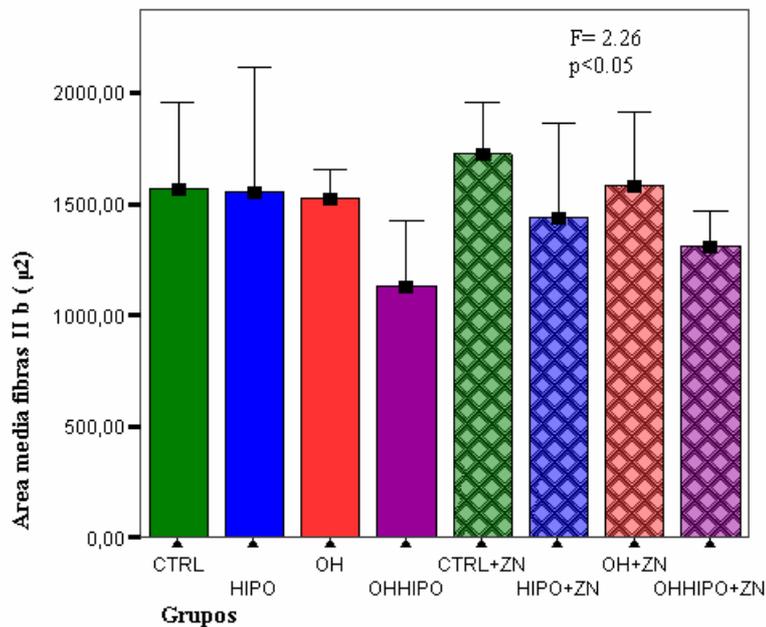


#### 4.1.1.4. ÁREA DE LAS FIBRAS MUSCULARES TIPO II B.

Como se comentó previamente (apartado 4.1.1.1) apreciamos diferencias significativas entre grupos en las áreas de las fibras tipo II B, siendo las ratas malnutridas-alcohólicas las que presentaron las áreas más pequeñas (Fig. 9).

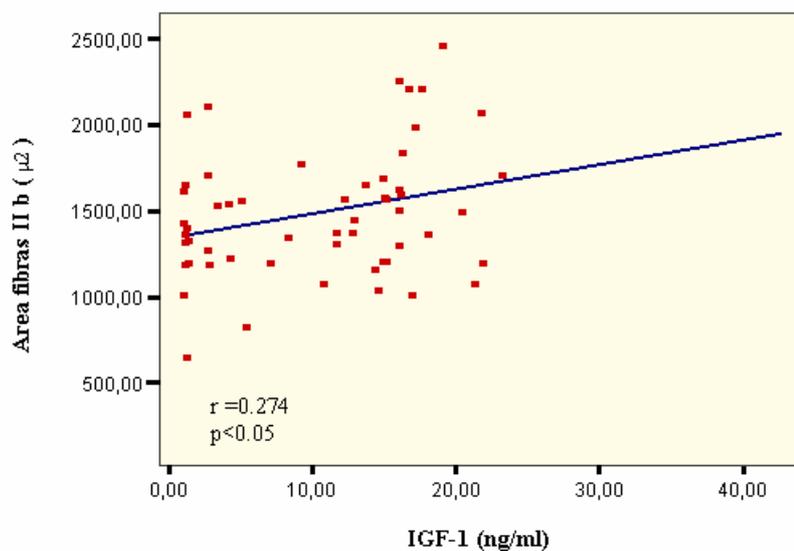
El análisis de varianza de dos vías puso de manifiesto un efecto independiente de la malnutrición proteica ( $F=6.53$ ,  $p<0.01$ ) y una débil significación estadística para el alcohol ( $F=3.758$ ,  $p=0.058$ ).

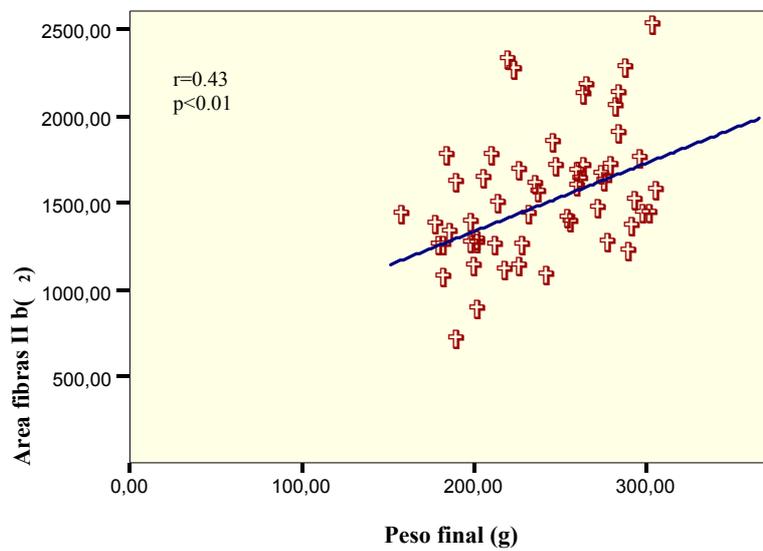
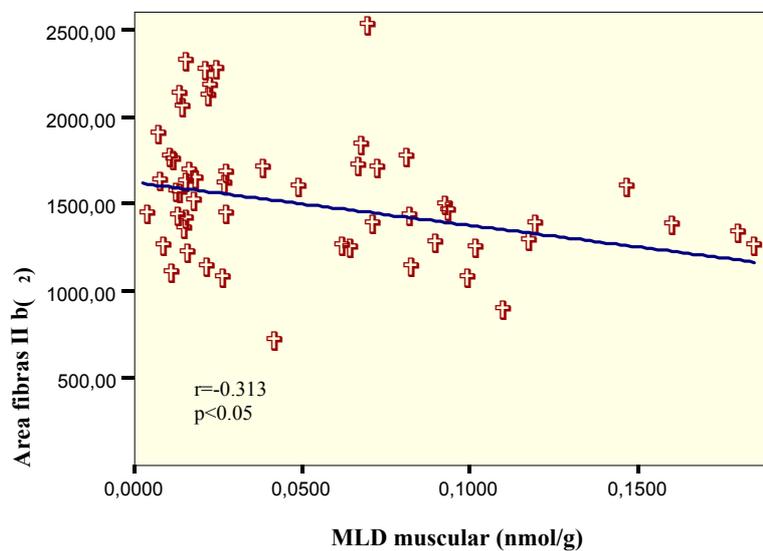
**Figura 9. Área media de las fibras musculares tipo II B.**



Observamos correlación directa del área de estas fibras con: el área de las fibras tipo I y II A, el IGF-1 ( $r=0.274$ ,  $p<0.05$ ) (Fig. 10) y con el peso final ( $r=0.43$ ,  $p<0.01$ ) (Fig. 11). Se apreció una relación inversa con los niveles de MLDm ( $r= -0.313$ ,  $p<0.05$ ) (Fig. 12 ).

**Figura 10. Relación entre las áreas de las fibras II B y el IGF-1.**



**Figura 11. Relación entre el área de las fibras tipo II B y el peso final.****Figura 12. Relación entre el área de las fibras tipo II B y los productos de la peroxidación lipídica.**

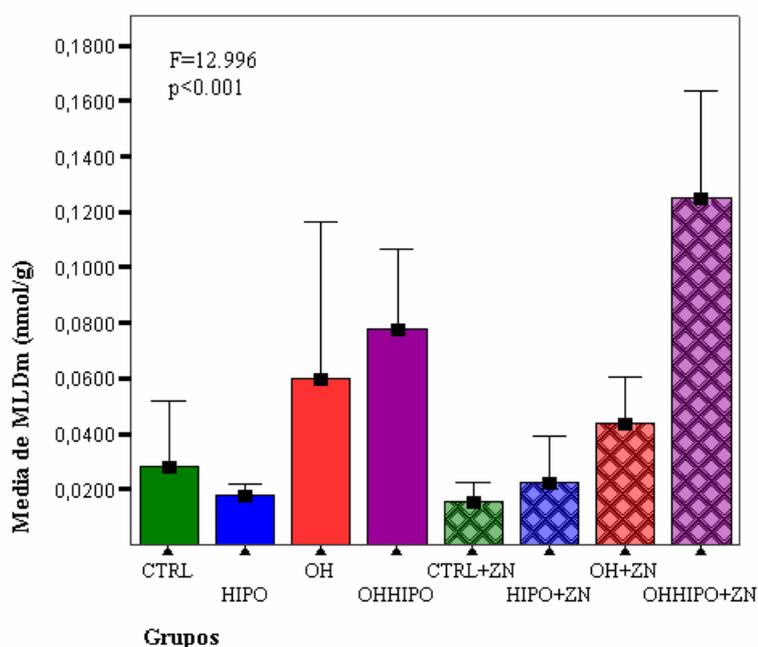
#### 4.1.2. DETERMINACIONES ENZIMÁTICAS.

##### 4.1.2.1. PEROXIDACIÓN LIPÍDICA , MALONILDIALDEHIDO MUSCULAR (MLDm).

Al analizar el MLDm se observan diferencias significativas entre los distintos grupos ( $F= 12.996$ ,  $p<0.001$ ) (fig. 13).

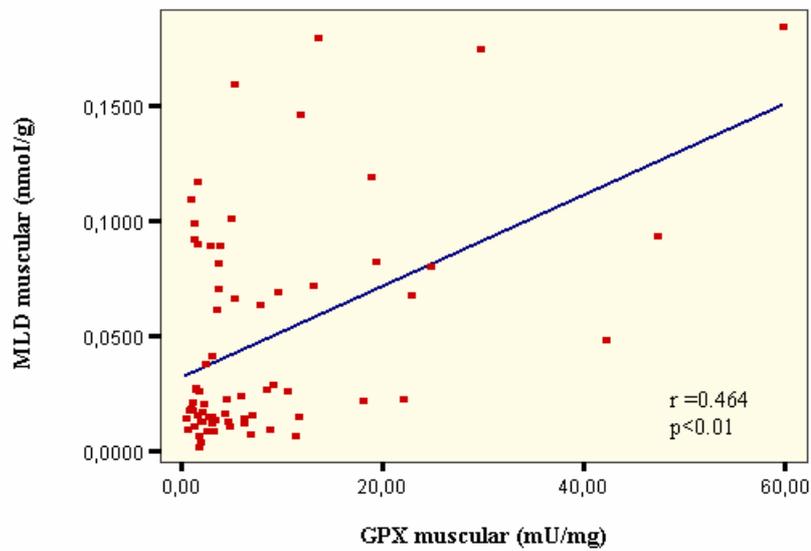
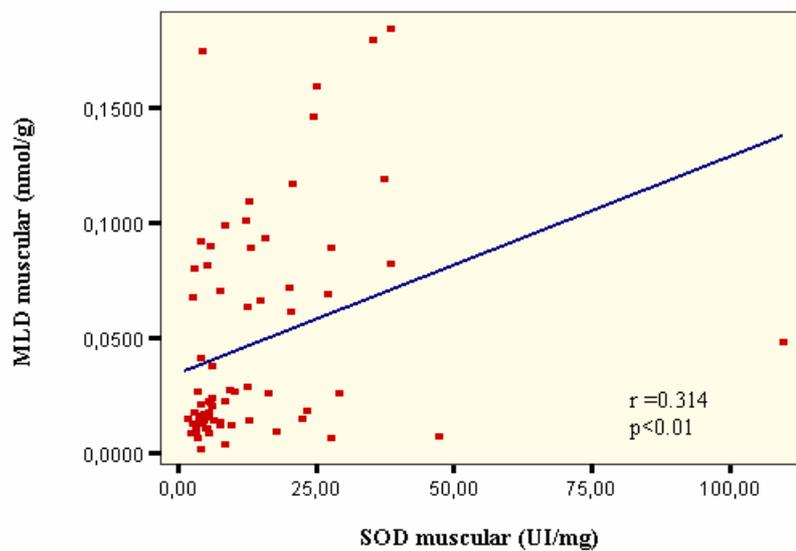
Los valores más altos los presentaron las ratas alcohólicas-malnutridas y las alcohólicas, presentando sólo diferencias significativas los dos grupos de ratas alcohólicas-malnutridas frente al resto de los grupos.

**Figura 13. Productos de la peroxidación lipídica.**

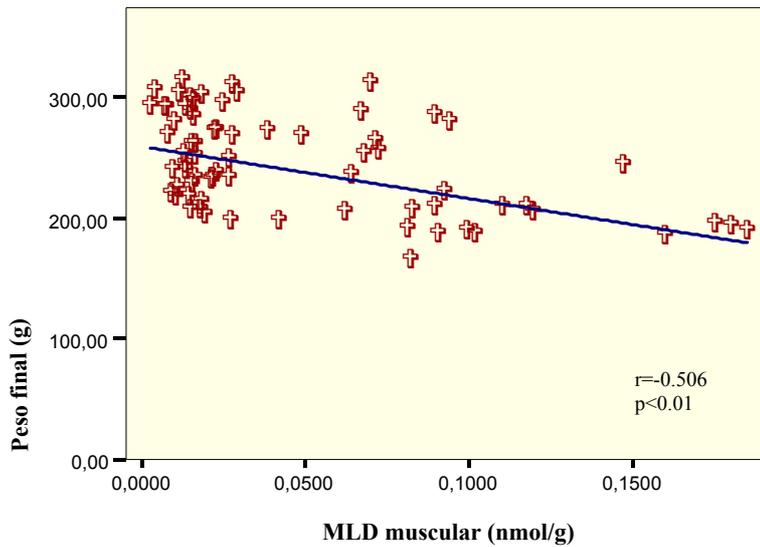


Al aplicar un análisis de varianza observamos un efecto independiente y significativo de la malnutrición ( $F=10.01$ ,  $p<0.01$ ) y el alcohol ( $F=53.99$ ,  $p<0.01$ ) y una interacción sinérgica entre alcohol y malnutrición y otra entre malnutrición y zinc.

Los niveles de MLDm presentaron correlación:-directa y significativa ( $p<0.01$ ) con la actividad de la GPXm ( $r=0.464$ ) (Fig. 14) y la SODm ( $r=0.314$ ) (Fig. 15).

**Figura 14. Correlación entre el MLDm y la actividad de la GPXm.****Figura 15. Relación productos de la peroxidación lipídica y actividad de la superóxidodismutasa.**

-Inversa e igualmente significativa con el peso final ( $r = -0.506$ ) (Fig. 16) y los niveles de IGF-1 ( $r = -0.472$ ).

**Figura 16. Relación del MLDm con el peso final.**

#### 4.1.2.2. SUPEROXIDODISMUTASA MUSCULAR (SODm).

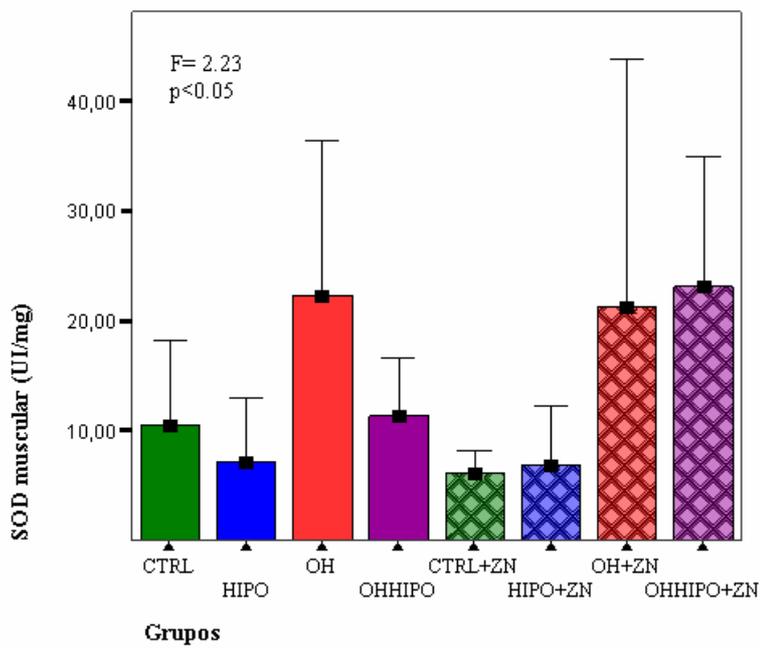
Tras análisis univariado se observa entre grupos diferencias estadísticamente significativas en los valores de la SODm ( $F=2.235$ ,  $p=0.042$ ) (Fig. 17).

Sólo se apreció un efecto independiente del alcohol sobre esta actividad enzimática ( $F=11.47$ ,  $p<0.01$ ), aumentándola.

La actividad de la SODm se correlacionó directa y significativamente con:

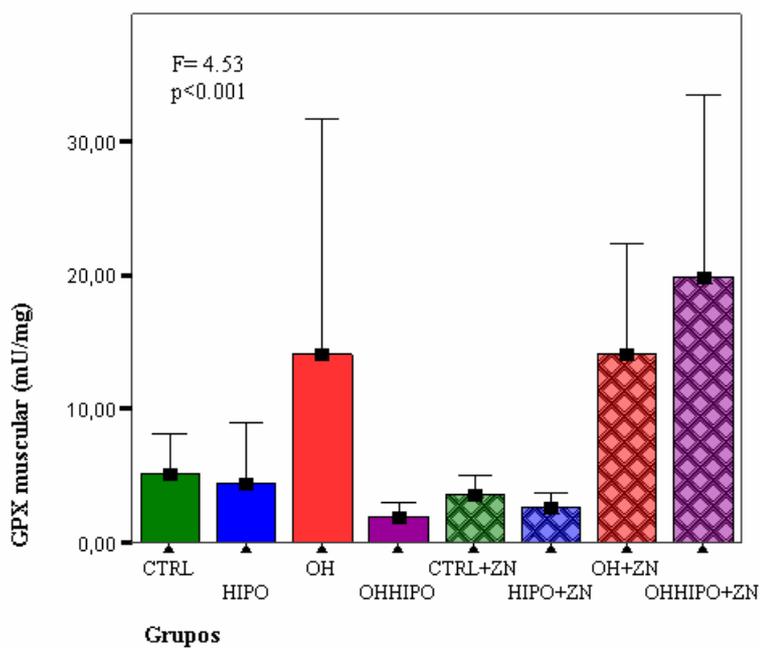
- La actividad de la GPXm ( $r=0.502$ ,  $p<0.01$ ).
- Los niveles de corticosterona ( $r=0.344$ ,  $p<0.01$ ).

Las actividades medias por grupo de la superoxidodismutasa y la glutathionperoxidasa muscular se muestran en la tabla 7.

**Figura 17. Actividad de la SOD muscular por grupos.**

#### 4.1.2.3. GLUTATIONPEROXIDASA MUSCULAR (GPXm).

Encontramos diferencias significativas en los valores de la GPXm entre grupos ( $F=4.532$ ,  $p<0.001$ ) (Fig. 18).

**Figura 18. Actividad de la GPX muscular por grupos.**

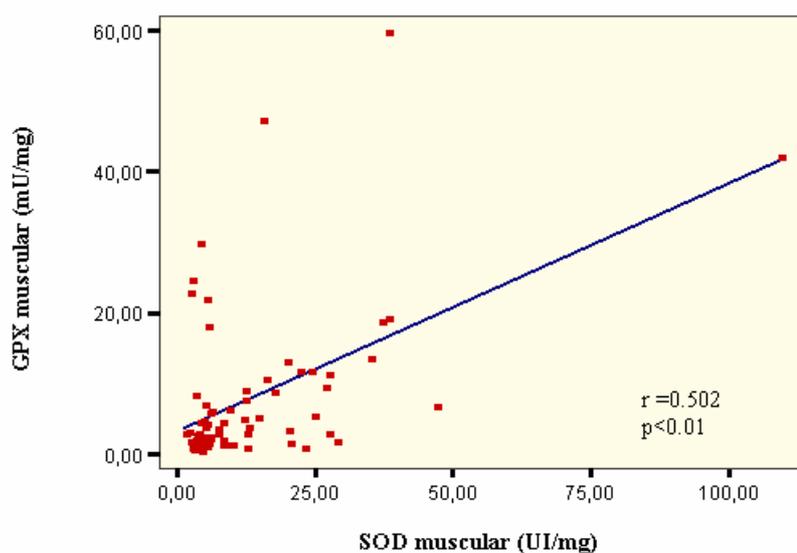
Cuando analizamos las diferencias por grupos se aprecia que las ratas alcohólicas-malnutridas con dietas suplementadas con zinc presentaron niveles de actividad enzimática diferentes significativamente del resto de los grupos ( $p < 0.05$ ) excepto los dos grupos de ratas alcohólicas.

Tras análisis de varianza de dos vías el alcohol presentó un efecto independiente de manera significativa sobre la actividad de la GPX ( $F=14.23$ ,  $p < 0.01$ ), aumentándola y se apreció también una interacción positiva alcohol y Zn ( $F=5.4$ ,  $p < 0.05$ ).

Tras realizar la correlación de Pearson se observó una correlación:

- Directa y significativa ( $p < 0.01$ ) con la actividad de la SODm (Fig. 19) y los productos de la peroxidación lipídica (Fig. 14).
- Inversa con los niveles de IGF-1 ( $r = -0.358$ ,  $p < 0.01$ ).

**Figura 19. Relación entre las actividades de la GPX y SOD musculares.**



**Tabla 7. Actividad media de la SOD muscular y la GPX muscular.**

	CTRL	HIPO	OH	OHHIPO	CTRL. + ZN	HIPO + ZN	OH + ZN	OHHIPO + ZN	F p	Diferencias Ad libitum control
<b>SOD m</b>										
<b>Media</b>	10.50	7.20	22.30	11.32	6.07	6.86	21.29	23.08	2.235	T=2.617
<b>Desv tip</b>	10.09	8.01	13.35	6.90	2.95	7.42	31.54	15.44	0.042	P=0.031
<b>GPX m</b>										
<b>Media</b>	5.11	4.43	14.11	1.92	3.60	2.59	14.09	19.88	4.532	T=3.067
<b>Desv tip</b>	3.96	6.35	16.73	1.32	1.91	1.49	11.50	17.64	<0.001	P=0.015

4.1.3. OLIGOELEMENTOS.

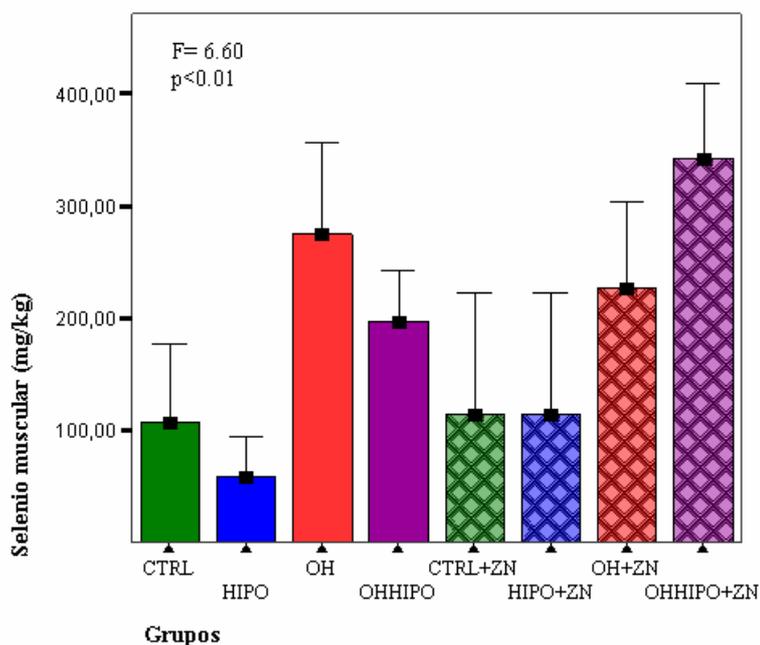
Los oligoelementos determinados en el tejido muscular fueron: selenio, manganeso, hierro, cobre y zinc. A continuación se exponen la cuantía de dichos oligoelementos en el músculo (Tabla 8).

**Tabla 8. Concentración de oligoelementos musculares.**

GRUPOS		SELENIO (mg/kg)	MANGANESO (mg/kg)	HIERRO (mg/kg)	COBRE (mg/kg)	ZINC (mg/kg)
CTRL.	Media	112.42	0.6122	25.74	2.31	24.35
	Desv. tip	80.64	1.47	11.99	1.34	9.70
HIPO	Media	62.43	0.3600	30.90	1.95	26.70
	Desv. Tip	40.61	0.8057	17.57	0.83	7.26
OH	Media	274.91	0.0000	54.83	3.23	37.96
	Desv. Tip	77.20	0.0000	11.35	1.00	6.94
OHHIPO	Media	190.44	0.0000	67.19	2.36	44.76
	Desv. Tip	67.40	0.0000	13.66	0.87	15.56
CTRL + ZN	Media	113.51	0.1780	41.76	2.15	28.60
	Desv. Tip	141.53	0.1844	41.25	0.95	9.95
HIPO + ZN	Media	114.22	0.0094	41.36	2.02	26.85
	Desv. Tip	140.73	0.1654	31.18	1.11	10.09
OH + ZN	Media	226.68	0.0000	49.92	2.82	39.55
	Desv. Tip	107.24	0.0000	15.37	1.66	9.81
OHHIPO + ZN	Media	342.61	0.0000	73.80	3.46	54.86
	Desv. Tip	79.68	0.0000	14.14	1.62	16.65
TOTAL	Media	182.19	0.1543	48.26	2.51	35.18
	Desv. Tip	129.42	0.6013	26.81	1.27	14.82
<b>F</b>		6.604	1.256	4.816	1.785	8.030
<b>p</b>		<0.01	0.286	<0.001	0.106	<0.001
<b>Diferencias</b>	T	10520	-3.730	0.303	-0.948	-2.422
<b>Ad libitum</b>	p	0.175	0.015	0.766	0.360	0.065
<b>control</b>						

4.1.3.1. SELENIO MUSCULAR.

Encontramos diferencias estadísticamente significativas entre grupos (F=6.60, p<0.01) (Fig. 20).

**Figura 20. Media de las concentraciones de selenio muscular.**

Los valores más altos de este mineral lo presentaron los cuatro grupos de ratas alcohólicas. El análisis con el test de S-N-K mostró una diferencia clara entre los grupos alcohólicos y el alcohólico-malnutrido con suplemento de zinc frente al resto de los grupos.

En el análisis de varianza univariado se apreció un efecto independiente del alcohol sobre las concentraciones musculares de selenio ( $F=41.84$ ,  $p<0.01$ ) aumentándolo y una interacción negativa de la malnutrición y los suplementos de zinc ( $F=5.39$ ,  $p<0.05$ ).

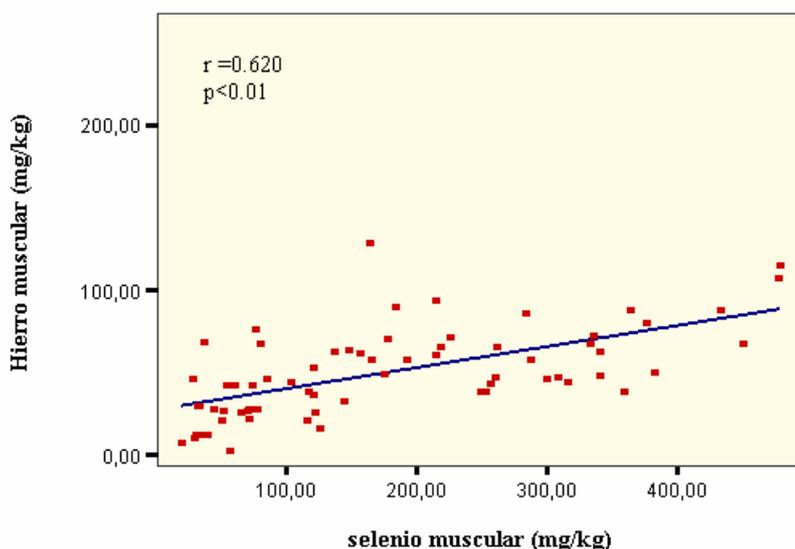
La concentración de selenio muscular tras aplicar el test de correlación de la  $r$  de Pearson se relacionó :

-Directamente con:

- La concentración de hierro en el músculo ( $r=0.620$ ,  $p<0.01$ ) (Fig. 21).
- El cobre muscular ( $r=0.513$ ,  $p<0.01$ ).
- Los valores de zinc muscular ( $r=0.520$ ,  $p<0.01$ ).
- Los productos de la peroxidación lipídica en el músculo MLDm ( $r=0.457$ ,  $p<0.01$ ).
- La actividad enzimática muscular de la SOD y la GPX ( $r=0.370$ ,  $p<0.01$ ) y ( $r=0.396$ ,  $p<0.01$ ) respectivamente.

-Inversamente con el área de las fibras tipo II B ( $r=-0.354$ ,  $p=0.012$ ).

**Figura 21. Relación concentraciones de selenio e hierro musculares.**



#### 4.1.3.2. MANGANESO MUSCULAR.

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos ( $F=1.25$ ,  $p=0.289$ ).

#### 4.1.3.3. HIERRO MUSCULAR.

Al analizar los valores medios de las concentraciones musculares de hierro entre los diferentes grupos observamos diferencias con significación estadística ( $F=4.81$ ,  $p<0.001$ ) (Fig. 22).

Las ratas alcohólicas y las alcohólicas-malnutridas, con y sin zinc, fueron las que presentaron los valores más altos de hierro en músculo, poniéndose de manifiesto en el análisis posterior sólo una diferencia claramente significativa de los dos grupos de ratas alcohólicas-malnutridas frente a las ratas control y malnutridas sin zinc.

Observamos tras aplicar el análisis de varianza de dos vías un efecto independiente del alcohol sobre esta variable ( $F=20.55$ ,  $p<0.01$ ), aumentando su concentración.

El contenido óseo de hierro muscular se relacionó con:

- El de cobre muscular directamente ( $r=0.395$ ,  $p<0.001$ ) (Fig. 23).
- El contenido muscular de zinc ( $r=0.680$ ,  $p<0.001$ ) de forma directa.

Figura 22. Concentraciones medias de hierro muscular por grupos.

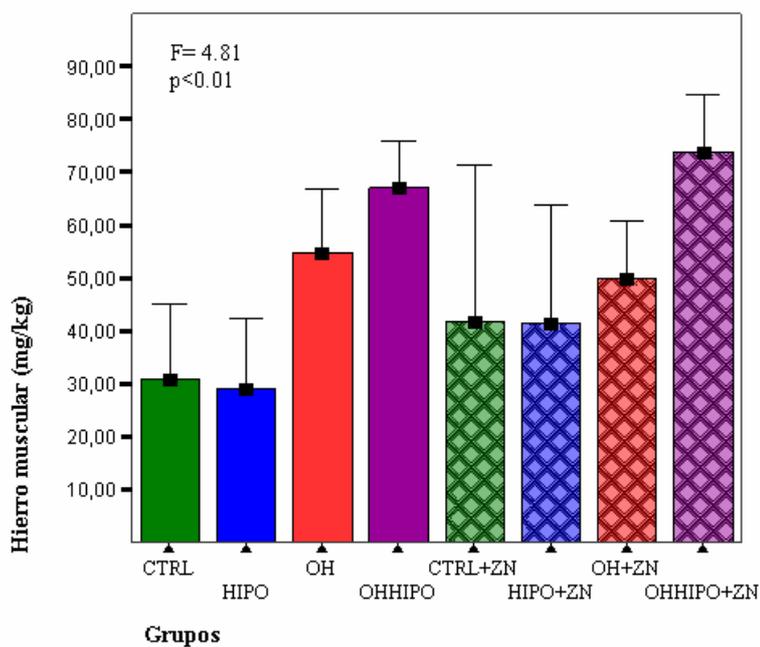
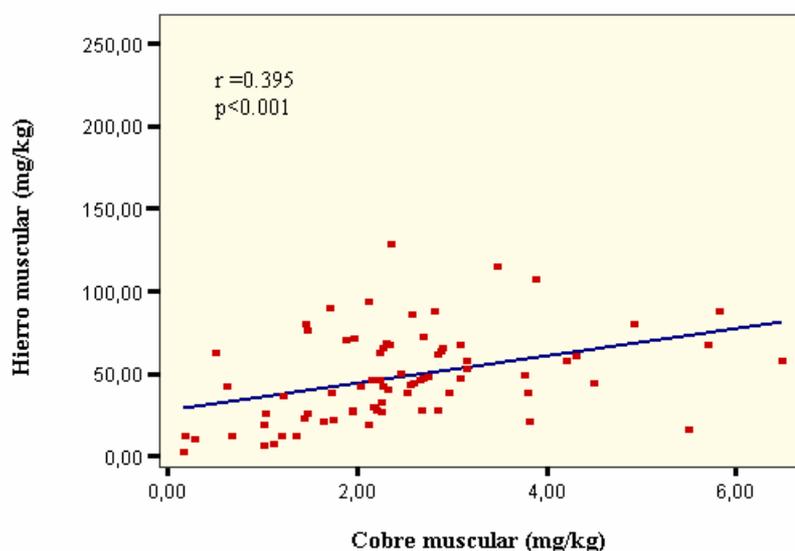
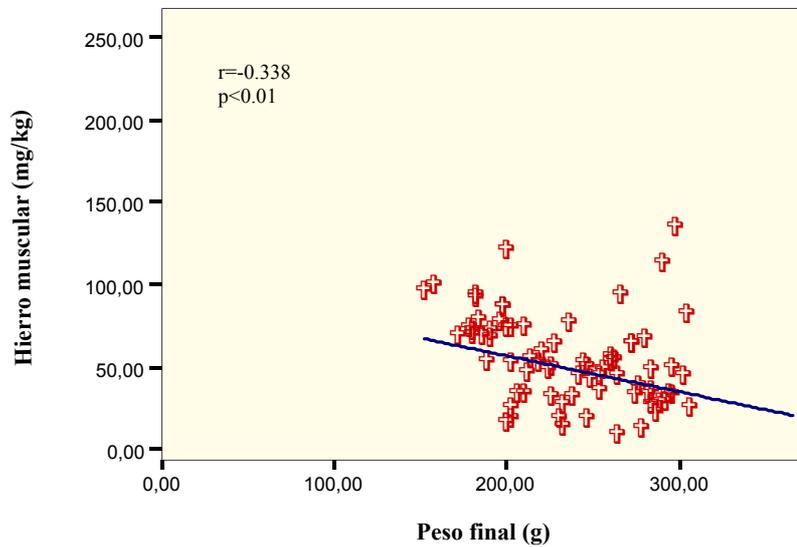


Figura 23. Relación del contenido muscular de hierro y cobre.

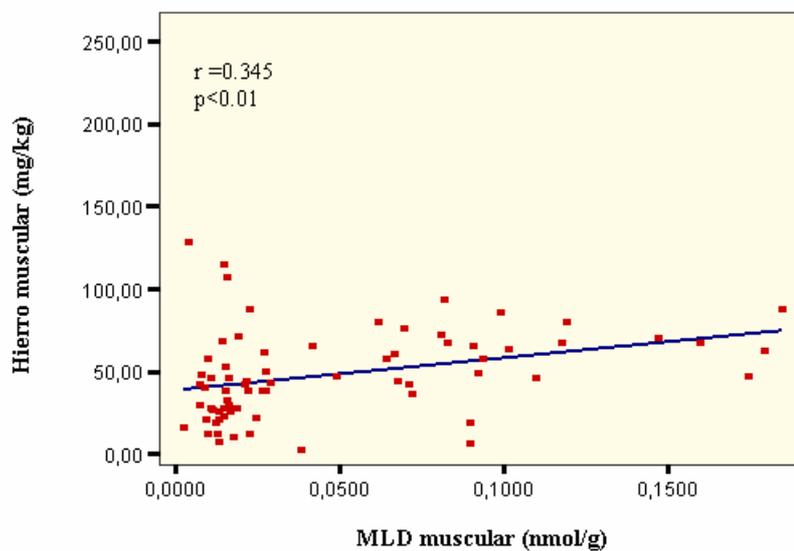


- El peso final ( $r=-0.338$ ,  $p<0.01$ ) inversamente (Fig. 24).
- Los productos de la peroxidación lipídica ( $r=0.345$ ,  $p<0.01$ ) de forma directa (Fig. 25).
- El selenio muscular ( $r=0.620$ ,  $p<0.01$ ) (Fig. 21).

**Figura 24. Relación contenido muscular de hierro y peso final.**



**Figura 25. Relación contenido muscular de hierro y productos de la peroxidación lipídica.**



#### 4.1.3.4. COBRE MUSCULAR.

El análisis de varianza no mostró diferencias entre los grupos ( $F=1.78$ ,  $p=0.10$ ).

Sus valores se correlacionaron directamente con:

-La concentración de zinc muscular ( $r=0.486$ ,  $p<0.001$ ).

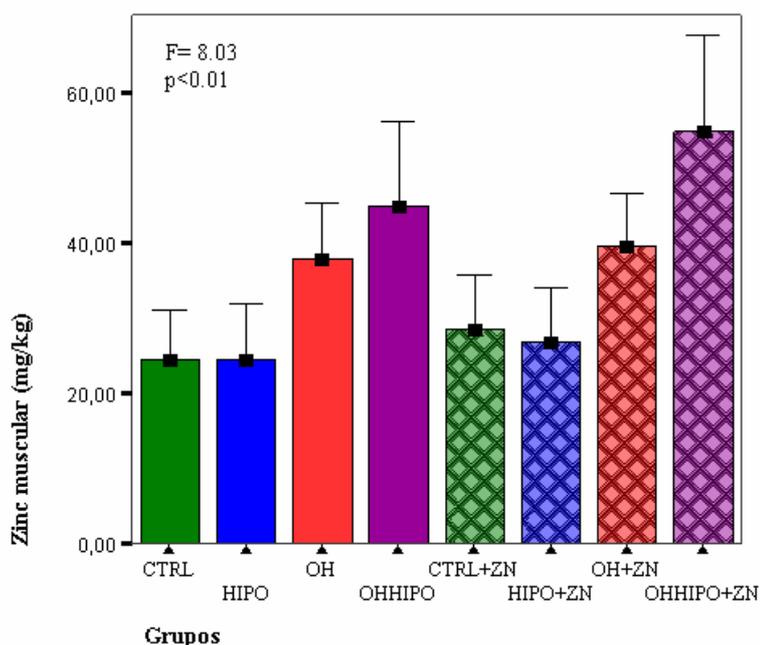
-La actividad de la GPXm ( $r=0.285$ ,  $p<0.05$ ).

#### 4.1.3.5. ZINC MUSCULAR.

Los valores medios de zinc fueron diferentes entre los grupos de manera significativa ( $F=8.03$ ,  $p<0.001$ ) (Fig. 26).

Nuevamente las concentraciones de este mineral fueron mas altas en los grupos de ratas alcohólicas. Las diferencias estadísticamente significativas las encontramos entre los grupos de ratas alcohólicas-malnutridas frente a los dos grupos de ratas control y los dos de ratas malnutridas. Además, comparando entre sí los cuatro grupos alcohólicos, fue diferente respecto a esta magnitud el grupo alcohólico-malnutrido con zinc frente a los dos alcohólicos, con y sin zinc.

**Figura 26. Concentraciones medias de zinc muscular por grupos.**

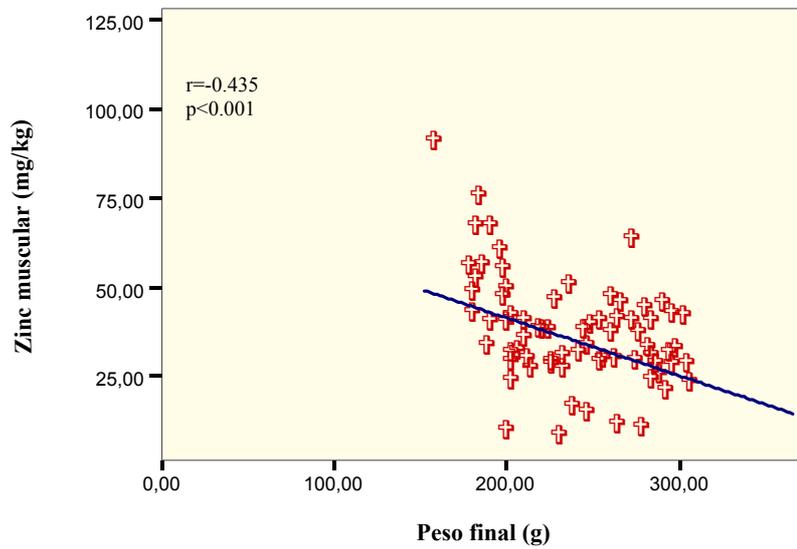


Objetivamos un efecto independiente del alcohol ( $F=46.03$ ,  $p<0.01$ ) y una interacción positiva del alcohol y la malnutrición ( $F=5.04$ ,  $p<0.05$ ) sobre esta variable al realizar el test de la varianza de dos vías.

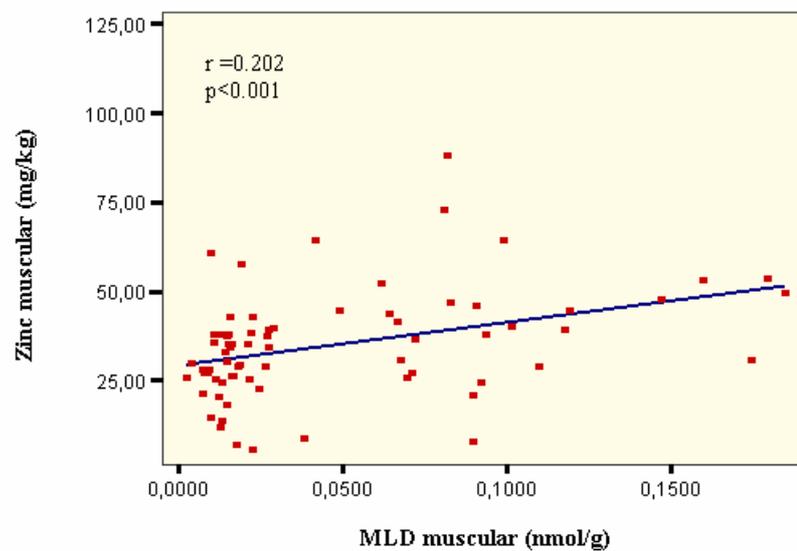
La concentración de zinc muscular se relacionó de manera directa con la de todos los oligoelementos musculares excepto con el manganeso, y además se relacionó con:

- El peso final de forma inversa ( $r=-0.435$ ,  $p<0.001$ ) (Fig. 27).
- El MLDm de manera directa ( $r=0.202$ ,  $p=0.001$ ) (Fig. 28).

**Figura 27. Relación de la concentración de zinc muscular con el peso final.**



**Figura 28. Relación de la concentración de zinc muscular con los productos de la peroxidación lipídica.**



#### 4.1.4. HORMONAS.

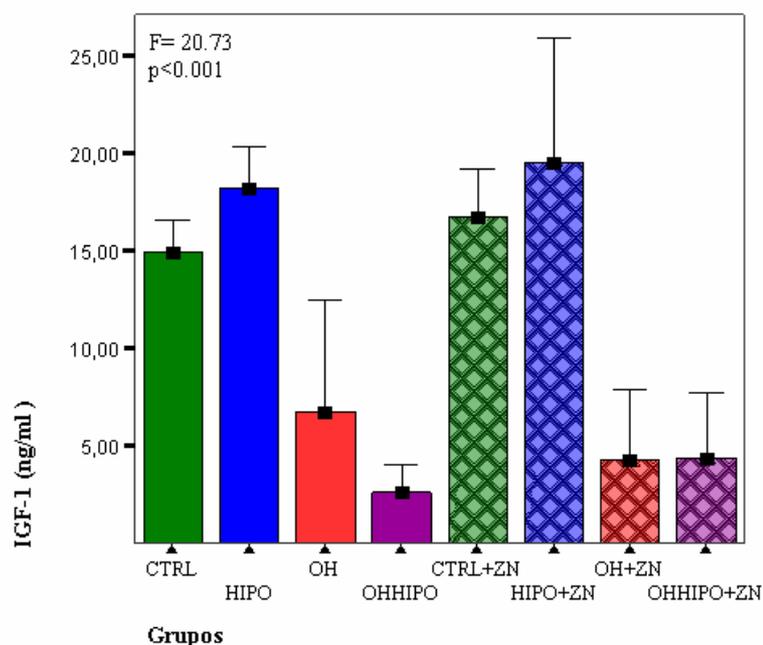
##### 4.1.4.1. FACTOR DE CRECIMIENTO INSULIN LIKE TIPO 1 (IGF-1)

Encontramos diferencias estadísticamente significativas en los niveles de IGF-1 entre grupos ( $F=20.733$ ,  $p<0.001$ ) (Fig. 29).

En el análisis estadístico posterior se aprecia que la diferencia se establece entre los grupos de ratas control e hipoproteicas con o sin zinc y los grupos de ratas que siguieron dieta alcohólica tanto iso como hipoproteica independientemente del suplemento con zinc. Existiendo un efecto independiente sobre esta variable del alcohol ( $F=130.24$ ,  $p<0.01$ ) disminuyendo sus concentraciones y una interacción negativa entre malnutrición y alcohol ( $F=5.08$ ,  $p<0.05$ ).

Los niveles de IGF-1 se correlacionaron inversamente con los niveles de albúmina ( $r=-0.254$ ,  $p<0.05$ ), la GPX y los MLDm ( $p<0.01$ ). También relacionaron con las fibras II B de manera directa (Fig. 10).

**Figura 29. Valores medios de la IGF-1 por grupos.**



##### 4.1.4.2. TESTOSTERONA

No se observaron diferencias entre grupos ( $F=1.027$ ,  $p=0.421$ ).

Tampoco los niveles de testosterona se relacionaron con ningún parámetro muscular.

4.1.4.3. CORTICOSTERONA

Tras el análisis estadístico no pudimos apreciar diferencias significativas en las concentraciones plasmáticas de corticosterona entre grupos.

## 4.2. HUESO.

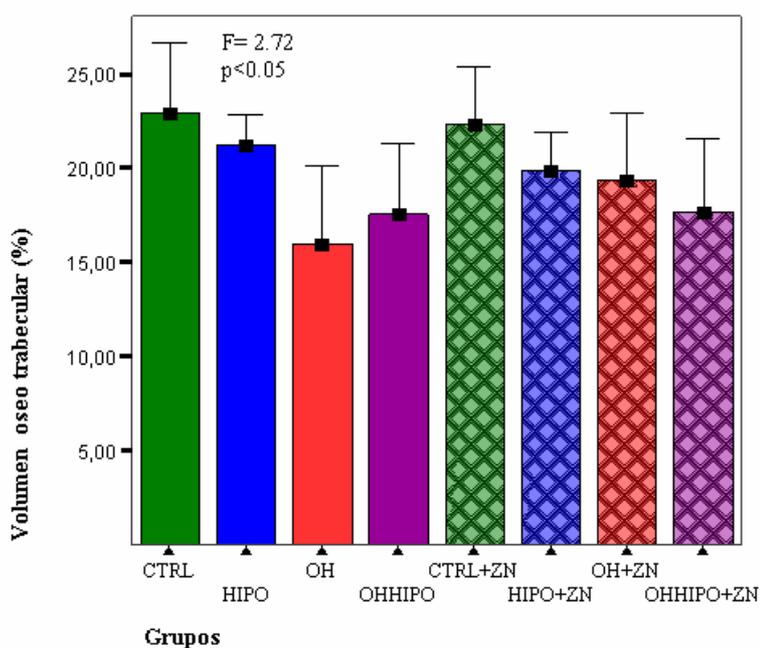
### 4.2.1. HISTOMORFOMETRÍA.

#### 4.2.1.1. VOLUMEN ÓSEO TRABECULAR.

Tras análisis de la varianza encontramos diferencias significativas entre grupos ( $F=2.72$ ,  $p=0.016$ ) (Fig. 30).

El volumen más bajo lo presentaron los grupos alcohólicos con o sin malnutrición asociada e independientemente del zinc, y se diferenciaron claramente, y de manera significativa, los dos grupos control del grupo de ratas alcohólicas sin zinc.

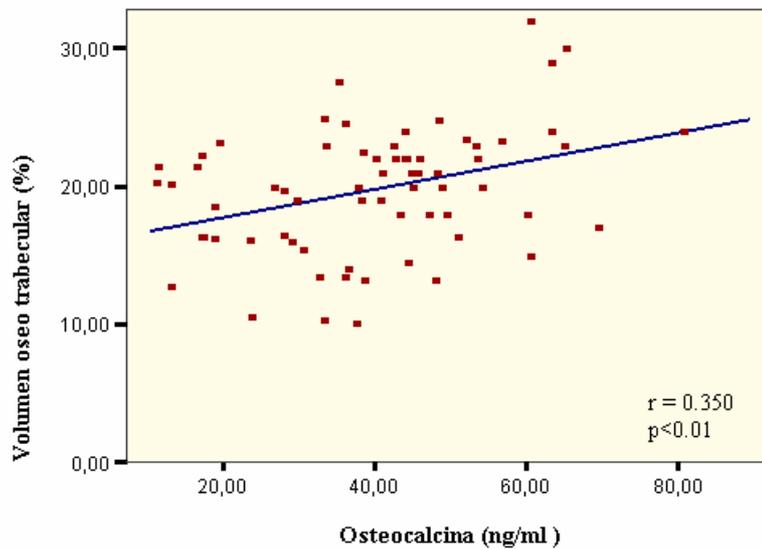
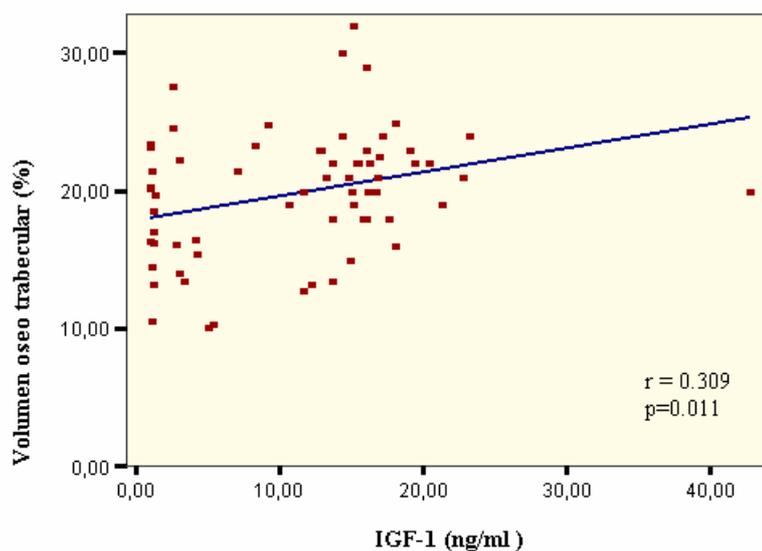
**Figura 30. Volumen óseo mineralizado por grupos.**



Observamos un efecto independiente del alcohol sobre el volumen óseo ( $F=14.50$ ,  $p<0.01$ ), disminuyéndolo.

Cuando analizamos las correlaciones entre esta magnitud y el resto de los parámetros bioquímicos e histomorfométricos por la  $r$  de Pearson apreciamos relación:

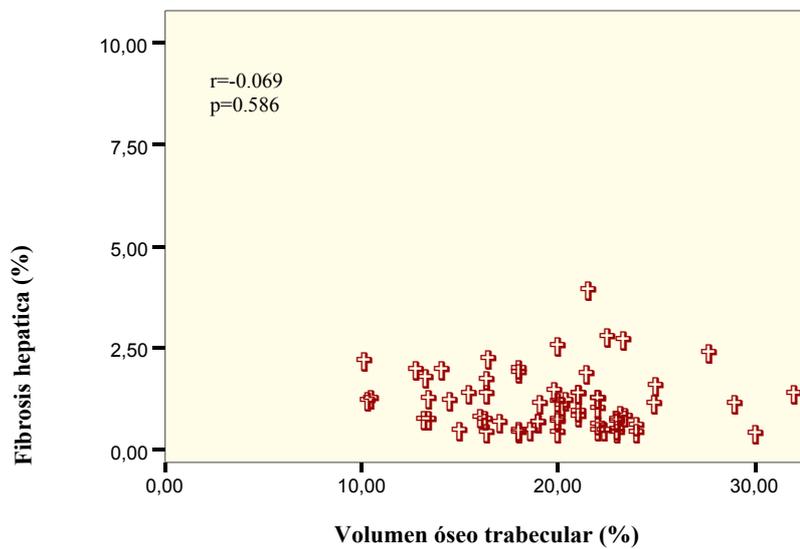
- Directa con los niveles de osteocalcina ( $r=0.350$ ,  $p<0.01$ ) (Fig. 31).
- Directa con la IGF-1 ( $r=0.309$ ,  $p=0.011$ ) (Fig. 32).
- Directa con el peso final del animal ( $r=0.246$ ,  $p=0.046$ ).
- Inversa con la concentración de hierro en hígado ( $r=-0.255$ ,  $p<0.05$ ).

**Figura 31. Relación del volumen óseo trabecular y la osteocalcina.****Figura 32. Relación del volumen óseo trabecular y las concentraciones de IGF-1.**

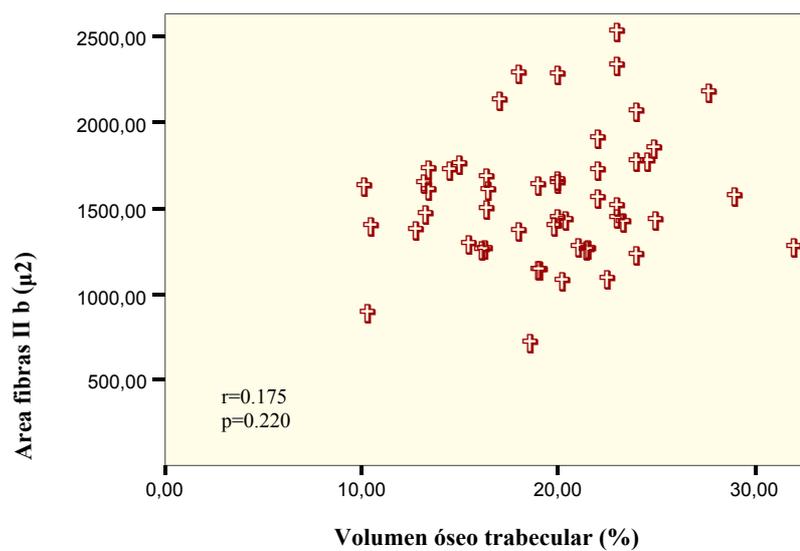
Cuando buscamos posibles relaciones entre esta variable y los parámetros musculares y hepáticos no encontramos relación con significación estadística con el porcentaje de fibrosis hepática ( $r = -0.069$ ,  $p = 0.586$ ) (Fig. 33), ni con la cantidad de grasa hepática ( $r = -0.030$ ,  $p = 0.813$ ), el área de los tres tipos de fibras musculares: I

( $r=0.085$ ,  $p=0.532$ ), II A ( $r=-0.039$ ,  $p=0.777$ ), II B ( $r=0.175$ ,  $p=0.22$ ) (Fig. 34) ni con la testosterona ( $r=-0.153$ ,  $p=0.22$ ).

**Figura 33. Relación entre el volumen óseo trabecular y la fibrosis hepática.**



**Figura 34. Relación entre el volumen óseo trabecular y el área de las fibras musculares tipo II B.**

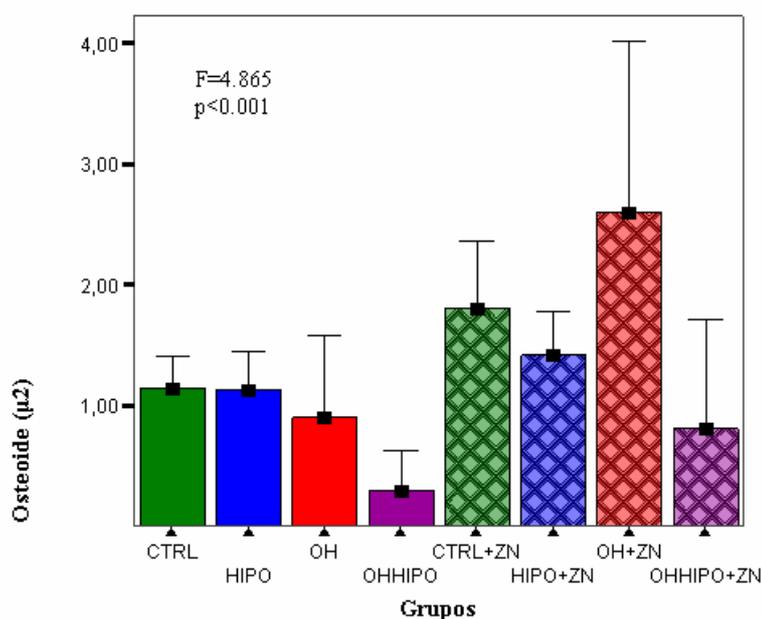


4.2.1.2. OSTEOIDE.

Apreciamos la existencia de diferencias estadísticamente significativas en la proporción de osteoide entre los distintos grupos ( $F=4.865$ ,  $p<0.001$ ) (Fig. 35).

Los grupos de ratas alcohólicas-malnutridas fueron los que presentaban menor proporción de éste, pero el análisis ulterior sólo evidenció como realmente diferentes al grupo alcohólico-malnutrido con zinc del grupo alcohólico con zinc.

**Figura 35. Proporción de osteoide por grupos.**



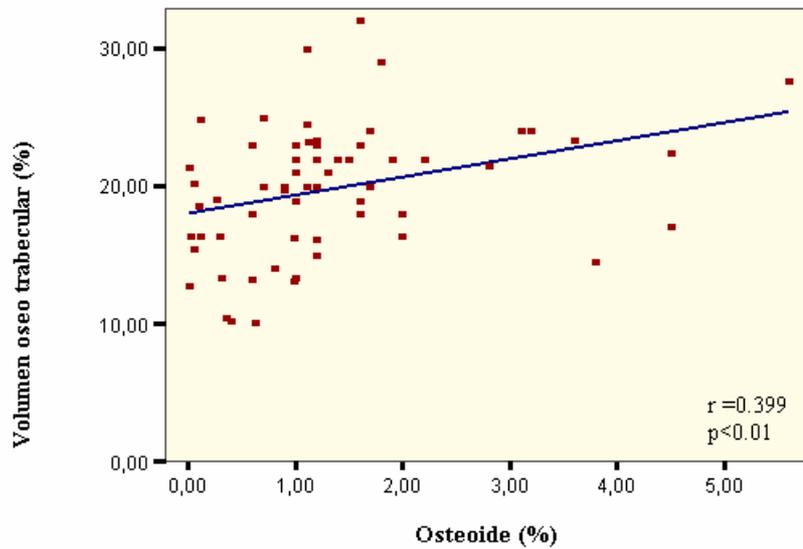
Tras análisis de la varianza de dos vías se puso de manifiesto que tanto la malnutrición ( $F=8.883$ ,  $p<0.01$ ) como el zinc ( $F=11.22$ ,  $p=0.001$ ) ejercían un efecto independiente sobre la proporción de osteoide presente, existiendo una interacción entre alcohol y malnutrición ( $F=4.466$ ,  $p<0.05$ ).

La cantidad de osteoide correlacionaba de manera significativa y de forma directa con:

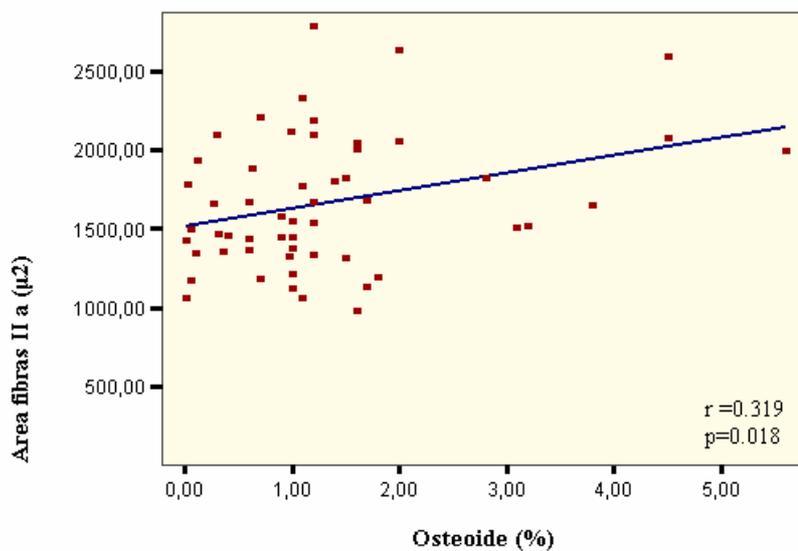
- El volumen óseo trabecular ( $r=0.329$ ,  $p<0.01$ ) (Fig. 36).
- La osteocalcina ( $r=0.365$ ,  $p<0.01$ ).
- El peso final ( $r=0.290$ ,  $p=0.018$ ).
- La vitamina D ( $r=0.323$ ,  $p<0.01$ ).
- El área de las fibras musculares II A ( $r=0.319$ ,  $p=0.018$ ) (Fig. 37).
- El área de las fibras musculares II B ( $r=0.340$ ,  $p=0.012$ ) (Fig. 38).

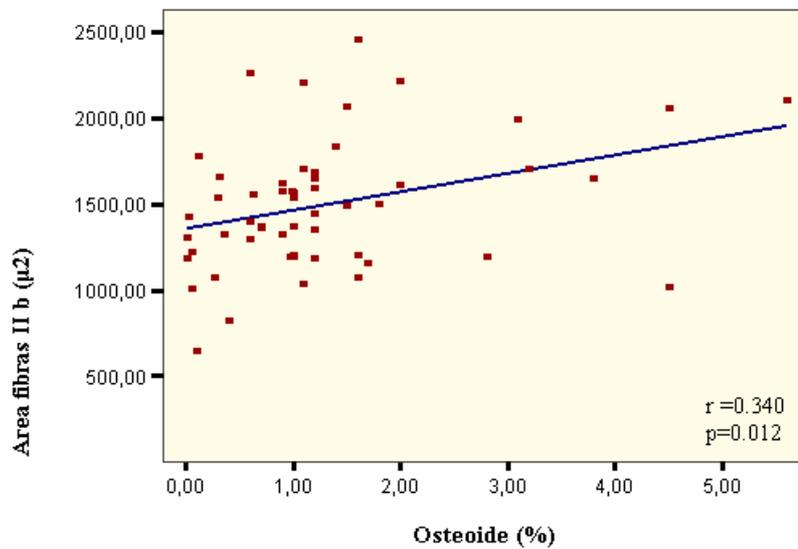
El osteoide además correlacionó de forma inversa con el hierro hepático ( $r = -0.396$ ,  $p < 0.001$ ).

**Figura 36. Relación entre osteoide y volumen óseo trabecular.**

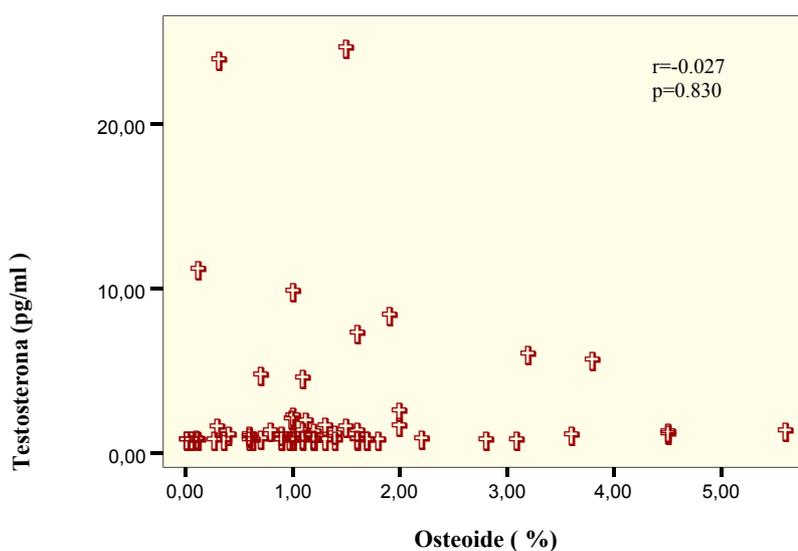


**Figura 37. Relación osteoide - área de las fibras musculares tipo II A.**



**Figura 38. Relación osteoide - área de las fibras musculares tipo II B.**

No hubo relación estadísticamente significativa entre la proporción de osteoide y la cantidad de fibrosis ( $r=0.178$ ,  $p=0.159$ ) o grasa hepática ( $r=-0.067$ ,  $p=0.594$ ), ni con la testosterona ( $r=-0.027$ ,  $p=0.830$ ) (Fig. 39), la corticosterona ( $r=0.134$ ,  $p=0.823$ ) ni el IGF-1 ( $r=0.097$ ,  $p=0.433$ ).

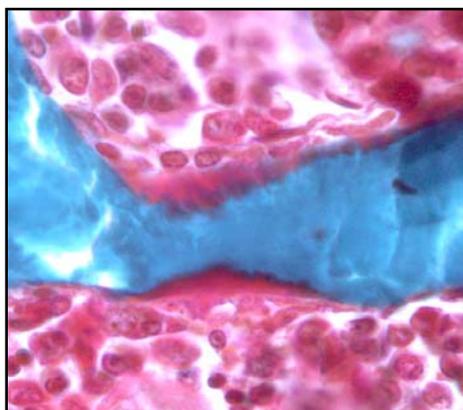
**Figura 39. Relación entre cantidad de osteoide y valores de testosterona.**

A continuación pasamos a exponer los porcentajes medios por grupos del volumen óseo mineralizado y del osteoide (Tabla 9) y a mostrar un corte histológico de hueso teñido con tricrómico donde se aprecia la aposición de osteoide (Fig. 40).

**Tabla 9. Porcentaje de la superficie ósea mineralizada y el osteoide con respecto al área ósea total por grupos.**

GRUPOS		VOLUMEN ÓSEO MINERALIZADO (%)	OSTEOIDE (%)
CTRL.	Media	22.888	1.114
	Desv. tip	4.910	0.346
HIPO	Media	21.222	1.133
	Desv. tip	2.108	0.412
OH	Media	16.001	0.898
	Desv. tip	3.918	0.650
OHHIPO	Media	17.545	0.296
	Desv. tip	4.884	0.398
CTRL. + ZN	Media	22.333	1.810
	Desv. tip	3.968	0.768
HIPO + ZN	Media	19.857	1.412
	Desv. tip	2.193	0.442
OH + ZN	Media	19.337	2.602
	Desv. tip	5.029	1.984
OHHIPO + ZN	Media	17.682	0.804
	Desv. tip	4.629	0.974
F		2.722	4.865
p		0.016	<0.001
Diferencias Ad libitum control	T	1.416	-2.432
	p	0.182	0.063

**Figura 40. Corte histológico óseo donde se aprecia el depósito de osteoide.**



#### 4.2.2. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS.

##### 4.2.2.1. CALCIO.

No encontramos diferencias con significación estadística entre grupos.

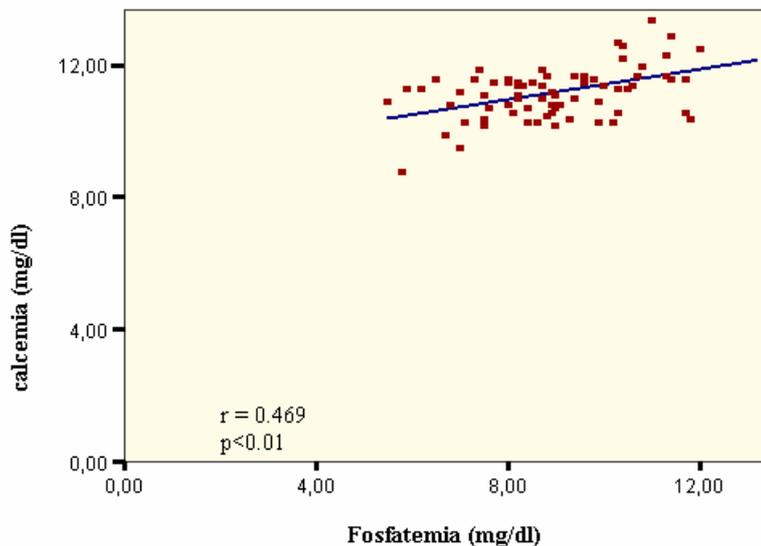
En el análisis de correlación por la r de Pearson se apreció:

-Relación directa con los valores en sangre de albúmina ( $r=0.511$ ,  $p<0.01$ ).

-Relación directa con la PTH ( $r=0.377$ ,  $p<0.01$ ).

-Relación directa con la fosfatemia ( $r=0.469$ ,  $p<0.01$ ) (Fig. 41).

**Figura 41. Relación calcemia-fosfatemia.**

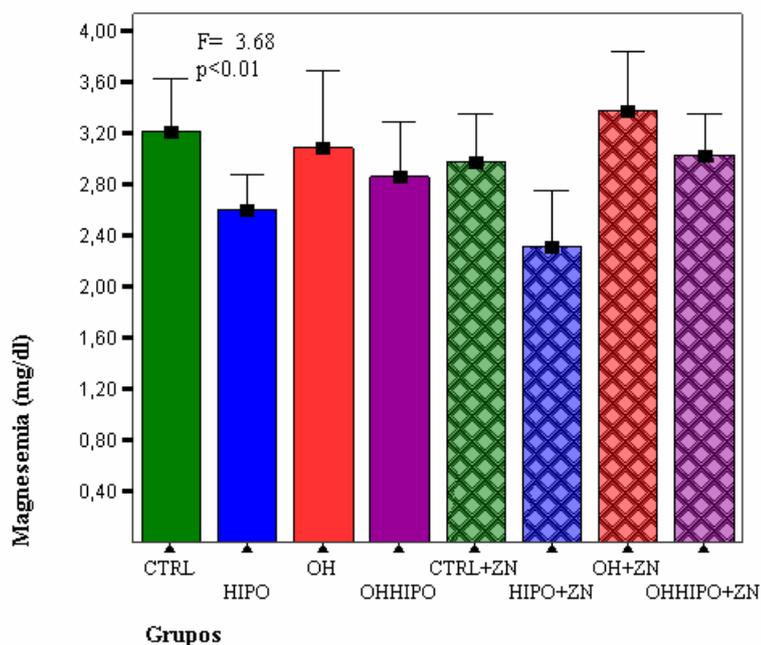


##### 4.2.2.2. MAGNESIO.

Se apreciaron diferencias intergrupales con significación estadística ( $F=3.68$ ,  $p<0.01$ ) (Fig. 42).

Las ratas malnutridas presentaron los valores más bajos y se pudo apreciar diferencias entre las ratas de los dos grupos control y las alcohólicas sin zinc frente a las malnutridas sin zinc.

Objetivamos también un efecto independiente del alcoholismo ( $F=5.84$ ,  $p=0.018$ ) disminuyéndolo, y la malnutrición ( $F=12.94$ ,  $p<0.001$ ) sobre este elemento.

**Figura 42. Medias de magnesemia por grupos.**

Apreciamos una correlación de las concentraciones plasmáticas de magnesio:

- Directa con la albúmina ( $r=0.680$ ,  $p<0.001$ ).
- Directa con la calcemia ( $r=0.666$ ,  $p<0.001$ ).
- Directa con la fosfemia ( $r=0.663$ ,  $p<0.001$ ).
- Inversa con los niveles plasmáticos de IGF-1 ( $r=-0.304$ ,  $p<0.001$ ).
- Tendencia a la relación directa con el peso final del animal ( $r=0.225$ ,  $p=0.058$ ).

#### 4.2.2.3. FÓSFORO.

No se observaron diferencias entre grupos tras análisis de la varianza.

Se correlacionó directamente con:

- Las concentraciones plasmáticas de albúmina ( $r=0.511$ ,  $p<0.01$ ).
- La calcemia (Fig. 41).

Se correlacionó inversamente con:

- El IGF-1 ( $r=-0.240$ ,  $p<0.05$ ).

#### 4.2.2.4. FOSFATASA ALCALINA.

No encontramos diferencias significativas entre grupos ( $F=0.662$ ,  $p=0.70$ ).

Se correlacionó directamente con :

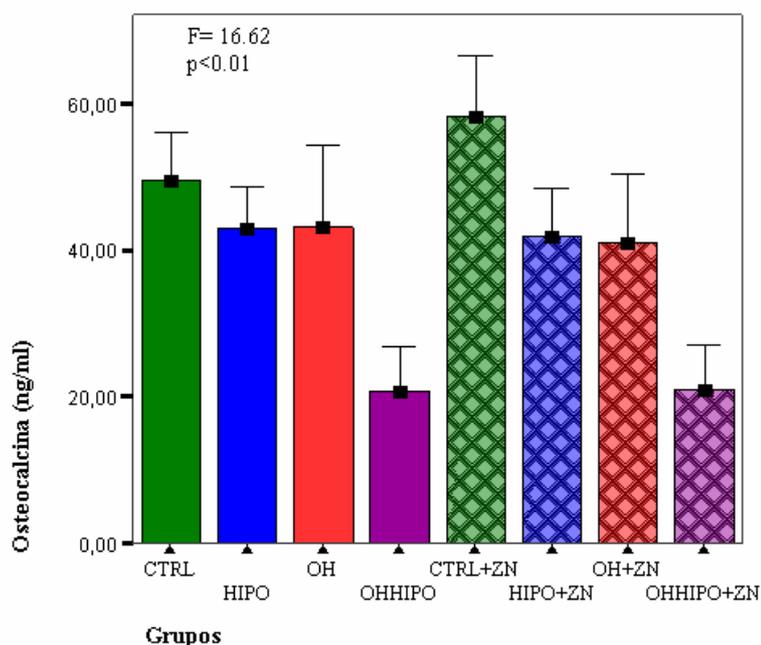
-El aclaramiento de calcio ( $r=0.345$ ,  $p=0.003$ ).

-El aclaramiento de magnesio ( $r=0.311$ ,  $p=0.007$ ).

#### 4.2.2.5. OSTEOCALCINA.

Se apreciaron diferencias significativas ( $F=16.62$ ,  $p<0.01$ ) entre los distintos grupos de estudio (Fig. 43).

**Figura 43. Valores de osteocalcina por grupos.**



Los niveles más bajos los presentaron los grupos alcohólicos y los alcohólicos-malnutridos. En el análisis realizado con posterioridad pudimos ver que los 2 grupos de ratas alcohólicas y los dos de malnutridas eran iguales entre sí y distintos a las alcohólica-malnutridas por un lado y a las controles por otro, no influyendo el zinc.

Tras análisis de la varianza de dos vías objetivamos un efecto independiente del alcohol ( $F=46.79$ ,  $p<0.01$ ) y de la dieta hipoproteica ( $F=44.96$ ,  $p<0.01$ ) como variables independientes sobre la concentración de osteocalcina, y una tendencia a la interacción alcohol malnutrición ( $F=3.61$ ,  $p=0.061$ ).

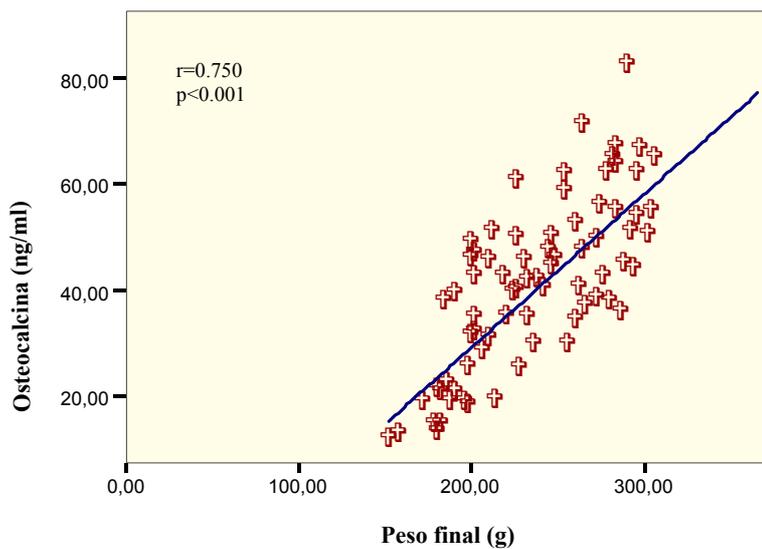
La osteocalcina se relacionó de manera directa con:

-El peso final del animal ( $r=0.750$ ,  $p<0.001$ ) (Fig. 44).

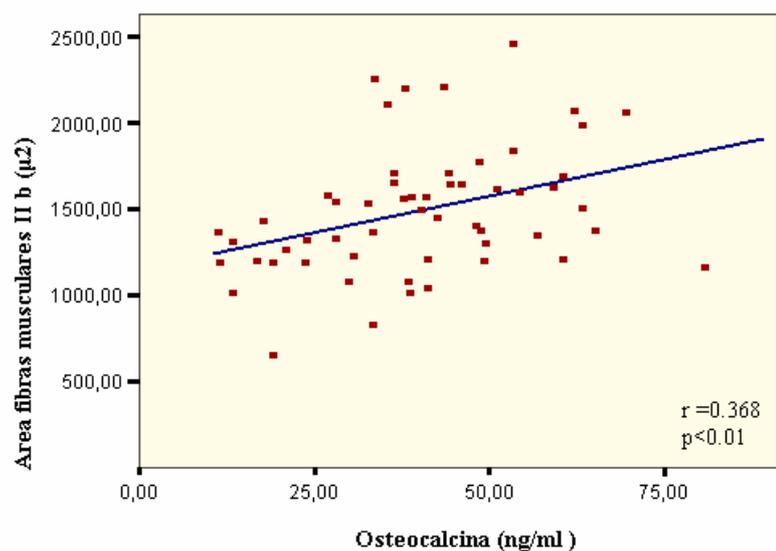
-El IGF-1 ( $r=0.451$ ,  $p<0.001$ ).

- El contenido óseo de zinc ( $r=0.340$ ,  $p<0.01$ ).
- La vitamina D ( $r=0.397$ ,  $p<0.001$ ).
- El área de las fibras musculares tipo II B ( $r=0.368$ ,  $p<0.01$ ) (Fig 45).
- El volumen óseo trabecular y el osteoide como hemos expuesto en sendos apartados.

**Figura 44. Relación osteocalcina-peso final.**



**Figura 45. Relación entre osteocalcina y el área de las fibras musculares tipo II B.**



#### 4.2.3. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS EN ORINA.

##### 4.2.3.1. ACLARAMIENTO URINARIO DE HIDROXIPROLINA.

No encontramos diferencias significativas entre grupos ( $F=1.22$ ,  $p=0.3$ ).

Se relacionó inversamente tras análisis por correlación de la  $r$  de Pearson con la fosfatemia ( $r=-0.239$ ,  $p<0.05$ ). La relación fue directa con:

-El aclaramiento urinario de calcio ( $r=0.402$ ,  $p<0.001$ ).

-El aclaramiento urinario de fósforo ( $r=0.792$ ,  $p<0.001$ ).

##### 4.2.3.2. CALCIO CORREGIDO POR CREATININA.

Apreciamos diferencias significativas por grupos ( $F=2.84$ ,  $p=0.012$ ).

Los grupos de ratas alcohólicas-malnutridas fueron las que presentaron mayor aclaramiento urinario de calcio.

El test de análisis de la varianza de dos vías mostró un efecto independiente de la malnutrición sobre las concentraciones urinarias de calcio ( $F=10.48$ ,  $p<0.01$ ) y un efecto del alcohol sobre esta variable con tendencia a la significación estadística ( $F=3.92$ ,  $p=0.052$ ).

Tras análisis por correlación de Pearson hallamos una relación directa entre el aclaramiento de calcio y:

-El aclaramiento urinario de fósforo ( $r=0.312$ ,  $p<0.01$ ).

-El aclaramiento urinario de magnesio ( $r=0.528$ ,  $p<0.001$ ).

-El aclaramiento urinario de hidroxiprolina (ya comentado).

La relación de esta variable fue inversa con: el osteoide ( $r=-0.263$ ,  $p<0.05$ ), el peso final ( $r=-0.423$ ,  $p<0.001$ ) y la osteocalcina ( $r=-0.453$ ,  $p<0.001$ ).

##### 4.2.3.3. FÓSFORO CORREGIDO POR CREATININA.

No apreciamos diferencias significativas entre grupos ( $F=0.76$ ,  $p=0.61$ ).

Cuando analizamos las correlaciones por el test de Pearson observamos que el aclaramiento de fósforo se relacionó con los niveles de hidroxiprolina en orina ( $r=0.792$ ,  $p<0.001$ ) y los de IGF-1 ( $r=0.248$ ,  $p<0.05$ ) de manera directa y de manera inversa con el fósforo sérico ( $r=-0.335$ ,  $p<0.01$ ).

##### 4.2.3.4. MAGNESIO CORREGIDO POR CREATININA.

No observamos diferencias entre los grupos de estudio ( $F=0.90$ ,  $p=0.51$ ).

En el test de correlación de Pearson observamos relación directa con el calcio en orina.

#### 4.2.4. OLIGOELEMENTOS EN HUESO.

##### 4.2.4.1. ZINC ÓSEO.

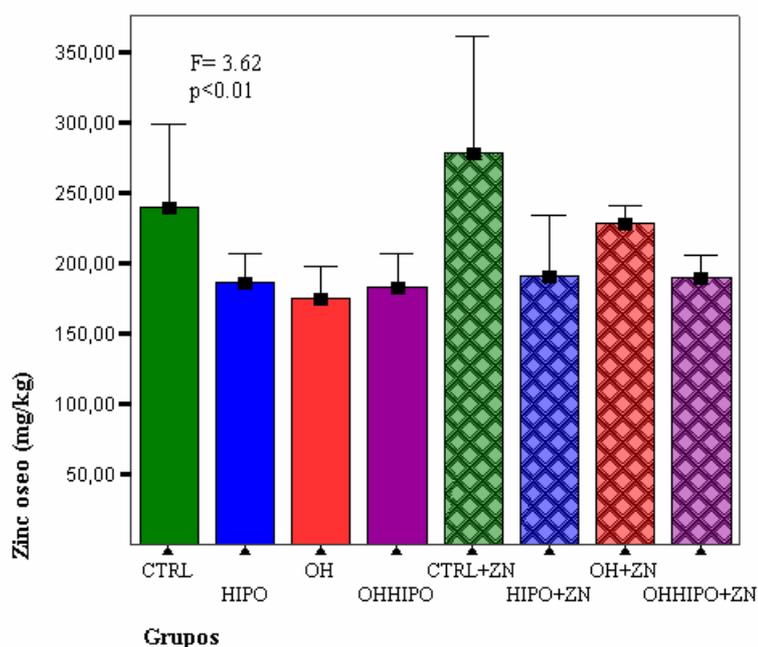
Los valores de zinc en hueso fueron distintos entre grupos ( $F=3.62$ ,  $p<0.01$ ) (Fig. 46).

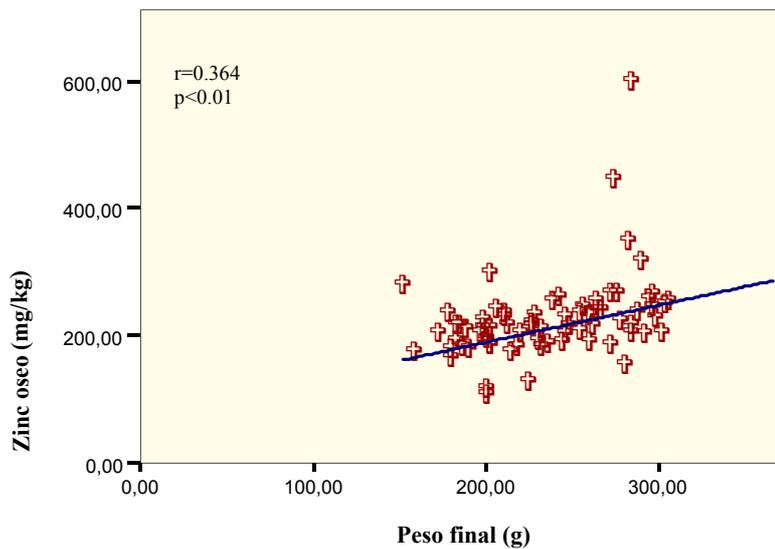
El contenido óseo de zinc más bajo lo presentaron los grupos malnutridos con o sin alcohol en las dietas y sobre todo aquellos grupos que no llevaron suplementos de Zn. Apreciamos diferencias claras entre el grupo control con zinc y los grupos: alcohólicos-malnutridos, malnutridos y alcohólico sin zinc.

Pudimos apreciar sobre el contenido óseo de zinc un efecto independiente del alcohol ( $F=5.57$ ,  $p<0.05$ ) y la malnutrición ( $F=10.83$ ,  $p<0.01$ ), disminuyéndolo y del zinc ( $F=4.3$ ,  $p<0.05$ ), aumentándolo.

El contenido de zinc en hueso se relacionó de forma directa con el peso final ( $r=0.364$ ,  $p<0.01$ ) (Fig. 47), y con la osteocalcina y el IGF-1.

**Figura 46. Concentraciones medias de zinc óseo.**



**Figura 47. Relación entre el zinc óseo y el peso final.**

#### 4.2.5. HORMONAS.

##### 4.2.5.1. PTH.

Tras análisis de la varianza no objetivamos diferencias con significación estadística entre grupos ( $F= 0.485$ ,  $p= 0.84$ ).

Los niveles séricos de PTH correlacionaron de manera directa con:

- La albúmina sérica ( $r=0.297$ ,  $p=0.011$ ).
- La calcemia ( $r=0.377$ ,  $p<0.001$ ).
- La fosfatemia ( $r=0.409$ ,  $p<0.001$ ).
- La magneemia ( $r=0.350$ ,  $p<0.01$ ).
- La corticosterona de forma inversa ( $r=-0.234$ ,  $p<0.05$ ).

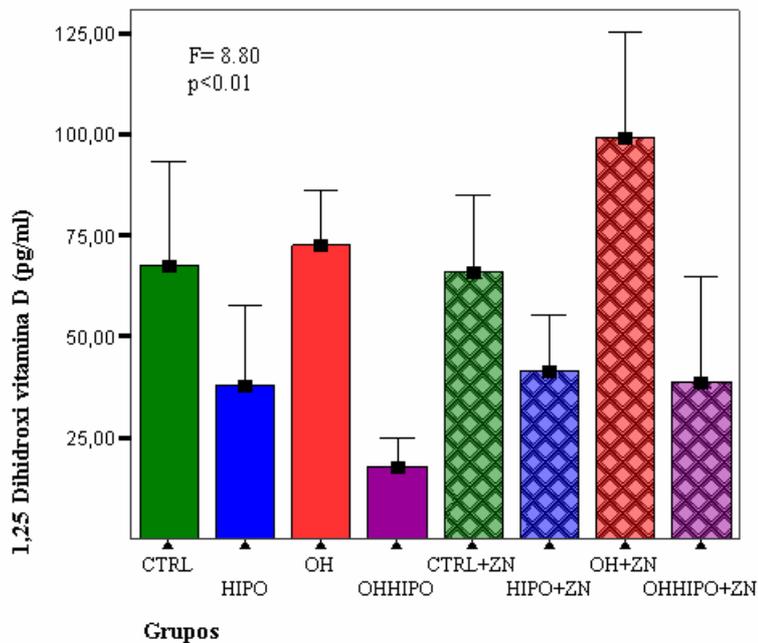
##### 4.2.5.2. 1, 25 DIHIDROXIVITAMINA D.

Apreciamos diferencias significativas ( $F=8.80$ ,  $p<0.01$ ) entre los distintos grupos (Fig. 48).

Las ratas malnutridas con alcoholismo o no asociado tenían los valores más bajos y las sólomente alcohólicas los más elevados. El análisis estadístico posterior puso de manifiesto que eran diferentes de manera estadísticamente significativa el grupo de

alcohólicas-malnutridas frente al grupo de las alcohólicas con suplementos dietéticos de zinc.

**Figura 48. Valores medios de vitamina D.**



Observamos sobre esta variable un efecto independiente de la malnutrición ( $F=44.23$ ,  $p<0.01$ ). Había una interacción negativa alcoholismo y malnutrición ( $F=5.60$ ,  $p<0.05$ ), así como un efecto positivo del zinc con tendencia a la significación estadística ( $F=3.74$ ,  $p=0.057$ ).

En el análisis de correlación por la  $r$  de Pearson objetivamos correlación de los valores de vitamina D con:

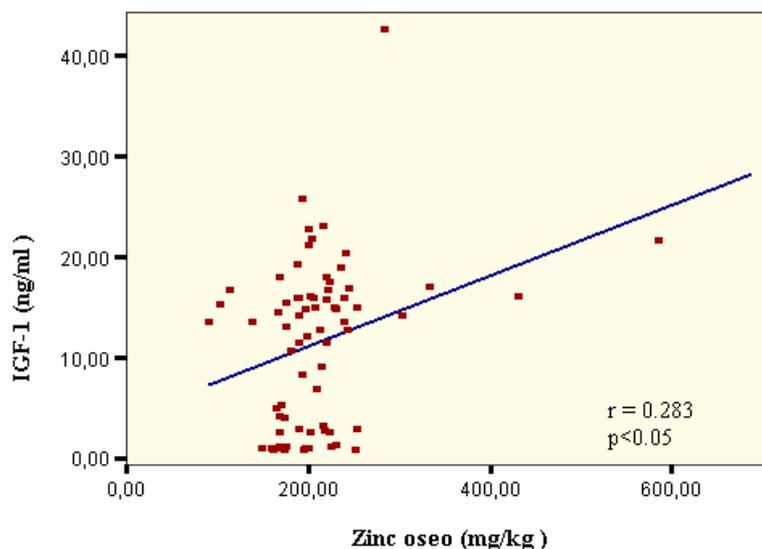
- El peso final ( $r=0.589$ ,  $p<0.001$ ) de manera directa.
- La albúmina ( $r=0.355$ ,  $p<0.01$ ) también directamente.
- El área de la fibras musculares tipo II a ( $r=0.368$ ,  $p<0.01$ ) de forma directa.
- El hierro hepático ( $r=-0.472$ ,  $p<0.001$ ) inversamente.
- El osteoide ( $r=0.323$ ,  $p<0.01$ ) y la osteocalcina ( $r=0.397$ ,  $p<0.001$ ).

#### 4.2.5.3. FACTOR DE CRECIMIENTO INSULIN-LIKE 1

Las diferencias que se presentaron entre grupos ya fueron expuestas en el apartado de resultados hormonales en músculo, así como los efectos que ejercían tanto malnutrición como alcoholismo. Aparte de las correlaciones también reflejadas en ese apartado observamos además correlación de el IGF-1 con:

-El contenido de zinc óseo ( $r=0.283$ ,  $p=0.016$ ) directamente (Fig. 49).

**Figura 49. Relación IGF-1 con el contenido óseo de zinc.**



#### 4.2.5.4. TESTOSTERONA

Como expusimos en los resultados del músculo no hallamos diferencias entre grupos.

Tampoco encontramos correlación alguna entre los niveles séricos de testosterona y ninguna de las variables referidas al hueso: ni histomorfométricas, ni del metabolismo calciofosfórico ni con el contenido en oligoelementos.

#### 4.2.5.5. CORTICOSTERONA

No existían diferencias entre grupos.

Tras análisis de correlaciones, los niveles séricos de corticosterona se relacionaron inversamente con los valores de PTH ( $r=-0.234$ ,  $p=0.047$ ).

A continuación, en la siguiente tabla, pasamos a detallar los resultados correspondientes a los distintos grupos de estudio en relación con los marcadores de formación y reabsorción ósea.

**Tabla 10. Concentración de los distintos marcadores de formación y reabsorción óseas.**

<b>GRUPOS</b>		<b>PTH (pg/ml)</b>	<b>VITAMINA D (pg/ml)</b>	<b>OSTEOCALCINA (ng/ml)</b>	<b>HIDROXIPROLINA/ CREATININA (%)</b>
<b>CTRL.</b>	Media	109.97	67.66	49.46	0.51
	Desv tip	148.08	33.12	4.91	0.14
<b>HIPO</b>	Media	75.41	37.83	21.22	1.12
	Desv tip	45.78	27.99	2.10	1.69
<b>OH</b>	Media	75.90	72.50	43.22	0.73
	Desv tip	29.98	12.97	10.64	0.21
<b>OHHIPO</b>	Media	88.08	17.75	20.77	0.82
	Desv tip	67.49	9.01	9.11	0.59
<b>CTRL. + ZN</b>	Media	61.08	66.10	58.24	0.50
	Desv tip	54.91	26.40	11.66	0.27
<b>HIPO + ZN</b>	Media	78.55	41.30	41.93	0.95
	Desv tip	62.86	19.51	9.14	0.97
<b>OH + ZN</b>	Media	91.37	99.00	41.01	1.68
	Desv tip	47.13	36.79	13.29	2.15
<b>OHHIPO + ZN</b>	Media	105.26	38.71	20.99	1.18
	Desv tip	35.97	28.25	7.98	0.52
<b>F</b>		0.485	8.803	16.620	1.220
<b>P</b>		0.842	<0.001	<0.001	0.304
<b>Diferencias Ad libitum control</b>	T	0.422	2.555	-5.416	0.098
	p	0.680	0.031	<0.001	0.923

### 4.3. HÍGADO.

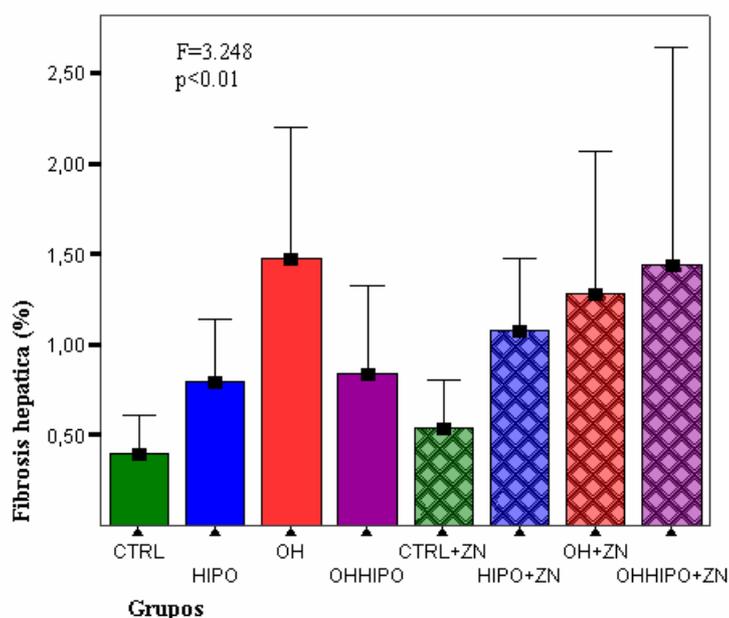
#### 4.3.1. HISTOMORFOMETRÍA.

##### 4.3.1.1. FIBROSIS HEPÁTICA.

La presencia de fibrosis hepática era diferente de manera significativa en los distintos grupos analizados ( $F=3.248$ ,  $p<0.01$ ) (Fig. 50).

Los grupos de ratas alcohólicas y alcohólicas-malnutridas fueron los que presentaron mayor cantidad de ésta y dentro de estos 4 grupos, aquellos cuyas dietas habían sido suplementadas con zinc, presentaban más fibrosis que los que no, salvo para el grupo de ratas alcohólicas exclusivamente.

**Figura 50. Porcentaje de fibrosis hepática en los distintos grupos.**



El análisis de la varianza de dos vías mostró un efecto independiente del alcohol sobre esta variable ( $F=12.355$ ,  $p<0.001$ ) y una interacción alcohol malnutrición ( $F=5.294$ ,  $p=0.025$ ).

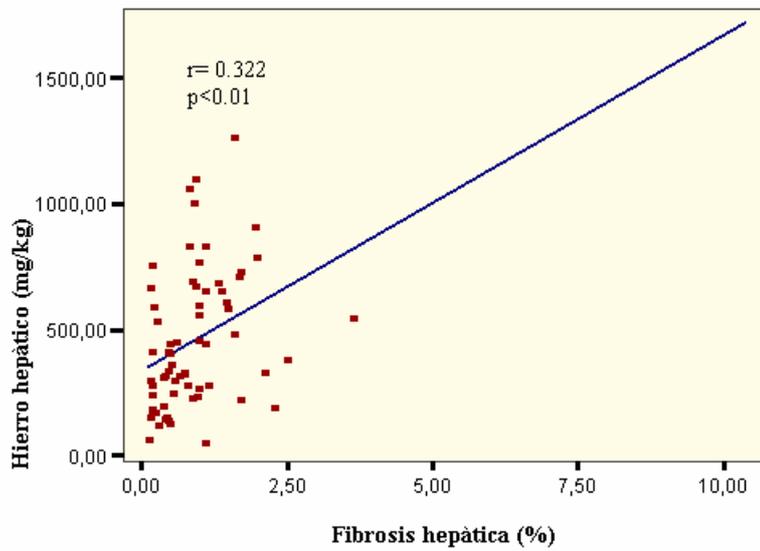
La presencia de fibrosis hepática se relacionó tras el análisis de Pearson de manera directa con:

- El hierro hepático ( $r=0.322$ ,  $p<0.01$ ) (Fig. 51).
- La concentración hepática de cobre ( $r=0.277$ ,  $p<0.05$ ).

-La cantidad de zinc en el hígado ( $r= 0.342$ ,  $p<0.01$ ).

-El selenio hepático ( $r= 0.316$ ,  $p<0.05$ ).

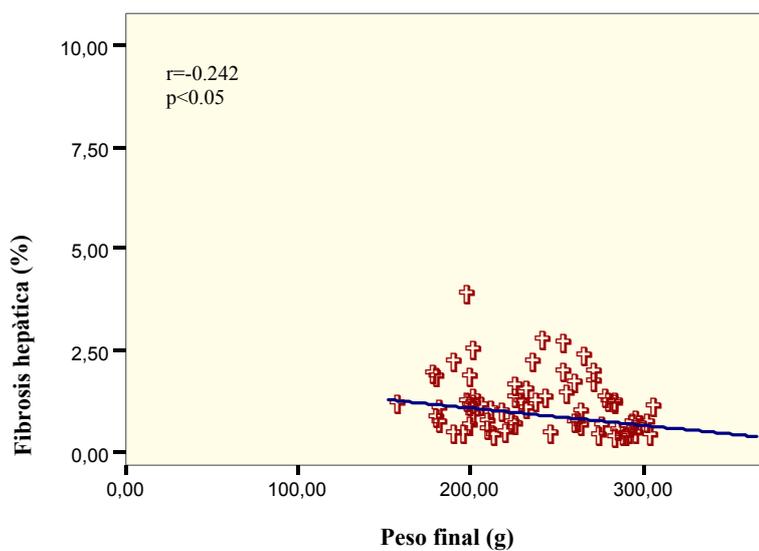
**Figura 51. Relación entre fibrosis hepática y contenido hepático de hierro.**



La relación entre fibrosis hepática y las siguientes variables fue inversa:

-Peso final del animal ( $r= -0.242$ ,  $p<0.05$ ) (Fig. 52).

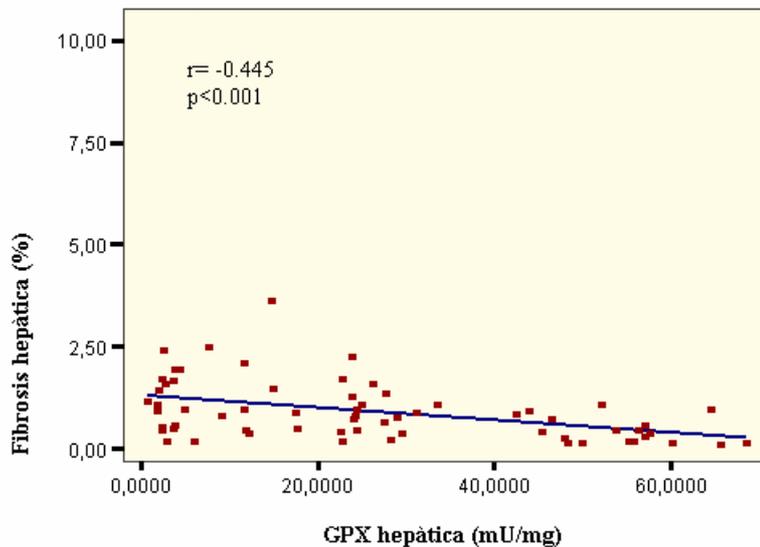
**Figura 52. Relación entre fibrosis hepática y peso final.**



-Actividad de la GPX hepática ( $r = -0.445$ ,  $p < 0.001$ ) (Fig. 53).

-El área de las fibras musculares tipo I ( $r = -0.262$ ,  $p < 0.05$ ).

**Figura 53. Relación fibrosis hepática-actividad de la glutatiónperoxidasa hepática.**



#### 4.3.1.2. GRASA HEPÁTICA.

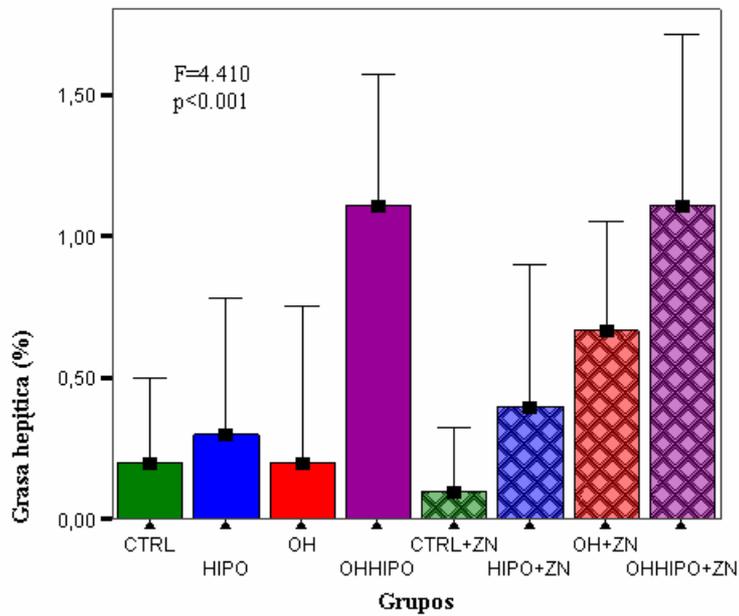
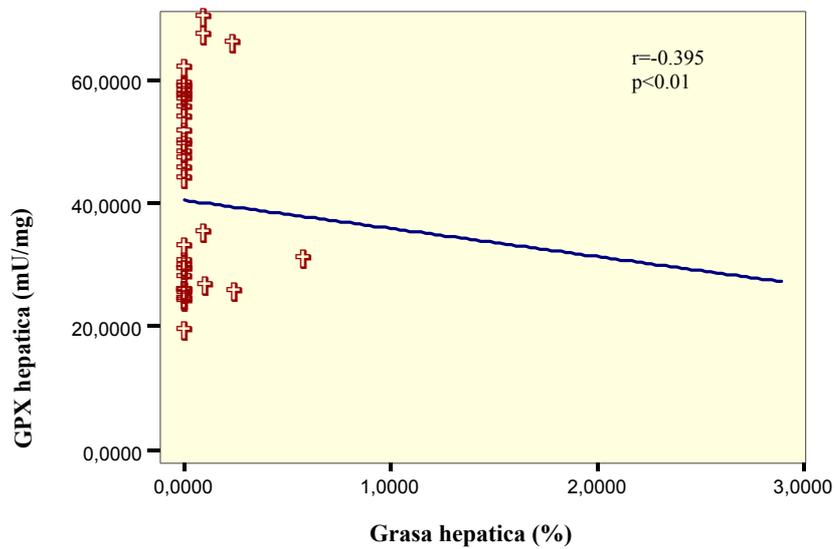
Encontramos diferencias entre grupos con significación estadística al analizar la cantidad de grasa presente en el hígado de nuestros animales ( $F = 4.410$ ,  $p < 0.001$ ) (Fig. 54).

Cuando analizamos las diferencias observamos que los dos grupos de ratas alcohólicas-malnutridas (en los que mayor cantidad de grasa se cuantificaba) eran diferentes a los dos grupos controles y a los grupos de ratas alcohólicas sin zinc y malnutridas sin zinc.

Sobre esta variable ejercían un efecto independiente el alcohol ( $F = 13.867$ ,  $p < 0.001$ ) y la malnutrición ( $F = 9.794$ ,  $p < 0.01$ ).

La cantidad de grasa en el hígado se relacionó de forma inversa con:

- El peso final ( $r = -0.407$ ,  $p < 0.001$ ).
- EL IGF-1 ( $r = -0.367$ ,  $p < 0.01$ )
- La osteocalcina ( $r = -0.410$ ,  $p < 0.001$ ).
- La actividad de la GPX hepática ( $r = -0.395$ ,  $p < 0.01$ ) (Fig. 55).

**Figura 54. Cantidad de grasa hepática por grupos.****Figura 55. Relación entre grasa hepática y actividad de la GPX hepática.**

#### 4.3.2. DETERMINACIONES ENZIMÁTICAS.

##### 4.3.2.1. SUPERÓXIDODISMUTASA HEPÁTICA (SODh).

No hubo diferencias intergrupales con significación estadística cuando analizamos la actividad de la SODh ( $F=0.747$ ,  $p=0.633$ ).

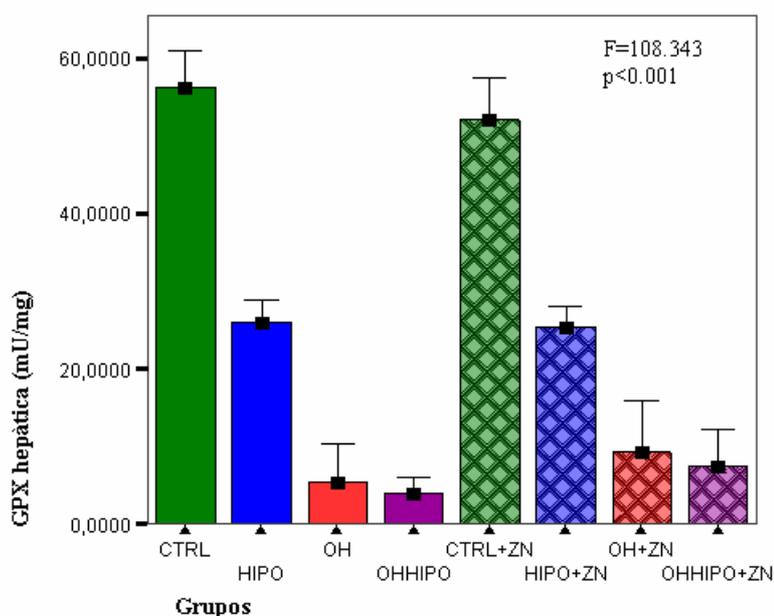
La actividad de esta enzima en el hígado no se relacionó con ninguna de las variables hepáticas estudiadas y sólo apreciamos una tendencia a relacionarse de manera inversa con la actividad de la GPXh ( $r=-0.228$ ,  $p=0.058$ ).

##### 4.3.2.2. GLUTATIONPEROXIDASA HEPÁTICA (GPXh).

La actividad de la GPXh, sin embargo, sí era diferente por grupos de manera significativa ( $F=108.343$ ,  $p<0.001$ ) (Fig. 56).

El análisis post hoc puso de manifiesto que la actividad de esta enzima estaba descendida de manera significativa en las ratas alcohólicas y alcohólicas-malnutridas con y sin suplementos de zinc, frente al resto de los grupos. También las ratas malnutridas exclusivamente se diferenciaban claramente de los dos grupos de ratas control. Estos últimos fueron los que presentaron una mayor actividad de la GPXh.

**Figura 56. Actividad de la GPX hepática media por grupos.**



El análisis de varianza de dos vías confirmaba un efecto independiente del alcohol ( $F=524.778$ ,  $p<0.001$ ) y de la malnutrición ( $F=105.90$ ,  $p<0.001$ ), ambas disminuyendo la actividad de la enzima y la existencia de una interacción sinérgica alcohol-malnutrición ( $F= 85.321$ ,  $p<0.001$ ) y también una interacción negativa alcohol-zinc ( $F=4.45$ ,  $p<0.05$ ).

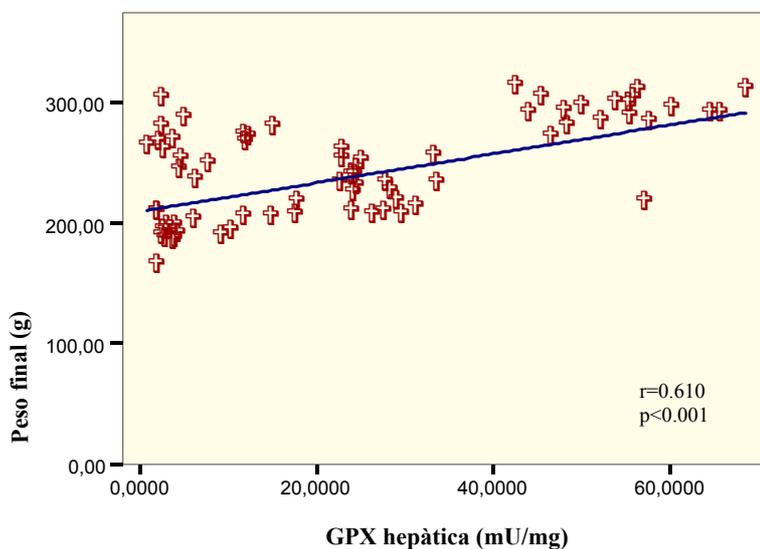
La actividad de la GPXh se relaciono directamente, tras hacer el análisis por la r de Pearson con:

- La albúmina ( $r= 0.240$ ,  $p<0.05$ ).
- El MLDh ( $r= 0.283$ ,  $p=0.016$ ) (Fig. 59).
- El peso final del animal ( $r= 0.610$ ,  $p<0.001$ ) (Fig. 57).

La relación fue inversa con:

- La concentración hepática de manganeso ( $r=-0.266$ ,  $p<0.05$ ).
- El hierro ( $r=-0.520$ ,  $p<0.001$ ).
- La concentración hepática de zinc ( $r=-0.279$ ,  $p<0.05$ ).
- El selenio ( $r=-0.547$ ,  $p<0.001$ ).

**Figura 57. Relación entre el peso final y la actividad de la GPXh.**

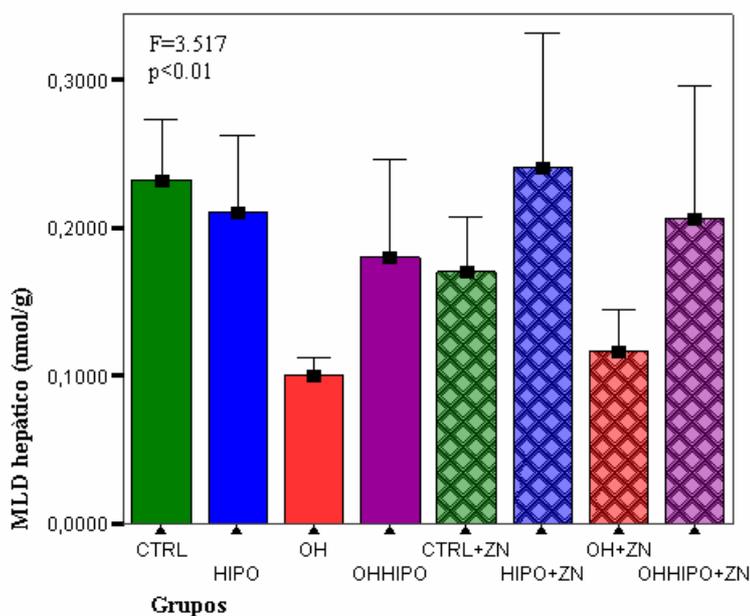


En la tabla 11 se exponen los valores correspondientes a la actividad de los sistemas antioxidantes y los productos de la peroxidación lipídica.

4.3.2.3. PRODUCTOS DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA (MLDh)

Las concentraciones de malonildialdehido hepático también fueron diferentes de manera significativa entre los grupos ( $F=3.517$ ,  $p<0.01$ ) (Fig. 58).

**Figura 58. Media de malonildialdehido por grupos.**



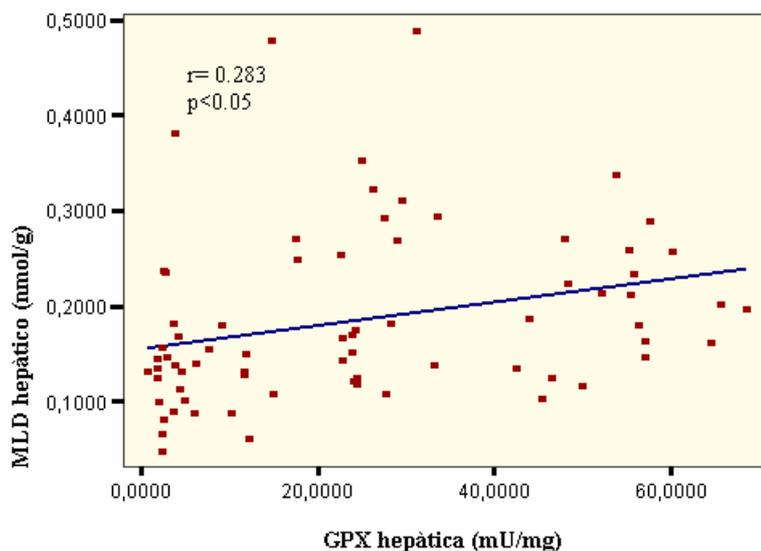
Las ratas alcohólicas y alcohólicas-malnutridas presentaron los valores más bajos pero el análisis estadístico posterior sólo mostró como diferentes los dos grupos de ratas alcohólicas frente al grupo de ratas control sin zinc y el grupo de ratas malnutridas con zinc.

Tanto el alcohol como la malnutrición mostraron un efecto independiente sobre esta variable ( $F=11.127$ ,  $p<0.01$ ) y ( $F=8.31$ ,  $p<0.01$ ) respectivamente, ambos la disminuyen.

La concentración de MLDh se relacionó inversamente con la concentración de manganeso hepático ( $r=-0.246$ ,  $p<0.05$ ) y la de selenio hepático ( $r=-0.301$ ,  $p<0.05$ ) y hubo una tendencia a la relación también inversa con el zinc hepático ( $r=-0.226$ ,  $p=0.058$ ).

Apreciamos una relación directa entre MLDh y actividad de la GPXh (Fig. 59).

**Figura 59. Relación entre actividad de la GPXh y productos de la peroxidación lipídica.**



**Tabla 11. Actividades de la SOD y GPX hepáticas (SODh y GPXh) y concentraciones de malonildialdehido hepático (MLDh).**

GRUPOS		SODh (IU/mg)	GPXh (mU/mg)	MLDh (nmol/g)
CTRL.	Media	16.353	56.245	0.2326
	Desv tip	6.999	6.636	0.0570
HIPO	Media	22.580	26.076	0.2106
	Desv tip	8.092	3.771	0.0673
OH	Media	24.838	5.398	0.0998
	Desv tip	26.436	4.816	0.0114
OHHIPO	Media	35.275	3.991	0.1798
	Desv tip	42.239	2.465	0.0859
CTRL. + ZN	Media	24.242	52.097	0.1701
	Desv tip	11.433	7.513	0.0519
HIPO + ZN	Media	25.819	25.390	0.2412
	Desv tip	6.322	3.686	0.1260
OH + ZN	Media	27.492	9.257	0.1160
	Desv tip	17.572	9.379	0.0399
OHHIPO + ZN	Media	21.401	7.594	0.2057
	Desv tip	13.087	5.971	0.1166
F		0.747	108.343	3.517
	P	0.633	<0.001	0.003
Diferencias ad libitum control	T	2.383	0.654	2.489
	p	0.033	0.525	0.027

#### 4.3.3. OLIGOELEMENTOS HEPÁTICOS.

Las concentraciones medias, por grupos de estudio, de los distintos oligoelementos medidos en tejido hepático quedan expuestas en la siguiente tabla (tabla 12).

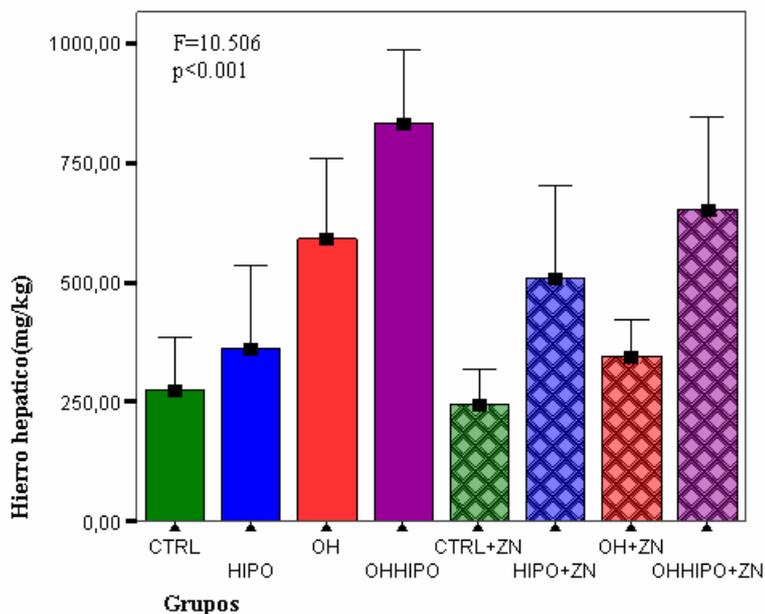
**Tabla 12. Concentraciones medias de oligoelementos en tejido hepático.**

GRUPOS		MANGANESO (mg/kg)	HIERRO (mg/kg)	SELENIO (mg/kg)	COBRE (mg/kg)	ZINC (mg/kg)
CTRL.	Media	4.1400	276.0940	125.3367	6.6330	58.4177
	Desv tip.	3.4352	153.1772	105.0278	3.5360	52.2503
HIPO	Media	2.9780	362.9470	32.3200	5.3490	44.3960
	Desv tip.	2.7732	242.1863	22.8555	3.3998	30.3449
OH	Media	9.5080	590.5600	932.5500	10.0618	104.7300
	Desv tip.	0.6455	1364426	305.5158	0.9962	8.2789
OHHIPO	Media	8.1900	831.4636	331.1114	7.2209	78.2040
	Desv tip.	1.2516	233.0296	118.7270	2.7219	15.4101
CTRL. + ZN	Media	6.1234	244.0900	209.1289	7.2410	67.5021
	Desv tip.	7.7950	102.4804	142.2325	3.5983	44.5198
HIPO + ZN	Media	3.6430	508.7100	154.2783	7.0960	95.7880
	Desv tip.	1.8425	269.1557	196.2409	2.8558	43.0223
OH + ZN	Media	6.3000	345.4700	589.5000	7.6800	94.0860
	Desv tip.	0.8691	108.4684	332.1011	1.8332	15.2735
OHHIPO + ZN	Media	6.1056	652.4778	477.3714	6.0667	72.2456
	Desv tip.	2.1599	251.6079	214.1936	2.4297	27.2239
TOTAL	Media	5.6590	471.2575	294.6188	6.9911	75.1054
	Desv tip.	3.8598	277.4372	292.4370	2.9664	37.5675
F		3.388	10.506	14.702	1.518	3.058
p		0.004	<0.001	<0.001	0.176	0.008
DIFERENCIAS AD LIBITUM Y CONTROLES	T	0.466	1.102	-2.202	-1.348	0.187
	p	0.649	0.290	0.048	0.201	0.855

##### 4.3.3.1. HIERRO HEPÁTICO

Al analizar las concentraciones de este oligoelemento en el hígado encontramos que existían diferencias estadísticamente significativas intergrupales ( $F=10.506$ ,  $p<0.001$ ) (Fig. 60).

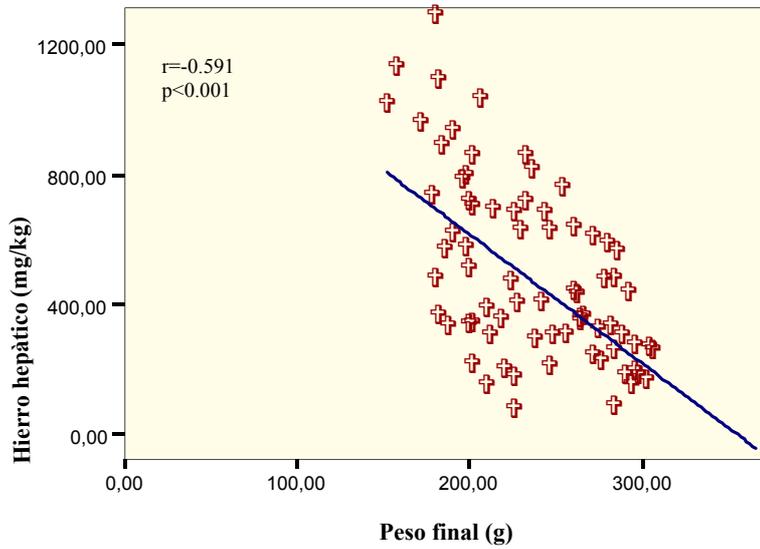
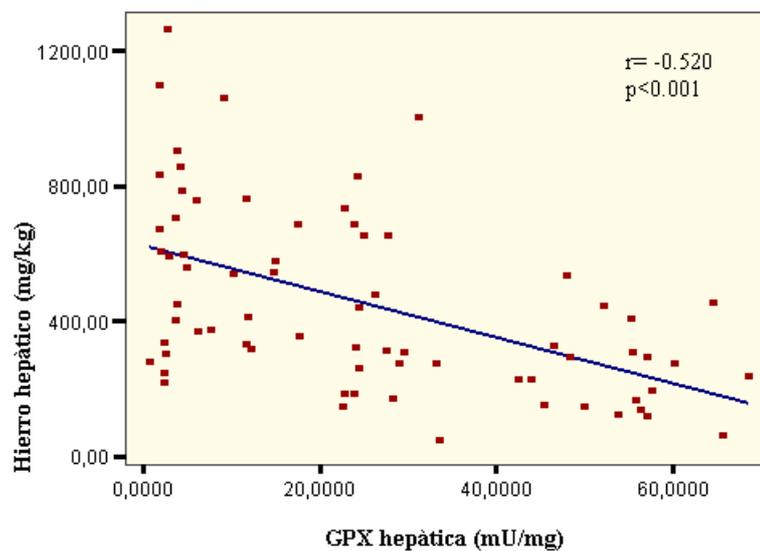
Los dos grupos de ratas alcohólicas-malnutridas tenían las concentraciones hepáticas de hierro más elevadas y el análisis post hoc las diferenció de los grupos control y de las alcohólicas con zinc y de las exclusivamente malnutridas sin zinc. Además los grupos con suplementos dietéticos de zinc tenían concentraciones más bajas de hierro con respecto a sus homólogos.

**Figura 60. Concentraciones hepáticas de hierro.**

El análisis de la varianza de dos vías puso de manifiesto un efecto independiente tanto del alcohol ( $F=26.335$ ,  $p<0.001$ ) como de la malnutrición ( $F=19.986$ ,  $p<0.001$ ) sobre esta variable y también se constató una interacción inversa zinc-alcohol ( $F=6.832$ ,  $p=0.011$ ).

La cantidad de hierro en hígado se relacionó directamente con la concentración hepática del resto de los oligoelementos: manganeso ( $r=0.383$ ,  $p<0.001$ ), cobre ( $r=0.543$ ,  $p<0.001$ ), zinc ( $r=0.481$ ,  $p<0.001$ ), selenio ( $r=0.430$ ,  $p<0.001$ ) y con la fibrosis (Fig. 51).

Además el hierro hepático se relacionó inversamente con el peso ( $r=-0.591$ ,  $p<0.001$ ) (Fig. 61), con el IGF-1 ( $r=-0.412$ ,  $p<0.001$ ), con la concentración de osteocalcina ( $r=-0.538$ ,  $p<0.001$ ), y además con la GPXh (Fig. 62).

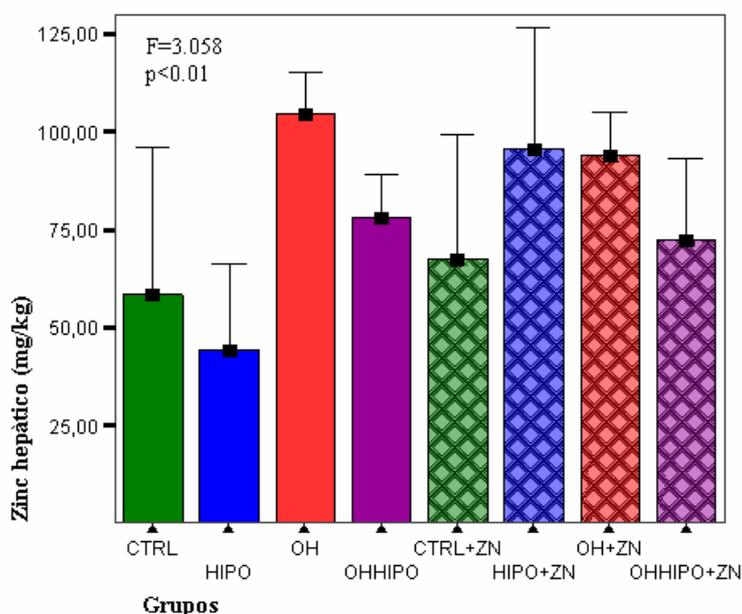
**Figura 61. Relación de la concentración hepática de hierro y el peso final.****Figura 62. Relación hierro hepático-actividad de la glutatiónperoxidasa.**

#### 4.3.3.2. ZINC HEPÁTICO.

Observamos diferencias entre grupos con significación estadística en las concentraciones hepáticas de zinc ( $F=3.058$ ,  $p<0.01$ ) (Fig. 63).

Apreciamos que se diferenciaban significativamente los dos grupos de ratas alcohólicas y el de malnutridas con zinc frente a el grupo de malnutridas sin zinc, cuyas concentraciones hepáticas de este oligoelemento fueron las más bajas.

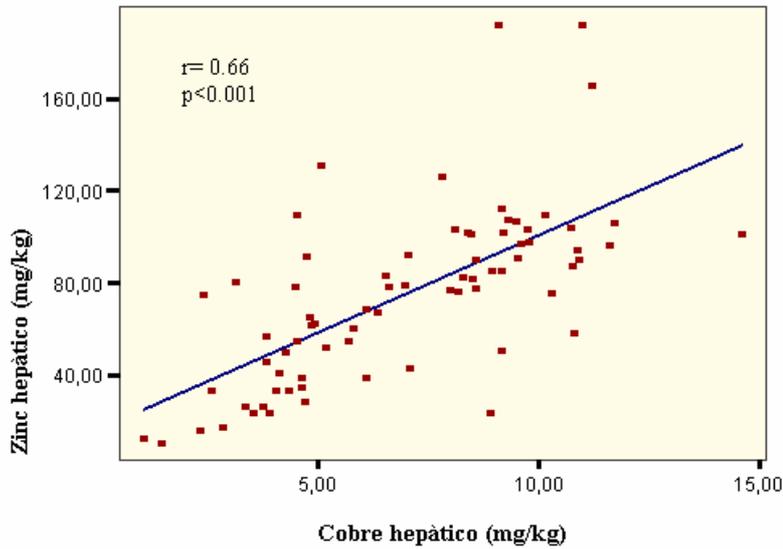
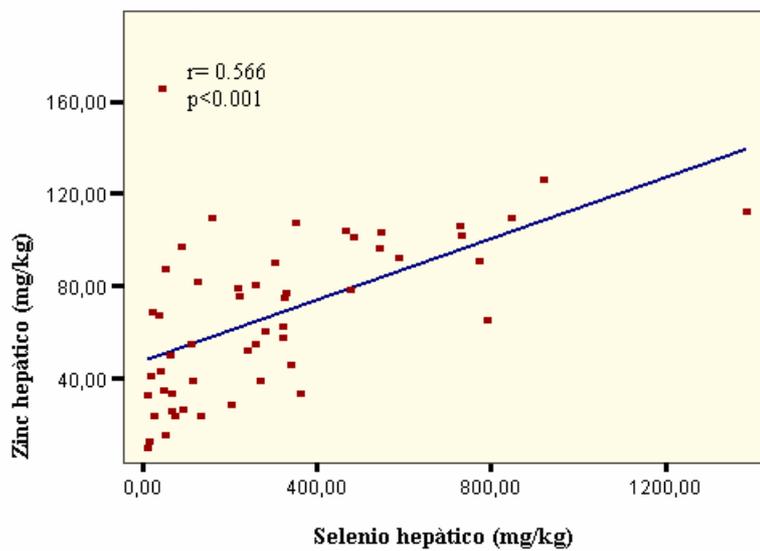
**Figura 63. Concentraciones medias de zinc en hígado por grupos.**



El alcohol tiene un efecto independiente sobre la concentración en el hígado de zinc ( $F=6.027$ ,  $p<0.05$ ), aumentándola y también existe una interacción alcohol-zinc sobre esta variable ( $F= 5.17$ ,  $p<0.05$ ).

El zinc hepático se correlacionó directamente según el test de la  $r$  de Pearson con la concentración del resto de los oligoelementos hepáticos:

- Cobre ( $r=0.66$ ,  $p<0.001$ ) (Fig. 64).
- Hierro (ver apartado previo).
- Manganeso ( $r=0.623$ ,  $p<0.001$ ).
- Selenio ( $r=0.566$ ,  $p<0.001$ ) (Fig. 65).

**Figura 64. Relación de las concentraciones hepáticas de zinc y cobre.****Figura 65. Relación entre las concentraciones de zinc y selenio hepáticos.**

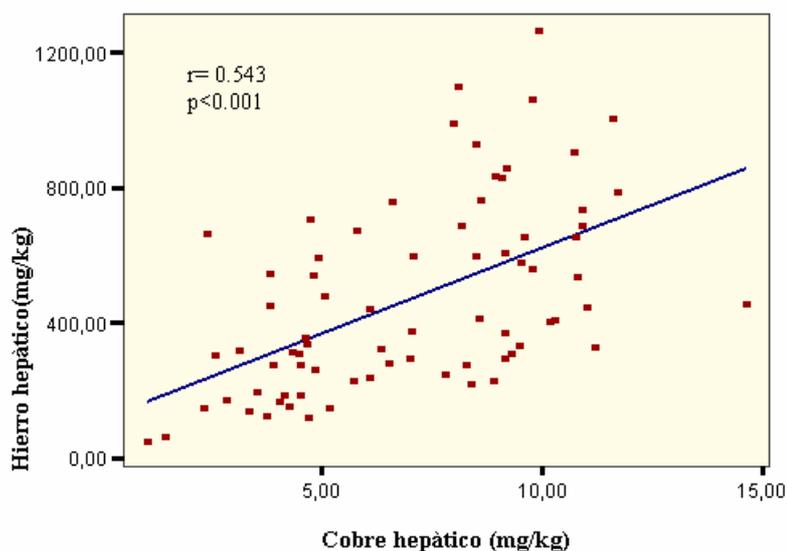
#### 4.3.3.3. COBRE HEPÁTICO.

No se apreciaron diferencias significativas en las concentraciones de cobre en el hígado ( $F = 1.51$ ,  $p = 0.176$ ).

La concentración hepática de cobre se relacionó con la cantidad de fibrosis hepática, la concentración hepática de hierro (Fig. 66) y con el zinc hepático, y además

presentó una relación directa con la albúmina ( $r=0.24$ ,  $p<0.05$ ), con el manganeso ( $r=0.474$ ,  $p<0.001$ ) y con el selenio ( $r=0.416$ ,  $p<0.01$ ).

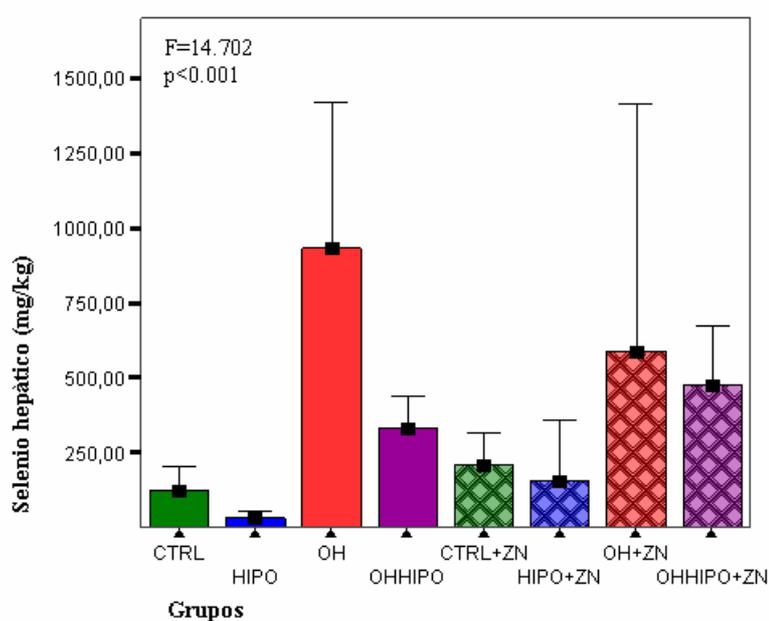
**Figura 66. Relación entre las concentraciones hepáticas de hierro y cobre.**



#### 4.3.3.4. SELENIO HEPÁTICO

Apreciamos que las concentraciones hepáticas de selenio mostraron diferencias entre los grupos analizados ( $F=14.702$ ,  $p<0.001$ ) (Fig. 67).

**Figura 67. Concentraciones media de selenio hepático por grupos.**

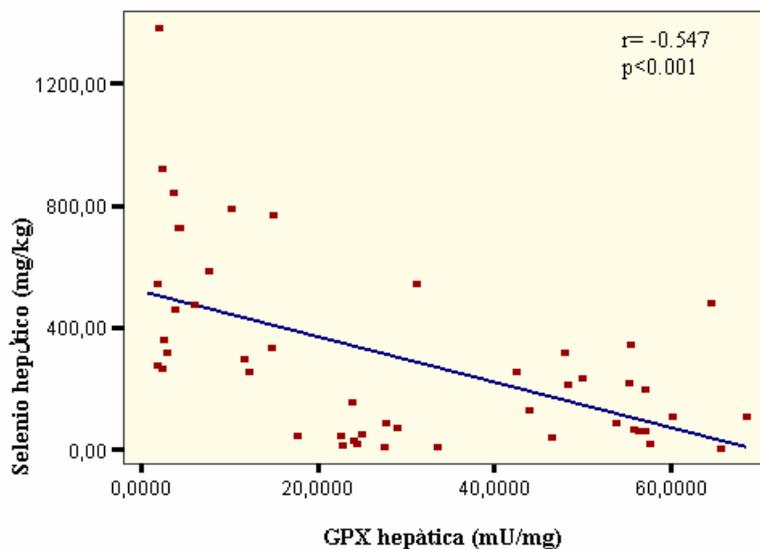


Las ratas alcohólicas, con y sin zinc, y las ratas alcohólicas-malnutridas con zinc fueron significativamente diferentes a los dos grupos controles y los dos grupos malnutridos, presentando los grupos alcohólicos las concentraciones más altas.

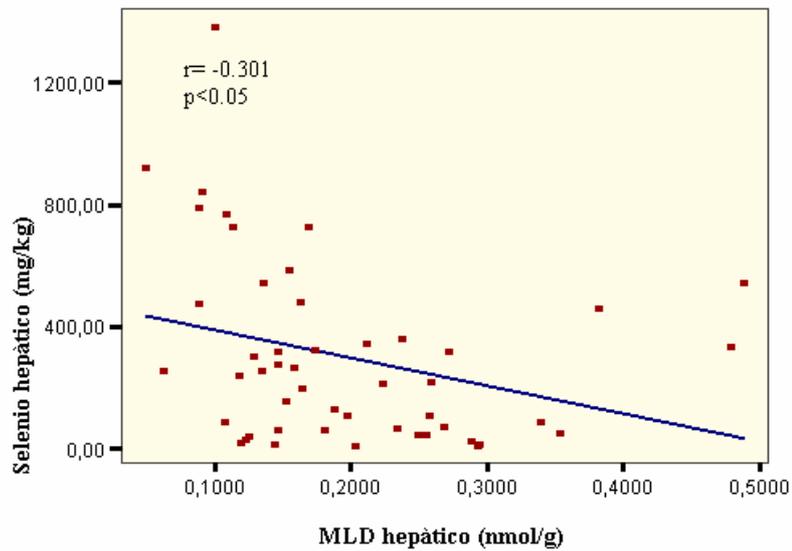
Tras realizar un análisis de la varianza de dos vías se puso de manifiesto un efecto independiente sobre esta variable del alcohol ( $F=78.706$ ,  $p<0.001$ ), la malnutrición ( $F=15.427$ ,  $p<0.001$ ) así como se evidenciaron varias interacciones inversas con significación estadística como: alcohol-malnutrición ( $F=6.302$ ,  $p<0.05$ ), alcohol-zinc ( $F= 4.535$ ,  $p<0.05$ ) y malnutrición-zinc ( $F=5.416$ ,  $p<0.05$ ).

La cantidad de selenio hepático se relacionó de manera directa con la concentración de todos los oligoelementos (expuestas en sus respectivos apartados) y con la cantidad de fibrosis hepática. Esta relación fue inversa con la actividad de la GPXh (Fig. 68) y la concentración de malonildialdehido (Fig. 69).

**Figura 68. Relación entre el selenio hepático y la actividad de la GPXh.**



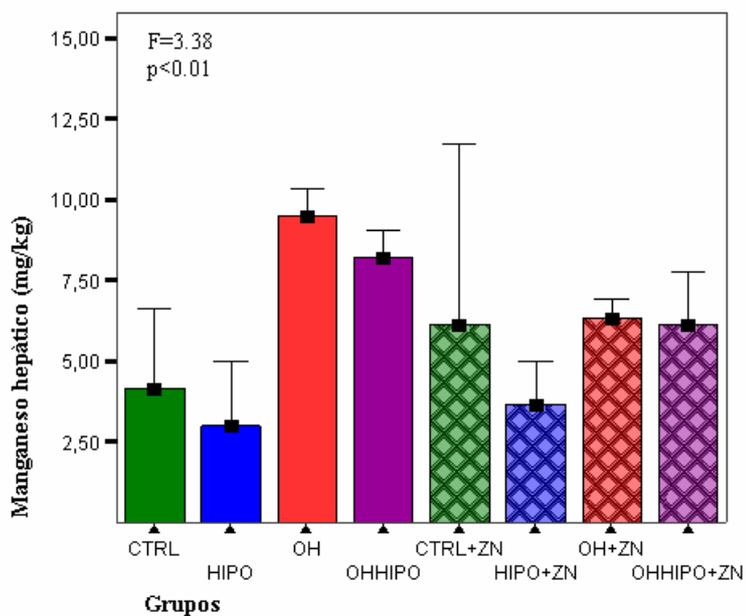
**Figura 69. Relación entre la concentración de selenio hepático con los productos de la peroxidación lipídica.**



#### 4.3.3.5. MANGANESO HEPÁTICO.

Se apreciaron diferencias significativas en el contenido hepático de manganeso ( $F=3.388$ ,  $p<0.01$ ) (Fig. 70).

**Figura 70. Concentraciones medias de manganeso hepático.**



Las ratas alcohólicas y alcohólicas-malnutridas presentaron las concentraciones más elevadas y, dentro de estos cuatro grupos, aquellos cuyas dietas estaban suplementadas con zinc tenían niveles más bajos de selenio.

Cuando se analizó con detalle las diferencias entre los grupos, sin embargo, observamos que sólo se mostraron como diferentes entre sí las ratas alcohólicas sin zinc y las malnutridas sin zinc. El alcohol presentó un efecto independiente sobre esta variable ( $F=15.485$ ,  $p<0.001$ ), así como también es estadísticamente significativa la interacción inversa alcohol-zinc ( $F=5.668$ ,  $p<0.05$ ).

Sus concentraciones hepáticas se relacionaron directamente con la del resto de los oligoelementos y presentó una relación inversa con la GPXh y el MLDh, dichas relaciones han sido comentadas previamente en el capítulo correspondiente a determinaciones enzimáticas en hígado (pg. 145).

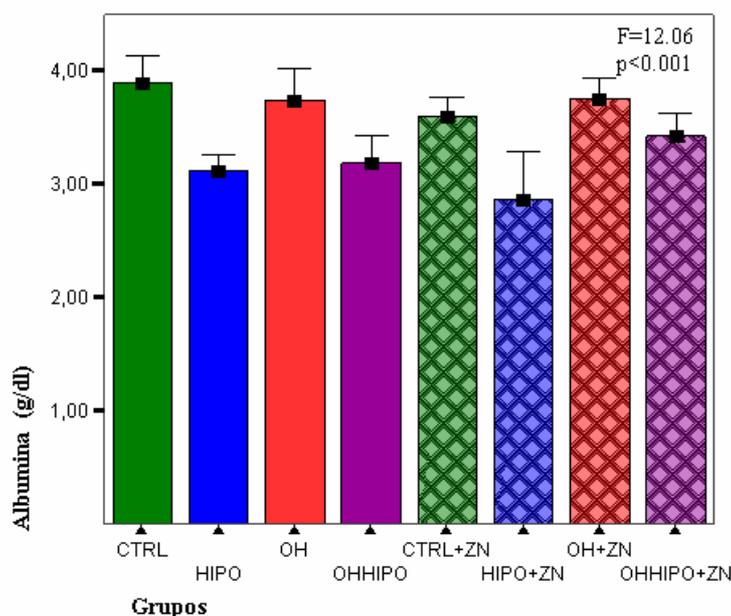
## 4.4. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS

### 4.4.1. ALBÚMINA

Hubo diferencias estadísticamente significativas en los valores de albúmina entre grupos ( $F=12.065$ ,  $p<0.001$ ) (Fig. 71).

Las ratas malnutridas y alcohólicas malnutridas con o sin zinc, presentaron las concentraciones plasmáticas más bajas. El análisis post hoc diferenció de manera significativa a los dos grupos controles y las dos alcohólicas frente a las malnutridas con o sin zinc y las alcohólicas malnutridas sin zinc. Todos los grupos con suplementos dietéticos de zinc presentaban concentraciones más altas de albúmina que sus homólogos.

**Figura 71. Albúmina sérica media por grupos.**



El análisis de la varianza de dos vías puso de manifiesto que tanto la malnutrición ( $F=64.002$ ,  $p<0.001$ ) como el alcohol ( $F=4.37$ ,  $p<0.05$ ), aunque éste menos intensamente, tienen un efecto independiente sobre esta variable. Igualmente existían unas interacciones positivas alcohol-malnutrición ( $F=4.307$ ,  $p<0.05$ ) y alcohol-zinc ( $F=6.960$ ,  $p=0.01$ ).

La albúmina sérica se relaciona directamente con:

-El peso final, el cobre hepático, la GPXh y la GPXm, el área de las fibras musculares tipo I, II A y II B, el cobre y la calcemia, la fosfatemia, la magnesemia, la PTH y la vitamina D.

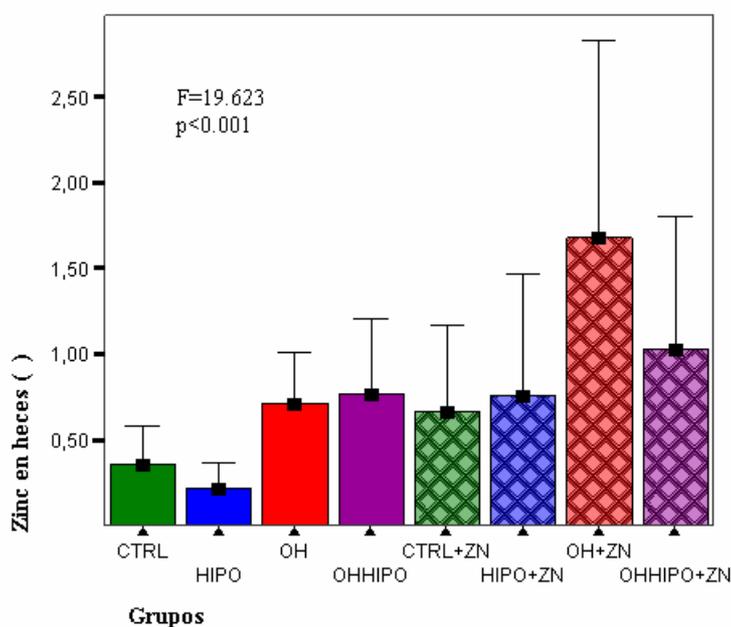
La albúmina sérica se relaciona de forma negativa con el IGF-1.

#### 4.4.2. ZINC EN HECES

Al analizar la cantidad de zinc que contenían las heces de los animales apreciamos diferencias intergrupales con significación estadística ( $F=19.623$ ,  $p<0.001$ ) (Fig.72).

Los grupos de ratas alcohólicas y alcohólicas malnutridas, con y sin suplementos dietéticos de zinc fueron las que presentaron mayor excreción fecal de zinc. Estos cuatro grupos, se diferenciaron claramente de las ratas controles con zinc y malnutridas con zinc, que a su vez también se diferenciaron de sus homólogos sin zinc. Estos últimos dos grupos eran los que menor excreción presentaron.

**Figura 72. Excreción fecal de zinc.**



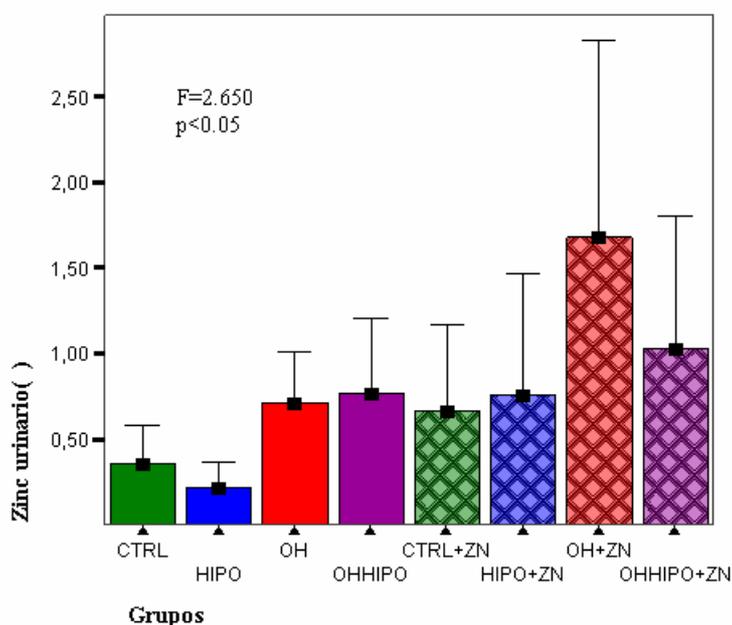
El análisis de la varianza de dos vías mostró un efecto independiente del alcohol ( $F=108.391$ ,  $p<0.001$ ) y del zinc ( $F=8.477$ ,  $p<0.01$ ) sobre esta variable, ambos aumentando la excreción, al igual que una interacción positiva significativa alcohol-zinc ( $F=11.643$ ,  $p=0.001$ ).

#### 4.4.3. ZINC EN ORINA

La excreción urinaria de zinc también fue distinta por grupos ( $F=2.65$ ,  $p=0.017$ ) (Fig. 73).

Aunque los grupos con suplementos dietéticos de zinc tendían a ser los que mayor zincuria presentaban y también los alcohólicos-malnutridos, el análisis ulterior sólo puso de manifiesto como realmente diferentes al grupo de alcohólicas con zinc frente a las controles y malnutridas ambas sin zinc.

**Figura 73. Eliminación urinaria de zinc.**



Tanto el alcohol como el suplemento con zinc tienen un efecto independiente sobre esta variable, ( $F=7.579$ ,  $p<0.001$ ) y ( $F=5.978$ ,  $p<0.01$ ) respectivamente, aumentando su excreción.

#### 4.4.4. CREATINFOSFOQUINASA (CPK).

No encontramos diferencias con significación estadística intergrupales.

#### 4.4.5. LACTATODESHIDROGENASA (LDH).

Tampoco nuestros grupos fueron distintos entre sí respecto a los valores de LDH encontrados.

## 4.5.PESO

A continuación pasamos a detallar los pesos iniciales y finales de los animales objeto de nuestro estudio (Tabla 13).

**Tabla 13. Relación de pesos de los animales por grupos al inicio y la finalización del estudio.**

GRUPOS		PESO INICIAL (g)	PESO FINAL (g)
CTRL.	Media	298.60	287.77
	Desv tip	10.06	10.97
HIPO	Media	302.80	227.20
	Desv tip	13.43	15.03
OH	Media	297.66	260.66
	Desv tip	3.88	15.21
OHHIPO	Media	298.00	187.27
	Desv tip	5.21	16.88
CTRL. + ZN	Media	294.00	280.20
	Desv tip	11.77	27.10
HIPO + ZN	Media	296.40	217.60
	Desv tip	14.10	16.48
OH + ZN	Media	296.20	257.80
	Desv tip	4.36	18.70
OHHIPO + ZN	Media	298.44	185.77
	Desv tip	4.33	13.01
F		0.700	48.888
P		0.672	<0.001
Diferencias Ad libitum control	T	-0.806	-6.304
	p	0.435	<0.001

### 4.5.1.PESO INICIAL

La media del peso al inicio del experimento de nuestros animales fue de 297.76 g. y no hubo diferencias con significación estadística a este respecto (F=0.700, p=0.672).

### 4.5.2.PESO FINAL

Hubo diferencias con significación estadística en el peso alcanzado por nuestros animales al finalizar el estudio (F=48.888, p<0.001) (Fig. 74).

Se diferenciaron claramente 4 subconjuntos distintos todos entre sí. Por un lado las ratas alcohólicas-malnutridas, que fueron las que menor peso tenían, seguidas de las

ratas malnutridas, posteriormente las alcohólicas y por último las controles cuyos pesos eran los más altos.

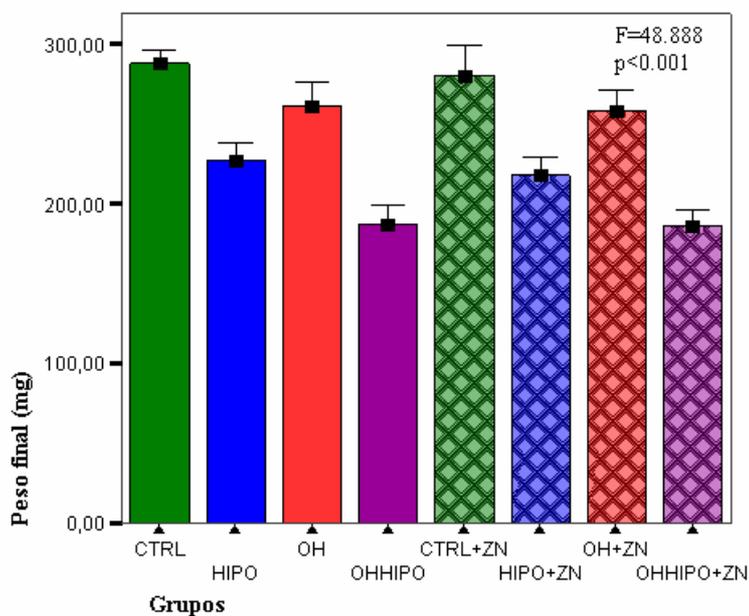
Tanto el alcoholismo ( $F=51.364$ ,  $p<0.001$ ) como la malnutrición ( $F=265.611$ ,  $p<0.001$ ) muestran un efecto independiente sobre este parámetro, disminuyéndolo.

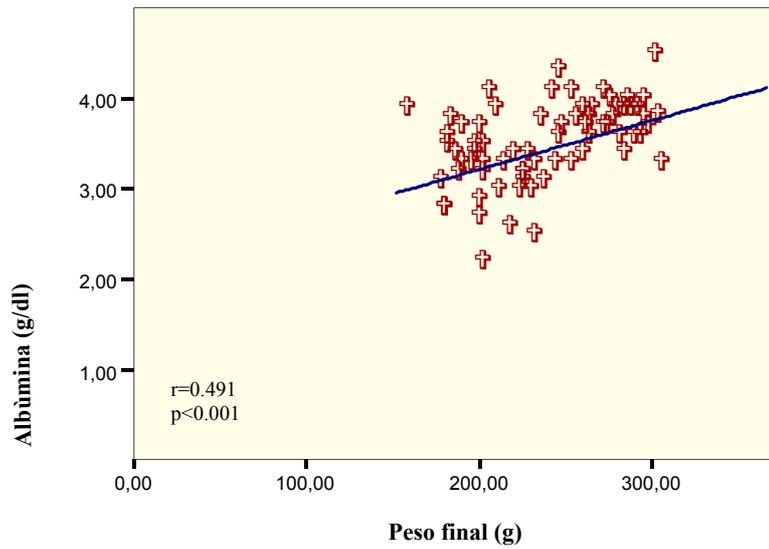
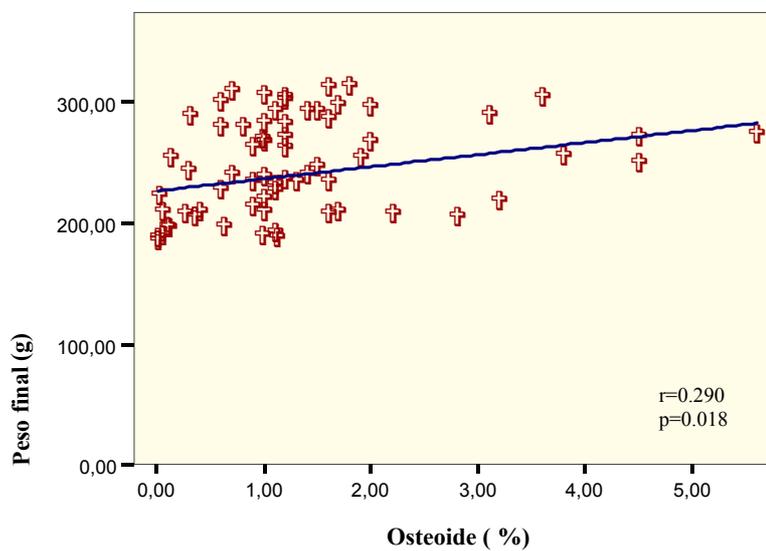
Tras correlación de Pearson observamos relación:

-Directa con :

- Área de los tres tipos de fibras musculares ( $p<0.01$ ).
- Albúmina ( $r=0.491$ ,  $p<0.01$ ) (Fig. 75).
- La proporción de osteoide ( $r=0.290$ ,  $p=0.018$ ) (Fig. 76).
- IGF-1 ( $r=0.232$ ,  $p<0.05$ ) (Fig. 77).
- Volumen óseo trabecular ( $r=0.246$ ,  $p=0.046$ ) (Fig. 78).
- Osteocalcina ( $r=0.750$ ,  $p<0.001$ ).
- Vitamina D ( $r=0.589$ ,  $p<0.001$ ).
- Testosterona ( $r=0.232$ ,  $p<0.05$ ).

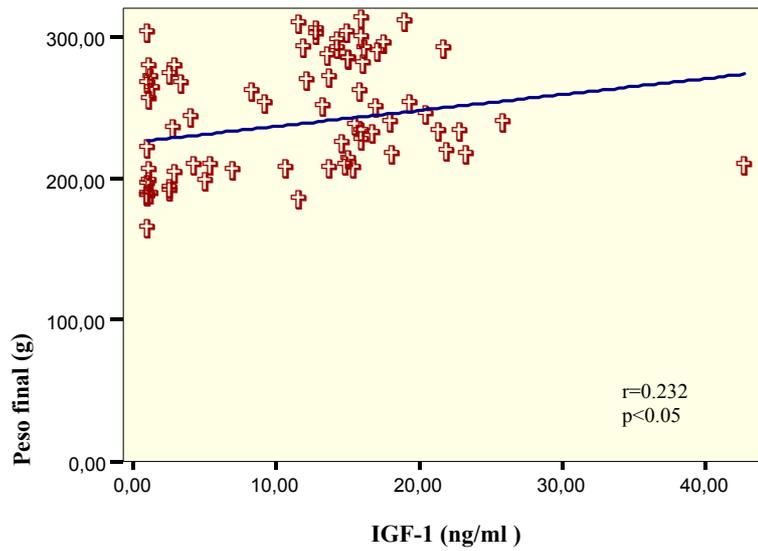
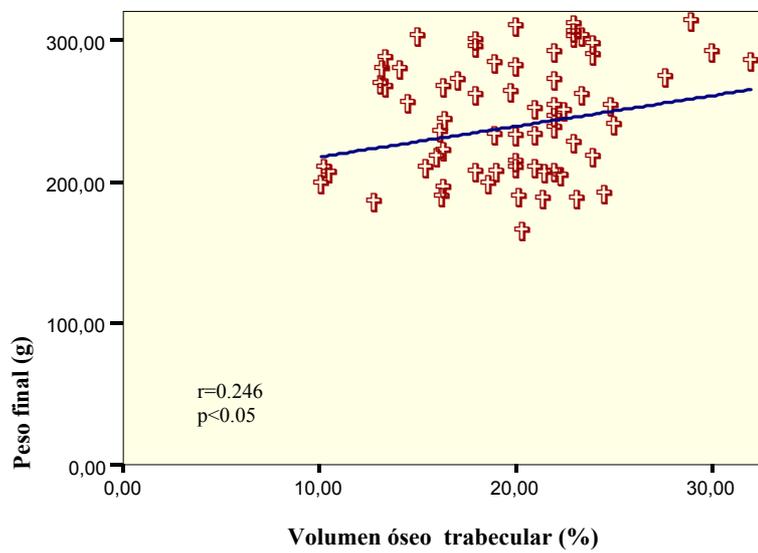
**Figura 74. Media de pesos finales por grupos.**



**Figura 75. Relación peso final del animal-albúmina.****Figura 76. Relación peso final del animal y osteoide.**

-Inversa con:

-Niveles de MLDm ( $r= -0.506$ ,  $p<0.01$ ).

**Figura 77. Relación peso final del animal con concentraciones de IGF-1.****Figura 78. Relación peso final con el volumen óseo trabecular.**

## **5. DISCUSIÓN.**

## 5.1. MÚSCULO

En el alcohólico crónico está descrita, como señalamos en la introducción de este estudio, una malnutrición calórico-proteica dependiente tanto de causas puramente dietéticas (Santolaria et al., 2000a) como de malabsorción, patología pancreática o hepática. Lo cierto es que malnutrición y alcoholismo crónico están estrechamente imbricados, por lo que es a veces difícil discernir qué efectos orgánicos o funcionales obedecen a una u otra causa. Por este motivo es necesario, a la hora de diseñar un estudio experimental, recurrir a un modelo que, como el de Lieber-DeCarli, contempla la utilización de dietas isocalóricas con o sin etanol y con diferente aporte de proteínas. La administración de estas dietas exige un estricto control de la cuantía ingerida diariamente por los animales de experimentación. El alcohol provoca anorexia, especialmente si se acompaña de malnutrición proteica. Estos animales además pierden peso a lo largo del estudio, hechos constatado por diversos autores que han utilizado este modelo (Wilson et al., 1986). A fin de evitar la confusión que generaría un diferente aporte calórico a los distintos grupos experimentales es necesario administrar la misma cantidad ingerida por las ratas que menos consumen al resto de animales. Esto implica que el grupo control no es un control en el sentido estricto ya que está sometido a una restricción calórica. Por eso es necesario recurrir a un grupo alimentado “ad libitum”, que representaría un auténtico grupo control, aunque perderíamos la equidad en la ingesta calórica. Además, si los animales pierden peso, la ingesta calórica por masa magra y lo que es más importante, la ingesta de alcohol por gramo de peso es mayor si se lleva a cabo un procedimiento de “pair feeding” estricto. Hay que añadir también que el manejo de múltiples grupos de animales conlleva notables dificultades para lograr que los grupos coman una misma cantidad de dieta: generalmente no pueden incluirse más de cuatro o cinco animales simultáneamente y es conveniente además que simultáneamente se estén tratando varios grupos para poder equilibrar la ingesta.

Pese a todo ello en nuestro estudio hemos conseguido dos cosas: en primer lugar son muy escasas las diferencias entre el grupo control y el grupo “ad libitum”, es decir, la utilización de los parámetros del primero como valores de referencia es adecuada. Además, si bien no hemos conseguido un idéntico consumo calórico por parte de las ratas alimentadas con dieta alcohólica-hipoproteica, también es cierto que hemos

minimizado las eventuales diferencias de la cantidad de alcohol ingerida por gramo de peso.

Uno de los objetivos que hemos perseguido en el presente trabajo es determinar si el tratamiento con zinc ejerce algún efecto sobre la miopatía alcohólica crónica.

Como objetivo secundario hemos analizado la relación entre atrofia muscular, peroxidación lipídica, actividad de enzimas antioxidantes y contenido muscular de oligoelementos relacionados bien de forma causal (como el hierro) o bien con la actividad de dichos enzimas antioxidantes (zinc, manganeso, cobre y selenio).

Como hemos comentado anteriormente el alcohol daña la fibra muscular esquelética, habiéndose descrito dos entidades claramente distintas: la miopatía alcohólica aguda y la forma crónica. Esta segunda es mucho más frecuente (50-60%); en la clásica serie de Martín et al. de 1985b sólo 7 de 151 alcohólicos presentaron signos de rabdomiolisis aguda. La miopatía alcohólica crónica se caracteriza por atrofia muscular que afecta fundamentalmente a las fibras tipo II B. En este sentido nuestros resultados concuerdan con lo referido en la literatura, ya que diversos autores (Preedy y Peters, 1988; Martín et al., 1984) han encontrado atrofia de las fibras tipo II o II B tanto en modelos experimentales como en estudios en humanos. El zinc en nuestro estudio no ha mostrado efecto alguno sobre la atrofia muscular pese a que, como señalamos en la introducción, hay al menos dos razones teóricas que podrían avalar su beneficio: el ser cofactor de enzimas involucradas en la síntesis proteica como la DNA y RNA polimerasas, y el ser igualmente cofactor de varias enzimas implicadas en los mecanismos antioxidantes celulares. Un hecho a destacar es que los niveles tisulares de zinc en las ratas tratadas con sulfato de zinc no difieren de forma significativa de los encontrados en las ratas no suplementadas con este oligoelemento; en cambio, tanto la excreción urinaria como fecal de zinc sí están aumentadas en las ratas tratadas con zinc. Esto sugiere que a partir de una determinada ingesta de zinc este elemento o bien no se absorbe (de ahí su mayor excreción fecal) o bien se excreta en mayor cantidad por vía urinaria.

Estos resultados concuerdan con los estudios realizados con King et al., en 2000 y Lönnnerdal, en 2000 que demuestran que a medida que aumenta la ingestión de zinc se produce por una parte la saturación del mecanismo de absorción intestinal y por otra un aumento de la secreción intestinal de este oligoelemento, lo que incrementa en gran medida la excreción fecal de zinc. Por otra parte estudios de la distribución del zinc en el medio interno han demostrado que la concentración de zinc en músculo permanece relativamente constante (Jackson et al., 1982) aún en presencia de una ingesta de zinc excesiva, como ocurre en nuestro modelo experimental. Donde si se observa un ligero incremento de la concentración de zinc es en el hueso (Emmert y Baker, 1995), en concordancia con lo obtenido en el presente trabajo.

Como hemos comentado previamente en la introducción la atrofia muscular expresa una menor cantidad absoluta de proteínas que puede obedecer a una defectuosa síntesis o a un aumento de su destrucción. Hay bastantes evidencias (Mitch et al., 1996) de que el sistema ubiquitina/proteasoma encargado de la degradación de proteínas citosólicas está activado en la miopatía alcohólica. Se ha involucrado a los ROS en esta degradación acelerada de proteínas. En nuestro estudio es de interés la relación obtenida entre productos de peroxidación lipídica y atrofia de las fibras musculares, particularmente de las tipo II B (Fig. 12, pg. 109), resultado experimental que apoya la aseveración antes comentada.

El hierro es un elemento pro-oxidante. En la hepatopatía alcohólica y/o en la hepatopatía de la malnutrición proteica se ha establecido una clara relación entre niveles tisulares de hierro y lesión celular. Cabe destacar la relación encontrada por nosotros entre la concentración muscular de hierro y los productos de la peroxidación lipídica (Fig. 25, pg. 119). Hay que decir además que tanto el hierro como el malonildialdehído musculares guardaron relación con la intensidad de la malnutrición proteica, como se desprende de la relación encontrada entre estas variables y el peso final de nuestros animales (Fig. 24 y 16; pg. 119, 112). El hallazgo de una relación similar con el diámetro de las fibras musculares sugiere fuertemente que la malnutrición proteica juega un papel determinante en la génesis de la miopatía alcohólica. Este fenómeno ha sido objeto de notable controversia. Tanto el grupo de Preedy (Preedy y Peters, 1990a) como el de Barcelona (Estruch et al., 1993) sostienen que la miopatía alcohólica aparece con independencia del estado nutricional. Es de destacar sin embargo que en la clásica

serie de Urbano Márquez et al., de 1989, en la que asegura que no hay malnutrición clínicamente relevante, el pliegue cutáneo del tríceps está reducido en los alcohólicos con miopatía y que Nicolas et al., en un reciente estudio, en 2003, si encuentra relación con el estado nutricional, concluyendo que la malnutrición juega un papel adicional al del alcohol en los cambios estructurales y funcionales de la miopatía alcohólica. Estos autores también encuentran que la dosis total de etanol consumida a lo largo de la vida guarda relación con la aparición de la miopatía (Fernández Sola et al., 1998).

Nuestro grupo, desde hace más de una década, con el apoyo tanto de resultados experimentales (Conde et al., 1998) como clínicos (Romero et al., 1994), ha venido sosteniendo que la malnutrición proteica juega un papel determinante en la evolución de la miopatía. En el estudio de Conde la atrofia de las fibras tipo II B era más intensa en las ratas con malnutrición proteica asociada y en el trabajo de Romero la lesión histológica muscular fue más acusada en los pacientes con malnutrición de tipo marasmática. En un estudio ulterior, Santolaria et al., en 2000b encuentran también que los pacientes con un peor estado nutricional tenían menor fuerza muscular. Los resultados del presente estudio concuerdan plenamente con lo mencionado: mediante el análisis de la varianza de dos vías se demuestra que la malnutrición proteica juega un papel determinante en la atrofia de las fibras tipo II.

Hemos querido profundizar más en los mecanismos etiopatogénicos analizando la relación entre la atrofia muscular y las concentraciones de las distintas hormonas activas en el músculo, y la existente entre la peroxidación lipídica y el daño muscular.

La somatomedina C, o IGF-1, es una hormona que ejerce un efecto anabolizante aumentando la síntesis proteica y la masa muscular. En nuestro estudio los niveles estaban claramente descendidos, particularmente si concomitaba la malnutrición proteica, según se muestra en la figura 29 (pg. 122), como por otra parte está ampliamente descrito en la literatura (Oster et al., 1995). Como era de esperar encontramos una clara relación entre IGF-1 y atrofia de las fibras musculares (Fig. 10, pg. 108), hallazgo que refuerza el papel de la malnutrición en la génesis de la miopatía, y que apunta hacia una defectuosa síntesis proteica como factor causal de la misma.

En el alcohólico crónico se describe un descenso de la testosterona que tiene un doble origen: por una parte hay una defectuosa producción gonadal de testosterona que no se acompaña de un aumento (esperable) de gonadotropina, sugiriendo la existencia de un defecto hipofisario asociado (Van Thiel et al., 1980; Martínez Riera et al., 1995; González Reimers et al., 1994). La testosterona ejerce un efecto anabólico sobre el músculo por lo que al menos en teoría en el alcohólico crónico su descenso debería jugar un papel. Los resultados de nuestro estudio no avalan tal hipótesis, pues ni había alteración significativa en las concentraciones de testosterona, ni se encontró relación entre ésta y la atrofia muscular.

La corticosterona es la principal hormona neogluogénica y por tanto responsable del catabolismo muscular. En el alcohólico crónico está descrito un aumento del cortisol plasmático, que aunque discreto se ha involucrado en la patogenia del así llamado pseudo-cushing del alcohólico. Al igual que con la testosterona nuestro estudio no apoya que las alteraciones del cortisol desempeñen una función determinante en la miopatía.

Como previamente hemos mencionado en la introducción, la peroxidación lipídica puede aumentar el catabolismo muscular a través, posiblemente, de la activación de interleucinas como el TNF- $\alpha$  o caquectina, potente inductor como su nombre indica del sistema ubiquitina/proteasoma (Mitch et al., 1996). La peroxidación lipídica no sólo deriva de la alteración de la capacidad de conjugar el exceso de radicales libres generados por el metabolismo del etanol sino también por la malnutrición proteica en sí misma (Lenhartz et al., 1998). Estos mecanismos incluyen la glutationperoxidasa, la superóxidodismutasa y antioxidantes como el  $\alpha$ -tocoferol, tal y como se ha citado con anterioridad en el apartado de mecanismos antioxidantes. Es evidente que en nuestro estudio la peroxidación lipídica juega un papel relevante ya que guarda una estrecha relación con la atrofia muscular, aunque como es sabido no necesariamente una correlación estrecha implica un papel causal. Por otro lado, hemos demostrado que en el exceso de malonildialdehído juega un papel tanto el alcohol como la malnutrición. Parece claro por tanto que el exceso de radicales libres guarda relación con la atrofia del músculo.

Las causas de esta excesiva producción de malonildialdehído son más difíciles de desvelar en nuestro estudio. La actividad tanto de la GPXm como de la SODm, en lugar de estar disminuida está aumentada (Figuras 18 y 17, pg. 113), sobre todo en el grupo alcohólico y en los tratados con zinc. Hay escasos estudios en los que se ha determinado la actividad muscular de la GPX (Fernández Sola et al., 2002). Por el contrario, la mayoría de autores encuentra un descenso de la actividad de la GPX hepática (Polavarapu et al., 1998; Zima et al., 2001), tal y como también nosotros hemos encontrado y expuesto en el capítulo de resultados correspondiente a sistemas enzimáticos en el hígado. Podría interpretarse que el exceso de productos de la peroxidación lipídica también obedece a otros factores, como por ejemplo el exceso de hierro, tal y como se puso de manifiesto en los clásicos trabajos de Chapman et al., 1982 y Brissot et al., 1983. El alcoholismo crónico es una situación caracterizada por una sobrecarga de hierro que se acumula preferentemente en el hígado, como se demuestra en nuestro estudio. También la malnutrición proteica provoca una acumulación de hierro en el hígado. En nuestro estudio hemos encontrado que las ratas alcohólicas-malnutridas presentaban un exceso de hierro muscular (Fig. 22, pg. 118) en el que juega un papel independiente el consumo de alcohol y que también se relaciona con la pérdida de peso. Puede ser que este exceso de hierro sea responsable de la peroxidación lipídica, de hecho el hierro muscular guarda una relación significativa con el MLD muscular.

Por lo tanto, también un excesivo catabolismo mediado por los radicales libres, a su vez dependiente del exceso de hierro, podría jugar también un papel en la atrofia muscular observada por nosotros.

De los oligoelementos estudiados, algunos como el zinc, cobre, manganeso y selenio, son cofactores de las enzimas antioxidantes antes señaladas. Diversos autores han encontrado un descenso de los valores plasmáticos de selenio en el alcohólico crónico (Preedy et al., 1990b; Ward et al., 1992; Doworkin et al., 1984) y algunos, aunque pocos, del selenio hepático (Cho et al., 1991; Smith-Kielland et al., 1986). Son escasos, sin embargo, los que han estudiado el selenio muscular (Bogden et al., 1984). Nuestros resultados contrastan con estos hallazgos, estando el selenio muscular aumentado en vez de descendido en las ratas alcohólicas. Esta aparente paradoja guarda relación estrecha con el hallazgo de la actividad elevada de la GPXm encontrada en nuestros animales. Algo parecido cabría decir para el zinc. Varios estudios describen un

descenso del zinc en el alcohólico crónico fundamentalmente de zinc hepático y de zinc en sangre (Navarro et al., 1986; González Reimers et al., 1998), atribuyéndose este descenso al excesivo catabolismo proteico. No obstante, hemos de comentar que diversos autores no han encontrado alteración alguna del zinc tanto en modelos experimentales como en humanos. En nuestro estudio, el zinc muscular sigue un comportamiento paralelo al del selenio (y también al de la GPXm y SODm, enzimas de la que es cofactor). Podría sugerirse la hipótesis de que la mayor actividad de estas enzimas para contrarrestar el exceso de radicales libres aumente la captación por el músculo de zinc y de selenio, sus cofactores, lo que explicaría los resultados obtenidos en nuestro trabajo experimental.

## 5.2. HUESO.

Como antes explicábamos el consumo crónico de alcohol se asocia a una osteopatía metabólica estando de acuerdo la mayor parte de los autores en que es la osteoporosis y no la osteomalacia la lesión predominante. Apuntábamos también que la malnutrición calórico proteica contribuía al desarrollo de esta osteopatía como ya habían sugerido Diamond et al., en 1989a y Lalor et al., 1986. También en estudios realizados por nuestro grupo tanto a nivel experimental (Molina Pérez et al., 2000), como clínicos se apoya esta hipótesis (Santolaria et al., 2000b). En el presente trabajo hemos encontrado que el tratamiento con etanol, independientemente de que la dieta estuviera suplementada con zinc o estuviera asociado o no a malnutrición proteica, es el responsable directo del descenso de la masa ósea. No obstante también es cierto que existe una relación estadísticamente significativa entre masa ósea y pérdida de peso a lo largo del estudio lo que sugiere de nuevo el papel coadyuvante de la malnutrición proteica en la osteopatía (Fig. 78, pg. 164).

Como desarrollamos en la introducción, en el apartado de osteopatía alcohólica, la pérdida de masa ósea inducida por el alcohol puede obedecer a una disminución de la síntesis ósea o a un aumento de la reabsorción ósea. Existe parámetros tanto histológicos como bioquímicos que evalúan ambos procesos. Así, la medición histomorfométrica del osteoide y la determinación analítica de la osteocalcina constituyen herramientas útiles que permiten valorar el proceso de formación ósea. En nuestro estudio encontramos que las ratas alcohólicas-malnutridas presentaban los valores más bajos de osteoide y osteocalcina. El tratamiento con zinc mejora ambos parámetros. Como vemos en la figura 35 (pg. 127), las ratas tratadas con zinc de cada uno de los grupos tienen mayor cantidad de osteoide que las ratas a las que no se les administró suplementos de zinc de los grupos homónimos. También es evidente que es la coexistencia de alcohol y malnutrición proteica la que realmente produce un descenso de la síntesis ósea, pues es en este grupo, esté o no tratado con zinc, donde los niveles de osteoide son más bajos. En efecto, el análisis de varianza de dos vías muestra que la malnutrición proteica ejerce un efecto independiente reduciendo el volumen de osteoide, oponiéndose en ese sentido al zinc, que tiende a aumentarlo. Además encontramos una relación significativa entre osteoide y peso final y, como era de

esperar, hallamos igualmente una relación positiva entre osteoide y osteocalcina. El efecto del zinc observado en este estudio concuerda con la mencionada acción de este oligoelemento como cofactor de enzimas involucrados en la síntesis proteica y con las observaciones realizadas por diversos grupos del papel de los suplementos dietéticos de zinc como promotores del crecimiento óseo (Díaz Gómez et al., 2003;) así como de los efectos negativos del inadecuado aporte de este elemento sobre el crecimiento del niño en países subdesarrollados (Ninh et al., 1996).

Una de las hormonas implicadas en el crecimiento del hueso es la HGH, que actúa por medio de la somatomedina C o IGF-1. Como era de esperar, en concordancia con los resultados, los niveles del IGF-1 son más bajos en las ratas alimentadas con dietas hipoproteicas y tratadas con alcohol existiendo una interacción significativa, aditiva entre ambos factores. Además el IGF-1 guardaba relación con la pérdida de peso a lo largo del estudio, según se expone en la figura 77 (pg. 164). El zinc no ejerció efecto alguno sobre los niveles de esta hormona.

Otra hormona implicada en el crecimiento óseo es la vitamina D. La forma activa de esta vitamina, la 1,25 dihidroxivitamina D, actúa sobre el metabolismo calcio-fosfórico fundamentalmente incrementando la absorción intestinal de calcio. Parece ser que favorece por esta vía la mineralización ósea (de hecho la deficiencia de vitamina D se asocia a raquitismo y osteomalacia), aunque algunos autores (Altundag et al., 2004; Passeri et al., 2003) apuntan que también estimula la reabsorción ósea. De forma similar al resto de los parámetros osteosintéticos la concentración plasmática de vitamina D estaba descendida en las ratas con malnutrición proteica con independencia del consumo de alcohol, aunque hay que matizar que son las ratas alcohólico-hipoproteicas las que mostraban valores más bajos. En concordancia con lo que hemos dicho encontramos una relación directa y significativa entre valores de vitamina D y peso final y albúmina sérica. Es llamativo el hallazgo de una relación significativa entre los niveles de vitamina D y área de las fibras musculares. Sin que podamos explicar patogénicamente este hallazgo no debemos olvidar que en situaciones de carencia de vitamina D que cursan con osteomalacia existe una miopatía proximal que afecta sobre todo a la musculatura de la cintura pélvica (Russell, 1994; Pfeifer et al., 2002). En la malnutrición calórico proteica es frecuente el déficit de vitamina D y diversos autores – la mayoría – encuentran también niveles bajos de vitamina D asociados al alcoholismo

(Laitinen et al., 1991; Lindholm et al., 1991) por lo que nuestros resultados coinciden con lo referido en la literatura.

Un resultado interesante es el hallazgo de una relación significativa entre osteoide y el grado de atrofia muscular como se demuestra en las figuras 37 y 38 (pg. 128 y 129). Esta relación es directa, es decir, a mayor masa muscular mayor formación ósea. Es conocido que la actividad muscular e incluso el esfuerzo antigravitatorio, mejoran la masa ósea (Valimaki et al., 1994; Benavid et al., 1996). Como hemos comentado sobradamente en párrafos anteriores y en el capítulo específico de músculo, el alcohol provoca miopatía crónica caracterizada por atrofia muscular, situación que llega a afectar a un 50-60% de alcohólicos (Preedy et al., 1990a). Que sepamos no existen estudios en alcohólicos que relacionen masa muscular determinada histomorfológicamente con la masa ósea, aunque autores como Lalor et al., 1986 encuentren una relación entre IMC y masa ósea y estudios realizados en nuestro grupo demuestren también la existencia entre fuerza muscular y masa ósea (Santolaria et al., 2000b). Nuestro trabajo por lo tanto demuestra una relación directa entre formación de hueso y masa muscular en la que como hemos comentado la malnutrición proteica juega un papel predominante.

Hay que señalar que la relación entre atrofia muscular y volumen óseo trabecular, aunque directa, no alcanza la significación estadística, en contraste con los hallazgos relativos al osteoide. No podemos olvidar que la reabsorción ósea juega también un papel en el mantenimiento del volumen óseo trabecular. La destrucción del hueso es un fenómeno mediado por hormonas como la PTH y diversas citocinas como por ejemplo TNF- $\alpha$  y la IL-6, que por medio del RANK-L activan al osteoclasto. Éste mediante su borde en cepillo digiere las sales de hidroxiapatita gracias a la actividad de su anhidrasa carbónica y a la bomba de protones asociada a la membrana creando las lagunas de reabsorción que pueden ser identificadas en la trabécula. Sería éste un fenómeno histológico indicativo de la destrucción ósea (aún cuando su visualización en la rata conlleva considerable dificultad). De forma similar a como ocurría con la síntesis ósea, existen marcadores bioquímicos que permiten evaluar la reabsorción. Los marcadores bioquímicos más usados en el momento actual son los fragmentos carboxi- y aminoterminales de la colágena tipo I. También la hidroxiprolina se ha utilizado con el mismo fin, aún cuando es menos específica, ya que la destrucción de la colágena

hepática puede también elevarla. No obstante la cantidad de fibrosis que se deposita en el hígado en el modelo experimental que hemos utilizado es escasa por lo que en principio podemos considerar que la excreción de hidroxiprolina estima adecuadamente la degradación ósea. No encontramos diferencias con significación estadística en la excreción de hidroxiprolina corregida por creatinina en los distintos grupos, sugiriendo este resultado que, en contraste con la síntesis ósea, la reabsorción del hueso no se ve afectada de forma significativa por el alcohol ni la malnutrición, ni tampoco el zinc ejerce efecto protector alguno sobre la destrucción ósea. Esta aseveración se ve además avalada por la ausencia de diferencias en la PTH y en la corticosterona entre los distintos grupos. Como mencionamos en la introducción la malnutrición proteica se asocia a una osteoporosis de bajo recambio con un descenso tanto de la síntesis como de la reabsorción, estando por lo tanto nuestros resultados en absoluta concordancia con lo descrito por otros autores (Bourrin et al., 2000b). También, como comentamos hay disparidad en los resultados referidos en la literatura con respecto al efecto del etanol sobre la reabsorción ósea, aunque la mayoría de los autores coinciden en señalar la ausencia de efecto del alcohol sobre la reabsorción ósea (Diamond et al., 1989a; Laitinen et al., 1992b; Gonzalez Calvin et al., 1993).

Por lo tanto, parece que la osteopatía del alcohólico se caracteriza por un descenso de la masa ósea, fundamentalmente debido a una defectuosa síntesis, ejerciendo el zinc un ligero efecto protector, precisamente porque aumenta la formación del hueso. Es destacable la relación entre la atrofia muscular y la osteopenia, lo que podría sugerir un papel contributivo de la miopatía alcohólica en la osteoporosis de estos pacientes. Ello contrasta con la ausencia de relación entre afectación hepática y alteraciones óseas.

### 5.3. HÍGADO.

Tras todo lo comentado en el apartado anterior parece evidente que el hígado juega un papel central en la homeostasis calcio-fosfórica ya que es el órgano donde se sintetizan el IGF-1 y la 25 hidroxivitamina D. En el presente estudio, aún cuando no constituía nuestro principal objetivo, hemos analizado también el papel del zinc sobre los cambios hepáticos y la relación de las alteraciones generadas por alcohol y malnutrición proteica en la peroxidación lipídica con los cambios histológicos hepáticos. El modelo de Lieber deCarli (al contrario del de French y Tsukamoto) no permite que la rata desarrolle una cirrosis hepática histológicamente manifiesta. Ello al parecer se debe a que se precisa mayor cantidad de alcohol (que la rata no ingeriría en ningún caso, pero que sí puede administrarse por sonda nasogástrica) para producir una lesión hepática avanzada.

Como otros autores (Lieber, 1980) y en concordancia con estudios previos llevados a cabo por nuestro grupo (Conde et al., 1993), hemos observado sólo un discreto aumento de la cantidad de fibrosis en las ratas alcohólicas –aunque a diferencia de otros trabajos la concomitancia de malnutrición proteica no se asociaba a mayor fibrosis. Lo que si se evidencia en nuestro estudio es que el tratamiento con zinc no altera en absoluto el depósito de tejido fibroso.

Teóricamente el zinc podría haber modificado la fibrosis por tres vías distintas: reforzando la actividad de los sistemas antioxidantes, aumentando la actividad de las colagenasas e inhibiendo la prolilhidroxilasa. Esta es la base teórica en la que se sustentan el ya clásico trabajo de Anttinen et al., de 1984, quien demostró regresión de la fibrosis tras el tratamiento con zinc, hallazgos compartidos por Camps et al., en 1992, pero no por otros autores que han abordado este tema (López Lirola et al., 2003). Que la actividad antioxidante se encuentra disminuida en aquellas ratas que presentaban una mayor cantidad de fibrosis queda fuera de toda duda al contemplar la figura en la que se expone la relación entre el porcentaje de fibrosis hepática y la actividad de la GPX hepática (Fig. 53, pg. 143), y es también evidente que el zinc en nuestro estudio no ejerce efecto alguno. Este resultado difiere del encontrado por Pathak et al., en 2002. Aún cuando, como hemos reiterado, el hallazgo de una relación significativa no implica

una relación de causalidad, es de destacar la estrecha relación inversa entre cantidad de fibrosis y actividad de la GPX hepática. Dentro de la misma línea de razonamiento podemos interpretar la relación encontrada entre grado de fibrosis y sobrecarga férrica hepática, ya que es conocido el efecto promotor de la peroxidación lipídica ejercido por este oligolemento (Chapman et al., 1982; Sergent et al., 1995). El cobre es cofactor de otros de los enzimas claves de la fibrogénesis hepática como es la lisil-oxidasa por lo que teóricamente es un elemento fibrogénico. Tal papel parece explicar la intensa fibrosis que acompaña a la cirrosis infantil india y a la enfermedad de Wilson (Sternlieb, 1980). Lo cierto es que los quelantes del cobre inhiben la lisil-oxidasa y por tanto la fibrogénesis (Rojkind y Dunn, 1979). En nuestro estudio hemos observado una relación significativa entre cobre hepático y cantidad de fibrosis, que puede apoyar lo anteriormente citado.

Las ratas alcohólicas-malnutridas son las que perdieron peso de forma más acusada, y es en este grupo donde se produjo la mayor acumulación de hierro como es evidente en la figura 60 (pg. 150). La sobrecarga hepática de hierro se ha descrito en el Kwashiorkor y también se ha descrito por nuestro grupo utilizando un modelo experimental similar al actual (Conde et al., 1992). Por otro lado el incremento de la peroxidación lipídica se ha encontrado en la malnutrición proteica (George et al., 1998). Nuestros resultados por lo tanto concuerdan con lo referido en la literatura y nos permiten sugerir, con las salvedades que este tipo de aseveraciones exige, una relación de causalidad: la malnutrición proteica generaría una excesiva sobrecarga de hierro inductora de más peroxidación lipídica, que redundaría en mayor lesión histológica, máxime al estar disminuidos los sistemas antioxidantes.

Otro tipo de expresión del efecto lesivo del alcohol y la malnutrición sobre el hígado es la esteatosis hepática. De forma paralela a la fibrosis las ratas alcohólicas-malnutridas presentaban mayor esteatosis hepática no ejerciendo tampoco el zinc efecto protector alguno. Al igual que con la fibrosis, existió una relación inversa estadísticamente significativa entre la actividad de la glutathionperoxidasa hepática y el depósito de grasa en el hígado, apoyando la hipótesis anteriormente expresada. En cambio la relación encontrada entre la esteatosis hepática y la concentración hística de hierro no llega a alcanzar en nuestro estudio significación estadística, pese a mostrar una clara tendencia a ello.

Encontramos una relación directa entre malonildialdehído y la actividad de la enzima glutathionperoxidasa hepática. Un resultado parecido ha sido encontrado por otros autores (Morales et al., 2004) que sugiere una elevación compensadora de la actividad de los sistemas antioxidantes para compensar el exceso de peroxidación lipídica. Una interpretación similar cabría en nuestro estudio, pero hay que reseñar de nuevo que el zinc no ejerció efecto alguno sobre la peroxidación lipídica.

Por lo tanto, el zinc no protege del efecto fibrogénico del alcohol y la malnutrición. Hay una relación inversa entre actividad de la glutathionperoxidasa y esteatosis y fibrosis, no modificada tampoco por el zinc, así como una relación directa entre la sobrecarga hepática de hierro y la fibrosis hepática. Etanol y malnutrición proteica ejercen efectos independientes sobre estas interacciones existiendo en algunos casos un efecto sinérgico. No encontramos que las alteraciones hepáticas guarden relación directa con las alteraciones óseas. Sin embargo algunos datos permiten sugerir un cierto papel de la hepatopatía alcohólica sobre la osteoporosis del paciente alcohólico. Es éste el caso de la relación inversa encontrada entre grasa hepática- un marcador de lesión de la viscera- y concentraciones de osteocalcina e IGF-1. Como comentamos previamente la osteocalcina refleja la actividad osteoblástica y el IGF-1 es uno de los principales activadores de la osteosíntesis, precisamente de síntesis hepática, y con buena relación con la función hepática (Santolaria et al., 1995). Nuestros resultados podrían sugerir que la progresiva lesión hepática pueden inhibir la formación ósea otorgándole así un papel en la osteopatía del alcohólico. Diversos autores (Jorge et al., 1988) han encontrado mayor gravedad de la lesión ósea en pacientes cirróticos alcohólicos, estando por tanto nuestros resultados en concordancia con esos hallazgos aunque como ya explicamos el grado de lesión hepática producido por nuestro modelo experimental es de baja intensidad.

## **6. CONCLUSIONES.**

1.-En nuestro modelo experimental existe una miopatía caracterizada por la atrofia de las fibras tipo II, tanto las II A como las II B, ejerciendo un efecto independiente tanto el alcohol como especialmente la malnutrición proteica. En el caso de las fibras tipo II B el efecto del alcohol es potenciador de la atrofia, mientras que en las II A el alcohol tiene un papel, significativo, opuesto al de la malnutrición.

2.-Esta atrofia parece obedecer a una defectuosa síntesis muscular de proteínas, como puede deducirse de la relación entre área muscular y concentración disminuida de IGF-1 (a su vez dependiente también del alcohol y de la malnutrición proteica).

3.-La atrofia muscular también guarda relación con un aumento de la peroxidación lipídica.

4.-Este aumento de la peroxidación lipídica guarda relación con la concentración muscular de hierro, que aparece elevada, lo que sugiere que la sobrecarga férrica pueda estar involucrada en dicha peroxidación.

5.-Existe una osteopatía relacionada con el alcohol caracterizada fundamentalmente por un descenso de la masa ósea debido principalmente a una disminución en la formación ósea. El zinc en nuestro trabajo ejerce un ligero efecto protector, precisamente al actuar sobre la síntesis ósea.

6.-La atrofia de las fibras tipo II B se relaciona con el osteoide, por lo que es posible que la miopatía del alcohólico pueda jugar un papel patogénico en la pérdida ósea. Sin embargo, es muy dudosa la influencia de la lesión hepática asociada al alcoholismo sobre la osteopatía del alcohólico.

7.- En nuestro modelo experimental el alcohol induce una discreta fibrosis hepática. Esta fibrosis se relaciona con una disminución de los sistemas antioxidantes y una sobrecarga hepática de cobre y hierro. Esta última además se ve potenciada por la malnutrición. No se apreció efecto protector del zinc sobre ninguno de los marcadores de daño o lesión hepática.

## **7. BIBLIOGRAFÍA.**

.-Adachi J., Asano M., Ueno Y., Niemela O., Ohlendieck K., Peters TJ., Preedy VR. Alcoholic muscle disease and biomembrane perturbations. *J Nutr Biochem*. 2003a Nov;14(11):616-25.

.-Adachi J., Fujita T., Kudo R., Asano M., Nurhantari Y., Ueno Y. 7-hidroperoxycholesterol and oxyesterols as indices of oxidative stress: chronic ethanol feeding and rat skeletal muscle. *Leg Med (Tokyo)*. 2003b Mar;5 Suppl 1:S105-9.

.-Adachi J., Matsushita S., Yoshioka N., Funae R., Fujita T., Higuchi S., Ueno Y. Plasma phosphatidylcholine hydroperoxide as a new marker of oxidative stress in alcoholic patients. *J Lipid Res*. 2004 May;45(5):967-71.

.-Adams CL., Hambidge M., Raboy V., Dorsh JA., Sian L., Westcott JL., Krebs NF. Zinc absorption from a low-phytic acid maize. *Am J Clin Nutr*. 2002 Sep;76(3):556-9.

.-Albano E. Free radical mechanism in immune reactions associated with alcoholic liver disease. *Free radical Biol Med*. 2002 Jan;32(2):110-4.

.-Albano E., Clot P., Morimoto M., Tomasi A., Ingelman-Sundberg M., French SW. Role of cytochrome P4502E1-dependent formation of hydroxyethyl free radical in the development of liver damage in rats intragastrically fed with ethanol. *Hepatology*. 1996 Jan;23(1):155-63.

.-Albano E., French SW., Ingelman-Sundberg M. Hydroxyethyl radicals in ethanol hepatotoxicity. *Front Biosci*. 1999 Jun;4:D533-40.

.-Alcolado R., Arthur MJ., Iredale JP. Pathogenesis of liver fibrosis. *Clin Sci (Lond)*. 1997 Feb;92(2):103-12.

.-Altundag O., Altundag K., Selim Silay Y., Gunduz M., Demircan K., Gullu I. Calcium and vitamin D supplementation during bisphosphonate administration may increase osteoblastic activity in patients with bone metastasis. *Med Hypotheses*. 2004;63(6):1010-3.

.-Amin S., Zhang Y., Sawin CT., Evans Sr., Hannan MT., Kiel DP., Wilson PW., Felson DT. Association of hypogonadism and estradiol levels with bone mineral density in elderly men from The Framingham Study. *Ann Intern Med*. 2000 Dec 19;133(12):951-63.

.-Ammann P., Bourrin S., Bonjour JP., Meyer JM., Rizzoli R. Protein undernutrition-induced bone loss is associated with decreased IGF-1 and estrogen deficiency. *J Bone Miner Res*. 2000 Apr; 15(S):683-90.

.-Ammann P., Laib A., Bonjour JP., Meyer JM., Rueggsegger P., Rizzoli R. Dietary essential amino acid supplements increase bone strength by influencing bone mass and bone microarchitecture in ovariectomized adult rats fed an isocaloric low-protein diet. *J Bone Miner Res*. 2002 Jul;17(7):1264-72.

.-Andersen H., Borre M., Jakobsen J., Andersen PH., Vilstrup H. Decreased muscle strength in patients with alcoholic liver cirrhosis in relation with nutritional status, alcohol abstinence, liver function, and neuropathy. *Hepatology*. 1998 May;27(5):1200-6.

.-Angulo P., Keach JC., Batts KP., Lindor KD. Independent predictors of liver fibrosis in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 1999 Dec;30(6):1356-62.

.-Anttinen H., Ryhanen L., Puistola U., Arranto A., Oikarinen A. Decrease in liver collagen accumulation in carbon tetrachloride injured normal growing upon administration of zinc. *Gastroenterology*. 1984 Mar;86(3):532-9.

.-Aoki Y., Kawa S., Kiyosawa K. Chronic liver diseases. *Nippon Rinsho*. 2000 Feb;58(2):446-50.

.-Arthur MJ., Bentley ES., Tanner AR., Saunders PK., Millward-Sadler O., Wirght R. Oxygen derived free radicals promote hepatic injury in the rat. *Gastroenterology*. 1985 Nov;89(5):1114-22.

.-Baraona E., Leo MA., Borowsky SA., Lieber CS. Alcoholic hepatomegaly: accumulation of protein in the liver. *Science*. 1975 Nov 21;190(4216):794-5.

.-Baraona E., Pikkarainen P., Salaspuro M., Finkelman F., Lieber CS. Acute effects of ethanol on hepatic protein synthesis and secretion in the rat. *Gastroenterology*. 1980 Jul;79(1):104-111.

.-Baron JA., Farahmand BY., Weiderpass E., Michaelsson K., Alberts A., Person I., Ljunghall S. Cigarette smoking, alcohol consumption, and risk of hip fracture in women. *Arch Intern Med*. 2001 Apr 9; 161(7):983-8.

.-Bendavid EJ., Shan J., Barret-Connor E. Factors associated with bone mineral density y middle-aged men. *Bone Miner Res*.1996 Aug;11(8):1185-90.

.-Bergheim I., Parlesak A., Dierks C., Bode JC., Bode C. Nutritional deficiencies in German middle-class male alcohol consumers: relation to dietary intake and severity of liver disease. *Eur J Clin Nutr*. 2003 Mar;57(3):431-8.

.-Bikle DD., Genant HK., Cann C., Recker RR., Halloran BP., Streweler GJ. Bone disease in alcoholic abuse. *Ann Intern Med*. 1985 Jul;103(1):42-8.

.-Bikle DD., Stesin A., Halloran B., Steinbach L., Recker R. Alcohol induced bone disease: Relationship to age and parathyroid hormone levels. *Alcohol Clin Exp Res*. 1993 Jun;17(3):690-5.

.-Bird GL., MacSween RN., Pathogenesis of alcoholic liver disease: immune mechanisms. In: *Alcoholic Liver Disease*, Hall P(ed), Edward Arnold Press, London 1995.

.-Bogden JD., Al-Rabiabi S., Gilani SH. Effect of chronic ethanol ingestion on the metabolism of copper, iron, manganese, selenium, and zinc in an animal model of alcoholic cardiomyopathy. *J Toxicol Environ Health*. 1984;14(2-3):407-17.

.-Boleda MD., Julia P., Pares X. Role of extrahepatic alcohol dehydrogenase in rat ethanol metabolism. *Arch Biochem Biophys*. 1989 Oct;274(1):74-81.

.-Bonjour JP., Ammann P., Chevalley T., Rizzoli R. Protein intake and bone growth. *Can J Appl Physiol*. 2001;26 Suppl:S153-66.

.-Bourrin S., Ammann P., Bonjour P., Rizzoli R. Dietary protein restriction lowers plasma Insulin Like Growth Factor I (IGF-1), impairs cortical bone formation and induces osteoblastic resistance to IGF-1 in adult female rats. *Endocrinology*. 2000b. Vol 141, N°9:3149-55.

.-Bourrin S., Toromanoff A., Ammann P., Bonjour JP., Rizzoli R. Dietary protein deficiency induces osteoporosis in aged male rats. *J Bone Miner Res*. 2000a Aug;15(8):1555-63.

.- Brissot P., Campion JP., Guillouzo A., Allain H., Messner M., Simon M., Ferrand B., Bouzo M. Experimental hepatic iron overload in the baboon: results of a two-year study. Evolution of biological and morphological hepatic parameters of iron overload. *Dig Dis Sci*. 1983 Jul;28(7):616-24.

.-Brzoska MM., Moniuszko-Jakoniuk J., Jurczuck M., Galazyn-Sidorczuk M. Cadmium turnover and changes of zinc and copper body status in rats continuously exposed to cadmium and ethanol. *Alcohol Alcohol*. 2002 May-Jun;37(3):213-21.

.-Camps J., Bargallo T., Jiménez A., Alie S., Caballería J., Pares A., Joven J., Masana L., Rodes J. Relationship between hepatic lipid peroxidation and fibrogenesis in carbon tetrachloride-treated rats: effect of zinc supplementation. *Clin Sci (Lond)*. 1992 Dec;83(6):695-700.

.-Canbay A., Higuchi H., Bronk SF., Taniani M., Sebo TJ., Gores GJ. Fas enhances fibrogenesis in the bile duct ligated mouse: a link between apoptosis and fibrosis. *Gastroenterology*. 2002 Oct;123(4):1323-30.

.-Carey LC., Coyle P., Phlicox JC., Rofe AM. Zinc supplementation at the time of ethanol exposure ameliorates teratogenicity in mice. *Alcohol Clin Exp Res*. 2003 Jan;27(1):107-10.

.-Carini R., De Cesaris MG., Spendore R., Albano E. Etanol potencia hipoxia liver injury: role of hepatocyte Na(+) overload. *Biochim Biophys Acta*. 2000 Nov;1502(3):508-14.

.-Casafont F., Sánchez E., Martín L., Agüero J., Romero FP. Influence of malnutrition on the prevalence of bacterial translocation and spontaneous bacterial peritonitis in experimental cirrosis in rats. *Hepatology*. 1997 Jun;25(6):1334-7.

.-Casini A., Ceni E., Salzano R., Biondi P., Parola M., Galli A., Foschi M., Caligiuri A., Pinzani M., Surrenti C. Neutrophil-derived superoxide anion induces lipid peroxidation and stimulates collagen synthesis in human hepatic stellate cells: role of nitric oxide. *Hepatology*. 1997 Feb;25(2):361-7.

.-Chapman RW., Morgan MY., Laulich M., Hoffbrand AV., Sherlock S. Hepatic Iron stores and markers of iron overload in alcoholics and patients with hemochromatosis. *Dig Dis Sci*. 1982 Oct;27(10):909-16.

.-Chedid A., Mendenhall CL., Moritz TE., French SW., Chen TS., Morgan TR., Roselle GA., Nemchausky BA., Tamburro CH., Schiff ER, et al. Cell-mediated hepatic injury in alcoholic liver disease. Veterans Affairs Cooperative Study Group 275. *Gastroenterology*. 1993 Jul;105(1):254-66.

.-Cho HK., Yang FL., Snook JT. Effects of chronic ethanol consumption on selenium status and utilization by rats. *Alcohol*. 1991 Mar-Apr;8(2):91-6.

.-Clark PJ., Eastell R., Barker ME: Zinc supplementation and bone growth in pubertal girls. *Lancet*. 1999 Aug;354(9177):485.

.-Clot P., Parola M., Bellomo G., Dianzani U., Carini R., Tabone M., Arico S., Ingelman-Sundberg M., Albano E. Plasma membrane hydroxyethyl radical adducts cause antibody-dependent cytotoxicity in rats hepatocytes exposed to alcohol. *Gastroenterology*. 1997 Jul;113(1):353-5.

.-Cofan M., Nicolas JM., Fernández Sola J., Robert J., Tobias E., Estruch R., Urbano-Márquez A. Acute ethanol treatment decreases intracellular calcium-ion transients in single skeletal muscle fibres in vitro. *Alcohol Alcohol*. 2000 Mar-Apr;35(2):134-8.

.-Conde Martel A., González Reimers E., González Hernández T., Santolaria Fernández F., Martínez Riera A., Marchena Gómez J. Muscular changes in experimental protein malnutrition. *Nutr Hosp*. 1998 Nov-Dec;13(6):309-11.

.-Conde Martel A., Gonzalez Reimers E., Santolaria Fernández F., Castro Alemán V., Galindo Martín L., Rodríguez Mo F., Martínez Riera A. Combined effects of ethanol and protein deficiency on hepatic iron, zinc, manganese, and copper contents. *Alcohol*. 1992 Sep-Oct;9(5):341-8.

.-Conde Martel A., Gonzalez Reimers E., Santolaria Fernández F., Castro Aleman V., Marchena Gomez J., Martinez Riera A. Liver changes in protein malnutrition. An experimental study in rats. *Nutr Hosp*. 1993 Jul-Aug;8(6):358-63.

.-Conte D., Caraceni M.P., Duriez J., Mandelli C., Corghi E., Cesana M., Ortolani S., Bianchi PA. Bone involvement in primary hemochromatosis and alcoholic cirrhosis. *Am Journal of Gastroenterology*. 1989;84:1231-1234.

.-Cooper C., Melton LJ. Magnitude and impact of osteoporosis and fractures. In : Marcus R; Feldman D and Kelsey J, eds. *Osteoporosis*. San Diego: Academic Press. 1996:419-434.

.-Creedon A., Flynn A., Cashman K. The effect of moderately and severely restricted dietary magnesium intakes on bone composition and bone metabolism in the rat. *Br J Nutr.* 1999. 82:63-71.

.-Crilly KS., Kiss Z. Ethanol has multiple effects on DNA synthesis in fibroblast depending of the presence of secreted growth regulator and zinc as well as the level of protein kinase activation. *Arch Biochem Biophys.* 2000 Sep;381(1):127-34.

.-Dai J., Lin D., Zhang J., Habib P., Smith P., Murtha J., Fu Z., Yao Z., Qi Y., Keller ET. Chronic alcohol ingestion induces osteoclastogenesis and bone loss through IL-6 in mice. *J Clin Invest.* 2000 Oct;106(7):887-95.

.-De Onís M., Villar J. Hábitos de salud. Consumo de alcohol. En De Onís M., Villar J.: *La mujer y la salud en España. Informe básico. Volumen 1.* Madrid, Ministerio de Asuntos Sociales, Instituto de la mujer, 1992;275-303.

.-Del Villar Negro A., Merino Angulo J., Rivera-Pomar JM. Skeletal muscle changes in chronic alcoholic patients. A conventional, histochemical, ultrastructural and morphometric study. *Acta Neurol Scand.* 1984 sep;70(3):185-96.

.-Denke M., Wilson JD. Malnutrición de proteínas y energía. *Harrison Principios de Medicina Interna.* 1998. Cap 74:513-15.

.-Diamond T., Stiel D., Lunzer M., Wilkinson M., Posen S. Ethanol reduces bone formation and may cause osteoporosis. *Am J Med.* 1989a Mar;86(3):382-8.

.-Diamond T., Stiel D., Mason R., Lissner D., Bikle D., Wilson S., Posen S. Serum vitamin D metabolites are not responsible for low turnover osteoporosis in chronic liver disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 1989c Dec;69(6):1234-9.

.-Diamond T., Stiel D., Posen S. Osteoporosis in hemochromatosis: iron excess, gonadal deficiency or other factors?. *Ann Intern Med.* 1989b Mar;110(6):430-436.

.-Diamond TH., Levy S., Smith A., Day P. High bone turnover in Muslim women with vitamin D deficiency. *Med J Aust.* 2002 Aug;177(3):139-41.

.-Díaz Gómez M., Doménech E., Barroso F., Castells S., Cortabarría C., Jiménez A. The effect of zinc supplementation on linear growth, body composition, and growth factors in preterm infants. *Pediatrics.* 2003;111(5):1002-9.

.-Diez A., Puig J., Serrano S., Marinoso ML., Bosch J., Marrugat J., Mellibovsky L., Nogues X., Knobel H., Aubia J. Alcohol-induced bone disease in the absence of severe chronic liver damage. *J Bone Miner Res.* 1994 Jun;9(6):825-31.

.-Diez A., Serrano S., Cucurrul J., Marinoso L., Bosch J., Puig J., Nogues X., Aubia J. Acute effect of ethanol on mineral metabolism and trabecular bone in Sprague-dawley rats. *Calcif Tissue Int.* 1997 Aug;61(2):168-71.

.-Doffoel M., Tongio MM., Gut JP., Ventre G., Charrault A., Vetter D., Ledig M., North ML., Mayer S., Bockel R. Relationship between 34 HLA-A HLA-B and

HLA-DR antigens and three serological markers of viral infection in alcoholic cirrhosis. *Hepatology*. 1986 May-Jun;6(3):457-63.

.-Dreosti IE. Zinc and the gene. *Mutat Res*. 2001 Apr;475(1-2):161-7.

.-Duane P., Peters TJ. Nutritional status in alcoholics with and without chronic skeletal muscle myopathy. *Alcohol Alcohol*. 1988;23(4):271-7.

.-Dursun N., Aydogan S. Comparative effects of calcium deficiency and supplements on the intestinal absorption of zinc in rats. *Jpn J Physiol*. 1994;44(2):157-66.

.-Dworkin B., Rosenthal WS., Jankowski RH., Gordon GC., Haldea D. Low blood selenium levels in alcoholic with and without advanced liver disease. Correlations with clinical and nutritional status. *Dig Dis Sci*. 1985 Sep;30(9):838-44.

.-Dworkin BM., Rosenthal WS., Gordon GC., Jankowski RH. Diminished blood selenium levels in alcoholic. *Alcohol Clin Exp Res*. 1984 Nov-Dec;8(6):535-8.

.-Dyer SA., Buckendahl P., Sampson HW. Alcohol consumption inhibits osteoblastic cell proliferation and activity. *Alcohol*. 1998 Nov;16(4):337-41.

.-Emmert JL., Baker DH. Zinc stores in chickens delay the onset of zinc deficiency symptoms. *Poult Sci*. 1995 Jun;74(6):1011-21.

.-Enomoto N., Takase S., Yasuhara M., Takada A. Acetaldehyde metabolism in different aldehyde 2 dehydrogenase 2 genotypes. *Alcohol Clin Exp Res* 1991 Feb; 15(1):141-144.

.-Essen B., Fohlin L., Thoren C., Saltin B. Skeletal muscle fibre types and sizes in anorexia nervosa patients. *Clin Physiol*. 1981 Aug;1(4):395-403.

.-Estruch R., Nicolas JM., Villegas E., Junque A., Urbano-Márquez A. Relationship between ethanol-related diseases and nutritional status in chronically alcoholic men. *Alcohol Alcohol*. 1993 Sep;28(5):543-50.

.-Estruch R., Sacanella E., Fernández Sola J., Nicolas JM., Rubin E., Urbano-Márquez A. Natural history of alcoholic myopathy: a 5-years study. *Alcohol Clin Exp Res*. 1998 Dec;22(9):2023-8.

.-Farley JR., Fitzsimmons R., Taylor AK., Jorch UM., Lau KH. Direct effects of ethanol on bone resorption and formation in vitro. *Arch Biochem Biophys*. 1985 Apr;238(1):305-14.

.-Fataccioli V., Andraud E., Gentil M., French SW., Rouach H. Effects of chronic ethanol administration on rat liver proteasome activities: relationship with oxidative stress. *Hepatology*. 1999 Jan;29(1):14-20.

.-Feingold KR., Doerrler W., Dinarello CA., Fiers W., Grunfeld C. Stimulation of lipolysis in cultured fat cells by tumor necrosis factor, Interleukin-1, and the

interferons is blocked by inhibition of prostaglandins synthesis. *Endocrinology*. 1992 Jan;130(1):10-6.

.-Fell GS., Fleck A., Cuthbertson DP., Queen K., Morrison C., Bessent RG., Husain SL. Urinary zinc levels as an indication of muscle catabolism. *Lancet*. 1973 Feb 10(1): 280-2.

.-Felson DT., Zhang Y., Hannan MT., Anderson JJ. Effects of weight and body mass index on bone mineral density in men and women: The Framingham Study. *J Bone Miner Res*. 1993 May; 8(5):567-73.

.-Felson DT., Zhang Y., Hannan MT., Kannel WB., Kiel DP. Alcohol intake and bone mineral density in elderly men and women. The Framingham Study. *Am J Epidemiol*. 1995 Sep 1;142(5):485-92.

.-Fernandez Checa JC., Ookhtens M., Kaplowitz N. Effects of chronic ethanol feeding on rat hepatocytic glutathione. Relationship of cytosolic glutathione to efflux and mitochondrial sequestration. *J Clin Invest*. 1989 Apr;83(4):1247-52.

.-Fernández Sola J., Estruch R., Grau JM., Pare JC., Rubin E., Urbano-Márquez A. The relation of alcoholic myopathy to cardiomyopathy. *Ann Intern Med*. 1994 Apr; 120(7):529-36.

.-Fernández Sola J., Junyent JM., Urbano-Márquez A. Alcoholic myopathies. *Curr Opin Neurol*. 1996 Oct;9(5):400-5.

.-Fernández Sola J., Nicolas JM., Fatjo F., García G., Sacanella E., Estruch R., Tobias E., Urbano-Marquez A. Evidence of apoptosis in chronic alcoholic skeletal myopathy. *Human Pathol*. 2003 Dec;34(12):1247-52.

.-Fernández Sola J., Nicolas JM., Sacanella E., Robert J., Cofan M., Estruch R., Urbano-Márquez A. Low-dose ethanol consumption allows strength recovery in chronic alcoholic myopathy. *QJM*. 2000 Jan;93(1):35-40.

.-Fernández Sola J., Sacanella E., Estruch R., Nicolas JM., Grau JM., Urbano-Márquez A. Significance of type II fiber atrophy in chronic alcoholic myopathy. *J Neurol Sci*. 1995 May;130(1):69-76.

.-Fernández Sola J., García G., Elena M., Tobias E., Sacanella E., Estruch R., Nicolas JM: Muscle antioxidant status in chronic alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res*. 2002 Dec;26(12):1858-62.

.-Fernández Sola J., Villegas E., Nicolas JM., Deulofeu R., Antúnez E., Sacanella E., Estruch R., Urbano-Márquez A. Serum and muscle levels of alpha-tocopherol, ascorbic acid, and retinol are normal in chronic alcoholic myopathy. *Alcohol Clin Exp Res*. 1998 Apr;22(2):422-7.

.-Ferraz MI., Gabaii AA., Oliveira AS., Ferrari AP., Miszputen SJ., Ferrera A., Neto A., Castelo Filho A., Schmidt B. Histochemical study of the skeletal muscle in chronic alcoholism. *Arq Neuropsiquitr*. 1989 Jun;47(2):139-49.

.-Feskanich D., Korrick SA., Greenspan SL., Rosen HN., Colditz GA. Moderate alcohol consumption and bone density among postmenopausal women. *J Women Health*. 1999 Jan-Feb;8(1):65-73.

.-Florjanczyk B. Zinc level in selected tissues of ethanol and morphine intoxicated mice. *Med Sci Monit*. 2000 Jul-Aug;6(4):680-3.

.-Fontana L., Jerez D., Rojas Valencia L., Solis Herruzo JA., Greenwel P., Rojkind M. Ethanol induces the expresión of alpha 1(I) procollagen mRNA: a co-culture system containing a liver stellate cell-line and freshly isolated hepatocytes. *Biochim Biophys Acta*. 1997 Dec;1362(2-3):135-44.

.-French SW. The mechanism of organ injury in alcoholics: implications for therapy. *Alcohol alcohol Suppl*. 1991;1:57-63.

.-Frenzer A., Butler WJ., Norton ID., Wilson JS., Apte MW., Pirola RC., Ryan C., Roberts-Thomson IC. Polymorphism in alcohol-metabolizing enzymes, glutathione S-transferases and apolipoprotein E and susceptibility to alcohol-induced cirrhosis and chronic pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2002 Feb;17(2):177-82.

.-Friday KE., Howard GA. Ethanol inhibits human bone cell proliferation and function in vitro. *Metabolism*. 1991 Jun;40(6):562-5.

.-Friel JK., Andrews WL., Matthew JD., Long DR., Cornel AM., Cox M., Mackim E., Zerbe GO. Zinc supplementation in very-low-weight infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1993 Jul;17(1):97-104.

.-Friel JK., Gibson RS., Kawash GH., Watts J. Dietary zinc intake and growth during infancy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1985 Oct;4(5):746-51.

.-Frost HM. Tetracycline-based histological analysis of bone remodeling. *Calcified Tissue Research*. 1969;3:211-237.

.-Fujita T., Adachi J., Ueno Y., Peters TJ., Preedy VR. Chronic ethanol feeding increases 7-hydroperoxycholesterol and oxysterols in rat skeletal muscle. *Metabolism*. 2002 Jun;51(6):737-42.

.-García Sanchez A., González Calvin JL., Diez Ruiz A., Casals JL., Gallego Rojo F., Salvatierra D. Effects of acute ethanol ingestión mineral metabolism and osteoblastic function. *Alcohol Alcohol*. 1995 Jul; 30 (4):449-453.

.-Garriga J., Adanero E., Fernández Sola J., Urbano-Márquez A., Cusso R. Ethanol inhibits skeletal muscle cell proliferation and delays its differentiation in cell culture. *Alcohol Alcohol*. 2000 Jan;35(3):236-41.

.-Gavaler JS., Arria AM. Increase susceptibility of women to alcoholic liver disease: Artifactual or real?. *Alcoholic liver disease*, Hall,P (Ed), Edward Arnold Press, London 1995.

.-George DK., Goldwurm S., MacDonald GA., Cowley LL., Walker NI., Ward PJ., Jazwinska EC., Powell LW. Increased hepatic iron concentration in nonalcoholic steatohepatitis is associated with increased fibrosis. *Gastroenterology*. 1998 Feb; 114(2):311-8.

.-Girre C., Hispard E., Therond P., Guedj S., Bourdon R., Dally S. Effects of abstinence from alcohol on the depression of glutathione peroxidase activity and selenium and vitamin E levels in chronic alcoholic patients. *Alcohol Clin Exp Res*. 1990 Dec; 14 (6):909-12.

.-González Hernández TH., Molina Rodríguez A., Llabrés Olmo J., González Reimers CE., Pérez González H., Meyer G. Effects of postnatal administration of ethanol on the M. Gastrocnemius of the albino mouse. *Drug and Alcohol Dependence*. 1989; 23:137-42.

.-González Reimers E., Conde Martel A., Santolaria Fernández F., Martínez Riera A., Rguez Moreno F., González Hernández T., Castro Alemán VV. Relative and combined roles of ethanol and protein malnutrition on muscle zinc, potassium, copper, iron and magnesium. *Alcohol Alcohol*. 1993 May; 28(3):311-8.

.-González Reimers E., Martínez Riera A., Santolaria Fernández F., Conde Martel A., Alvarez Argüelles H., Santana Herrera C., Rodríguez Moreno F. Relative and combined effects of ethanol and protein deficiency on gonadal function and histology. *Alcohol*. 1994 Sep-Oct; 11(5):355-60.

.-González Reimers E., Martínez Riera A., Santolaria Fernández F., Mas Pascual A., Rodríguez Moreno F., Galindo Martín L., Molina Perez M., Barros Lopez N. Relative and combined effects of ethanol and protein deficiency on zinc, iron, copper, and manganese contents in different organs and urinary and fecal excretion. *Alcohol*. 1998 Jul; 16(1):7-12.

.-González-Calvin JL., García Sánchez A., Bellot V., Muñoz Torres M., Raya Alvarez E., Salvatierras Rios D. Mineral metabolism, osteoblastic function and bone mass in chronic alcoholism. *Alcohol Alcohol*. 1993 Sep; 28(5):571-9.

.-Grattagliano I., Vendemiale G., Caraceni P., Domenicali M., Nardo B., Cavallari A., Trevisani F., Bernardi M., Altomare E. Starvation impairs antioxidant defense in fatty livers of rats fed choline-deficient diet. *J Nutr*. 2000 Sep; 130(9):2131-6.

.-Greenwel P., Domínguez Rosales JA., Mavi G., Rivas-Estilla AM., Rojking G. Hydrogen Peroxide: a link between acetaldehyde-elicited alpha 1 collagen gene-up regulation and oxidative stress in mouse hepatic stellate cells. *Hepatology*. 2000 Jan; 31(1):109-16.

.-Grove J., Daly AK., Bassendine MF., Day CP. Association of tumor necrosis factor promoter polymorphism with susceptibility of alcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 1997; 26:143-146.

.-Haller RG., Knochel JP. Skeletal muscle disease in alcoholism. *Med Clin North Am*. 1984 Jan; 68(1):91-103.

- .-Hambidge M. Human zinc deficiency. *J Nutrit.* 2000;130:1344S-1349S.
- .-Hannan MT., Felson DT., Dawson-Hughes B., Tucker KL., Cupples LA., Wilson PW., Kiel DP. Risk factors for longitudinal bone loss in elderly men and women: The Framingham Osteoporosis Study. *J Bone Miner Res.* 2000a Apr; 15(4):710-20.
- .-Hannan MT., Tucker KL., Dawson-Hughes B., Cupples LA., Felson DT., Keller DP. Effect of dietary protein on bone loss in elderly men and women: The Framingham Osteoporosis Study. *J Bone Miner Res.* 2000b Dec;15(12):2504-12.
- .-Harris JE. Hepatic glutathione, metallothionein and zinc in the rat on gestational day 19 during chronic ethanol administration. *J Nutr.* 1990 Sep;120(9):1080-1086.
- .-Hatakeyama D., Kozawa O., Otsuka T., Shibata T., Uematsu T. Zinc supresses IL-6 synthesis by prostaglandin F2alpha in osteoblast: Inhibition of phospholipase C and phospholipase D. *J Cell Biochem.* 2002 ;85(3):621-8.
- .-Hautekeete ML., Degott C., Benhamou JP. Microvesicular steatosis of the liver. *Acta Clínica Bélgica* 1990;45(5):311-26.
- .-Hautekeete ML., Geerts A. The hepatic Stellate (Ito) cell: its role in human liver disease. *Virchows Arch.* 1997 Mar;430 (3):195-207.
- .-Herbert DC. Growth patterns and hormonal profile of male rats with protein-calorie malnutrition. *Anat Rec.* 1980 Jul;197(3):339-54.
- .-Hershkovitz E., Printzman L., Segev Y., Levy J., Phillip M. Zinc supplementation increases the level of serum insuline-like growth factor but does not promote growth in infants with no organic failure to thrive. *Horm Res.* 1999;52(4):200-4.
- .-Herzberg M., Foldes J., Steinberg R., Menczel J. Zinc excretion in osteoporotic women. *J Bone Miner Res.* 1990 Mar;5(3):251-7.
- .-Higueret D., Dumas F., Fleury. Correlation between hepatic alcohol dehydrogenase (ADH) activity and hepatic zinc content in human. *Alcohol Alcohol.* 1989;24:373.
- .-Hodgson SF. Corticosteroid induced osteoporosis. *Endocrinol Metabol Clin North.* 1990;19(1):95-111.
- .-Hogan HA., Argueta F., Moe L., Nguyen LP., Sampson HW. Adult-onset alcohol consumption induces osteopenia in female rats. *Alcohol Clin Exp Res.* 2001 May;25(5):746-54.
- .-Hoidrup S., Gronbaek M., Gottschau A., Lauritzen JB., Schroll M. Alcohol intake, beverage preference, and risk of hip fracture in men and women. *Copenhagen*

Center for Prospective Population Studies. *Am J Epidemiol.* 1999 Jun;149(11):993-1001.

.-Hoidrup S., Prescott E., Sorensen TI., Gottschau A., Lauritzen JB., Schroll M., Gronbaek M. Tobacco smoking and risk of hip fracture in men and women. *Int J Epidemiol.* 2000 Apr;29(2):253-9.

.-Hong-Brown LQ., Frost RA., Lang CH. Alcohol impairs protein synthesis and degradation in cultured skeletal muscle cells. *Alcohol Clin Exp Res.* 2001 Sep; 25(9):1373-82.

.-Hultcrantz R., Bissell DM., Roll FJ. Iron mediates production of a neutrophil chemoattractant by rat hepatocytes metabolizing ethanol. *J Clin Invest.* 1991 Jan;87:45-49.

.-Hunter RJ., Neagoe C., Jarvelainen HA., Martin CR., Lindros KO., Linke WA., Preedy VR. Alcohol affects the skeletal muscle proteins, titin and nebulin in male and female rats. *J Nutr.* 2003 Apr;133(4):1154-7.

.-Huuskonen J., Vaisanen SB., Kroger H., Jurvelin C., Bouchard C., Alhava E., Rauramaa R. Determinant of bone mineral density in middle aged men: a population based study. *Osteoporos Int.* 2000;11(8):702-8.

.-Huuskonen J., Vaisanen SB., Kroger H., Jurvelin JS., Penttila I., Alhava E., Rauramaa R. Relation of sex hormones to bone mineral density in middle-aged men during a 4 years exercise intervention trial. *Bone.* 2002 Jul;31(1):51-6.

.-Iimuro Y., Gallucci RM., Luster MI., Kono H., Thurman RG. Antibodies to tumor necrosis factor alfa attenuate hepatic necrosis and inflammation caused by chronic exposure to ethanol in the rats. *Hepatology.* 1997;26 (6):1530-7.

.-Isayama F., Froh M., Yin M., Conzelmann LO., Milton RJ., McKim SE., Wheeler MD. TNF alpha-induced Ras activation due to ethanol promotes hepatocyte proliferation independently of liver injury in the mouse. *Hepatology.* 2004 Mar; 39(3):721-31.

.-Jackson AA. Severe undernutrition in Jamaica. Kwashiorkor and marasmus: the disease of weanling. *Acta Paediatr Scand Suppl.* 1986;323:43-51.

.-Jackson MJ., Jones DA., Edwards RH. Tissue zinc levels as index of body zinc status. *Clin Physiol.* 1982 Aug;2(4):333-43.

.-Jacobs B. Alcoholism induced bone necrosis. *N Y State J Med.* 1992; 92(8):334-338.

.-Jarvelainen HA., Fang C., Ingelman-Sundbergm., Lindros KO. Effect of chronic coadministration of endotoxin and ethanol on rat liver pathology and proinflammatory and anti-inflammatory cytokines. *Hepatology.* 1999;29 (5):1503-10.

.-Jasminka Z., Ilich and Jane E. Kerstetter. Nutrition in bone health revisited. A story beyond calcium. *Journal of the Am College of Nutrition*. 2000. vol 19(6):715-737.

.-Jellinek EM. Alcoholism, a genus and some species. *Can Med Assoc J*. 1960 Dec;83:1341-5.

.-Jiang LJ., Maret W., Valle BL. The glutathione redox couple modulates zinc transfer from metallothionein to zinc-depleted sorbitol dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998 Mar;97(7):3483-88.

.-Jonas J., Burns J., Abel EW., Cresswell MJ., Strain JJ., Paterson CR. Impaired mechanical strength of bone in experimental copper deficiency. *Ann Nutr Metab*. 1993; 37:245-252.

.-Jorge Hernández JA., González Reimers CE., Torres Ramírez A., Santolaria Fernández F., González García C., Batista López JN., Pestana Pestana M., Hernández Nieto L. Bone changes in alcoholic liver cirrhosis. A histomorphometrics analysis of 52 cases. *Dig Dis Sci*. 1988 Sep;33(9):1089-95.

.-Kanis J., Johnell O., Gullberg B., Allander E., Elffors L., Ranstam J., Dequeker J., Dilsen G., Gennari C., Vaz AL., Lirytis G., Mazzuoli G., Miravet L., Passeri M., Pérez Cano R., Rapado A., Ribot C. Risk factors for hip fracture in men from southern Europe: The MEDOS Study. *Osteoporos Int*. 1999;9(1):45-54.

.-Kanis JA., Johnell O., Oden A., Johansson H., De Laet C., Eisman JA., Fujiwara S., Krog P., McCloskey EV., Mellstrom D., Melton JL., Pols H., Reeve J., Silman A., Tenenhouse A. Smoking and fracture risk: a meta-analysis. *Osteoporos Int*. 2004a June 3.

.-Kanis JA., Johansson H., Johnell O., Oden A., De Laet C., Eisman JA., Pols H., Tenenhouse A. Alcohol intake as a risk factor for fracture. *Osteoporos Int*. 2004b Sep 29.

.-Karasik D., Rosen CJ., Hannan MT., Broe KE., Dawson-Hughes B., Gagnon DR., Wilson PW., Visser M., Langlois JA., Mohan S., Kiel DP. Insulin-like growth factor binding proteins 4 and 5 and bone mineral density in elderly men and women. *Calcif Tissue Int*. 2002 Oct;71(4):323-8. Epub 2002 Sep 2004.

.-Kawase T., Kato S., Lieber CS. Lipid peroxidation and antioxidant defense system in rat liver after chronic ethanol feeding. *Hepatology*. 1989 Nov;10(5):815-21.

.-Kelsen SG., Ference M., Kapoor S. Effects of prolonged undernutrition on structure and function of the diaphragm. *J Appl Physiol*. 1985 Apr;58(4):1354-9.

.-Kelsen SG. The effects of undernutrition on the respiratory muscles. *Clin Ches Med*. 1986 Mar;7(1):101-10.

.-Kikafunda JK., Walker AF., Allan EF., Tumwine JK. Effect of zinc supplementation on growth and body composition of Uganda preschool children: a randomized, controlled, interventional trial. *Am J Clin Nutr*. 1998 Dec;68(6):1261-6.

.-King JC., Shames DM., Woodhouse LR. Zinc homeostasis in humans. *J Nutr* . 2000 May;130(5S Suppl):1360S-1366S.

.-Klein RF., Carlos AS. Inhibition of osteoblastic cell proliferation and ornithine decarboxylase by ethanol. *Endocrinology*. 1995 Aug ;136(8):3406-11.

.-Klein RF., Fausti KA., Carlos AS. Ethanol inhibits human osteoblastic cell proliferation. *Alcohol Clin Exp Res*. 1996 May;20(3); 572-8.

.-Koll M., Ahmed S., Mantle D., Donohue TM., Palmer TN., Simanowski UA., Seltz HK., Paters TJ., Preedy VR. Effect of acute and chronic alcohol treatment and their superimposition on lysosomal, cytoplasmic, and proteosomal protease activities in rat skeletal muscle in vivo. *Metabolism*. 2002 Jan;51(1):97-104.

.-Koll M., Beeso JA., Kelly FJ., Simanowski UA., Seitz HK., Peters TJ., Preedy JR. Chronic alpha tocopherol supplementation in rats does not ameliorate either chronic or acute alcohol-induced changes in muscle protein metabolism. *Clin Sci (Lond)*. 2003 Mar;104(3):287-94.

.-Kono H., Rusyn I., Yin M., Gäbele E., Yamashina S., Dikalova A., Kadiiska M., Connor HD., Mason RP., Segal BH., Bradford BU., Holland SM., Thurman RG. NADPH-oxidase-derived free radicals are key oxidants in alcohol-induced liver disease. *J Clin Invest*. 2000 Oct;106(7):867-72.

.-Kugelmas M. Preliminary observation: Oral zinc sulfate replacement is effective in treating muscle cramps in cirrhotic patients. *J Am Coll Nutri*. 2000; 19(1):13-15.

.-Laitinen K., Karkkainen M., Lalla M., Lamberg-Allardt C., Tunninen R., Tahtela R., Valimäki M. Is alcohol an osteoporotic inducing agent for young and middle-aged women?. *Metabolism*. 1993 Jul;42: 875-81.

.-Laitinen K., Lamberg-Allardt C., Tunninen R., Harkonen M., Valimäki M. Bone mineral density and abstention-induced changes in bone and mineral metabolism in noncirrhotic male alcoholics. *Am J Med*. 1992b Dec;93(6):642-50.

.-Laitinen K., Tahtela R., Luomanmäki K., Valimäki MJ. Mechanisms of hypocalcemia and markers of turnover in alcohol-intoxicated drinkers. *Bone Miner*. 1994 Mar; 24(3):171-79.

.-Laitinen K., Tahtela R., Valimäki M. The dose-dependency of alcohol-induced hypoparathyroidism, hypercalciuria, and hypermagnesuria. *Bone Miner*. 1992a Oct; 19(1):75-83.

.-Laitinen K., Valimäki M. Alcohol and bone. *Calcif Tissue Int*. 1991;49 Suppl:S70-3.

.-Lalor BC., France MW., Powell D., Adams PH., Counihan TB. Bone and mineral metabolism and chronic alcohol abuse. *Q J Med*. 1986 May;59(229):497-511.

.-Lambert JC., Zhou Z., Kang YJ. Suppression of Fas-mediated signaling pathway is involved in zinc inhibition of ethanol-induced liver apoptosis. *Exp Biol Med* (Maywood). 2003b Apr;228(4):406-12.

.-Lambert JC., Zhou Z., Wang L., Song Z., McClain CJ., Kang YJ. Prevention of alterations in intestinal permeability is involved in zinc inhibition of acute ethanol-induced liver damage in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003a Jun;305(3):880-6.

.-Lang CH., Frost RA., Nairn AC., McLean DA., Vary TC. TNF-alpha impairs heart and skeletal muscle protein synthesis by altering translation initiation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002 Feb;282(2):E336-47.

.-Lang CH., Frost RA., Svanberg E., Vary TC. IGF-1/IGFBP-3 ameliorates alterations in protein synthesis, eIF4E availability, and myostatin in alcohol-fed rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004 Jun;286(6):E916-26.

.-Lang CH., Kimball SR., Frost RA., Vary TC. Alcohol myopathy: impairment of protein synthesis and translation initiation. *Int J Biochem Cell Biol*. 2001 May;33(5):457-73.

.-Lang CH., Liu X., Nystrom G., Wu D., Cooney RN., Frost RA. Acute effects of Growth hormone in alcohol-fed rats. *Alcohol Alcohol*. 2000a;35(2):148-58.

.-Lang CH., Vary TC., Frost RA. Acute in vivo elevation of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-1 decreases plasma free IGF-1 and muscle protein synthesis. *Endocrinology*. 2003 Sep;144(9):3922-33.

.-Lang CH., Wu D., Frost RA., Jefferson LS., Kimball SR., Vary TC. Inhibition on muscle protein synthesis by alcohol is associated with modulation of eIF2B and eIF4E. *Am J Physiol*. 1999a Aug;277(2):E268-76.

.-Lang CH., Wu D., Frost RA., Jefferson LS., Vary TC., Kimball SR. Chronic alcohol feeding impairs hepatic translation initiation by modulation of eIF2 and eIF4E. *Am J Physiol*. 1999b Nov;277(5 Pt 1):E805-14.

.-Lang CH., Frost RA., Kumar V., Wu D., Vary TC. Impaired protein synthesis induced by acute ethanol intoxication associated with changes in eIF4E in muscle and eIF2B in liver. *Alcohol Clin Exp Res*. 2000b Mar;24(3):322-31.

.-Lang JK., Gohill K., Packer L., Burk RF. Selenium deficiency, endurance exercise capacity, and antioxidant status in rats. *J Appl Physiol*. 1987 Dec;63(6):2532-5.

.-Langlois JA., Rosen CJ., Visser M., Hannan MT., Harris T., Wilson PW., Kiel DP. Association between insulin-like growth factor 1 and bone mineral density in older women and men: The Framingham Heart Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998 Dec;83(12):4257-62.

.-Lee DH., Anderson KE., Harnack LJ., Folsom AR., Jacobs DR. Jr. Heme iron, zinc, alcohol consumption, and colon cancer: Iowa Women's Health Study. *J Natl Cancer Inst.* 2004 Mar;96(5):403-7.

.-Lee HS., Csallany AS. The influence of vitamin E and selenium on lipid peroxidation and aldehyde-dehydrogenase activity in rat liver and tissue. *Lipids.* 1994 May;29(5):345-50.

.-Lelbach WK. Cirrhosis in the alcoholic and its relation to the volume of alcohol abuse. *Ann N Y Acad Sci.* 1975 Apr;252:85-105.

.-Lenhartz H., Ndasi R., Anninos A., Botticher D., Mayatepek E., Tetanye E., Leichsenring L. The clinical manifestation of the kwashiorkor syndrome is related to increased lipid peroxidation. *J Pediatr.* 1998 May;132(5):879-81.

.-Lieber CS., DeCarli LM. Liquid diet technique of ethanol administration: 1989 update. *Alcohol alcohol.* 1989;24(3):197-213.

.-Lieber CS., Gentry RT., Baraona E. First pass metabolism of ethanol. *Alcohol Alcohol Suppl.* 1994;2:163-9.

.-Lieber CS. Alcohol, protein metabolism, and liver injury. *Gastroenterology* 1980 Aug;79(2):373-390.

.-Lindholm J., Steniche T., Rasmussen E., Thamsborg G., Nielssen IO., Brockstedt-Rasmussen H., Storm T., Hyldstrup L., Schou C. Bone disorder in men with chronic alcoholism: a reversible disease?. *J Clin Endocrinol Metab.* 1991 Jul;73(1):118-24.

.-Lindsell DR., Wilson AG., Maxwell JD. Fractures on the chest radiograph in detection of alcoholic liver disease. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1982 Aug;285(6324):597-599.

.-Liu J. Fas-mediated signaling pathway in ethanol-induced liver apoptosis: inhibition by zinc. *Exp Biol Med (Maywood).* 2004 May;229(5):365-6.

.-Lönnerdal B. Dietary factors influencing zinc absorption *J Nutr.* 2000 May;130(5S Suppl):1378-83.

.-López Lirola A., González Reimers E., Martín Olivera R., Santolaria Fernández F., Galindo Martín L., Abreu-González P., González Hernández T., Valladares Parrilla F. Protein deficiency and muscle damage in carbon tetrachloride induced liver cirrhosis. *Food Chem Toxicol.* 2003 Dec;41(12):1789-97.

.-Ma X., Baraona E., Lieber CS. Alcohol consumption enhances fatty acid omega-oxidation, with greater increase in male than in female rats. *Hepatology.* 1993 Nov;1247-53.

.-Maher JJ. Hepatic fibrosis caused by alcohol. *Semin Liver Dis.* 1990 Feb;10(1):66-74.

.-Maher JJ. Interactions between hepatic stellate cells and the immune system. *Semin Liver Dis.* 2001 Aug;21(3):417-26.

.-Maher JJ., Tzagarakis C., Gimenez A. Malondialdehyde stimulates collagen production by hepatic lipocytes only upon activation in primary culture. *Alcohol Alcohol.* 1994 Sep;29(5):605-10.

.-Maher JJ. Alcoholic steatosis and steatohepatitis. *Semin Gastrointest Dis.* 2002 Jan;13(1):31-9.

.-Manari AP., Preedy VR., Peters TJ. Nutritional intake of hazardous drinkers and dependent alcohol in the UK. *Addict Biol.* 2003 Jun;8(2):201-10.

.-Marie P. Growth factors and bone formation in osteoporosis: roles of IGF-1 and TGF-beta. *Rev Rhum Engl Ed.* 1997 Jan ;64(1):44-53.

.-Martin F., Peters TJ. Alcoholic muscle disease. *Alcohol Alcohol.* 1985; 20(2):125-36.

.-Martin F., Ward K., Slavin G., Levi J., Peters TJ. Alcoholic skeletal myopathy, a clinical and pathological study. *Q J Med.* 1985b Jun;55(218):233-51.

.-Martin FC., Slavin G., Levi AJ., Peters TJ. Investigation of the organelle pathology of skeletal muscle in chronic alcoholism. *J Clin Pathol.* 1984 Apr;37(4):448-54.

.-Martinez Riera A., Santolaria Fernández F., Gonzalez Reimers E., Milena A., Gomez Sirvent JL., Rodríguez Moreno F., Gonzalez Martín I., Rodríguez Rodríguez E. Alcoholic hypogonadism: hormonal response to clomiphene. *Alcohol.* 1995 Nov-Dec;12(6):581-7.

.-Matkovic V., Heaney RP. Calcium balance during human growth: evidence of threshold behavior. *Am J Clin Nutri.* 1992;55:992-996.

.-Medeiros D., Ilich J., Ireton J., Matkovic V., Shiry L., Wildman R. Femurs of rats fed diets deficient in copper or iron have decreased mechanical strength and altered mineral composition. *Trace Elem Exp Med.* 1997;10:197-203.

.-Medina R., Wing SS., Goldbreg AL. Increase in levels of polyubiquitin and proteasome mRNA in skeletal muscle during starvation and denervation atrophy. *Biochem J.* 1995 May;307(Pt 3):631-7.

.-Mendenhall Cl., Anderson S., Weesner RE., Goldberg SJ., Cronic KA. Protein-calorie malnutrition associated with alcoholic hepatitis: Veterans Administration Cooperative Study Group on Alcoholic Hepatitis. *Am J Med.* 1984 Feb;76(2):211-22.

.-Mendehhall CL., Seeff L., Diehl AM., Ghosn SJ., French SW., Gartside PS., Rouster SD., Buskell-Bales Z., Grossman CJ., Roselle GA. Antibodies to hepatitis B virus and hepatitis C virus In alcoholic hepatitis and cirrhosis: their prevalence and

clinical relevance. The VA Cooperative Study Group (No.119). *Hepatology*. 1991 Oct; 14(4 Pt 1):581-9.

.-Mills KR., Ward K., Martin F., Peters TJ. Peripheral neuropathy and myopathy in chronic alcoholism. *Alcohol Alcohol*. 1986;21(4):357-62.

.-Mitch WE., Goldberg AL. Mechanisms of muscle wasting. The role of ubiquitin-proteasome pathway. *N Engl J Med*. 1996 Dec;335(25):1897-905.

.-Mobarhan SA., Rusell RM., Recker RR., Posner BD., Iber FL., Miller P. Metabolic bone disease in alcoholic cirrhosis: a comparison of effects of vitamin D<sub>2</sub>, 25-hydroxyvitamin D, or supportive treatment. *Hepatology*. 1984 Mar-Apr;4(2):266-73.

.-Molina PE., McClain C., Valla D., Guidot D., Diehl AM., Lang CH., Neu M. Molecular pathology and clinical aspects of alcohol-induced tissue injury. *Alcohol Clin Exp Res*. 2002 Jan;26(1):120-8.

.-Molina Pérez M., González Reimers E., Santolaria Fernández F., Martínez Riera A., Rodríguez Moreno F., Rodríguez Rodríguez E., Milena Abril A., Velazco Vazquez J. Relative and combined effects of ethanol and protein deficiency on bone histology and mineral metabolism. *Alcohol*. 2000 Jan;20(1):1-8.

.-Moonga BS., Dempster DW. Zinc is a potent inhibitor of osteoclastic bone resorption in vitro. *J Bone Miner Res*. 1995 Mar;10(3):453-7.

.-Morales AE., Perez Jimenez A., Hidalgo MC., Abellan E., Cardenete G. Oxidative stress and antioxidant defenses after prolonged starvation in Dentex dentex liver. *Comp Biochem Physiol C toxicol Pharmacol*. 2004 Oct;139(1-3):153-61.

.-Morgan MY., Ross MG., Ng CM., Adams DM., Thomas HC., Sherlock S. HLA-B8 Immunoglobulins and antibody responses in alcohol related liver disease. *J Clin Pathol*. 1980;33:488-92.

.-Muller O., Garenee M., Reitmaier P., Van Zweeden AB., Kouyate B., Becher H. Effects of zinc supplementation on growth in West African children: a randomized double-blind placebo-controlled trial in rural Burkina Faso. *Int J Epidemiol*. 2003 Dec;32(6):1098-102.

.-Mussolino ME., Looker AC., Madans JH., Langlois JA., Orwoll ES. Risk factors for hip fracture in white men: The NHANES I Epidemiologic Follow-up Study. *J Bone Miner Res*. 1998 Jun;13(6):918-24.

.-Muzzo S., Leiva L., Lillo R., Pumarino H., Ernst R., Burrows R. Bone mineralization in adolescent suffering from postnatal nutrition. *Arch Latinoam Nutr*. 1995 Sep;45(3):183-6.

.-Nakahara T., Hashimoto K., Hirano M., Koll M., Martín CR., Preedy VR. Acute and chronic effects of alcohol exposure on skeletal muscle c-myc, p53, and Bcl-2 mRNA expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003 Dec;285(6):E1273-81.

.-Nanji AA., Miao L., Thomas P., Rahemtulla A., Khwaja S., Zhao S., Peters D., Tahan SR., Dannenberg AJ. Enhanced cyclooxygenase-2 gene expression in alcoholic liver disease in the rat. *Gastroenterology*. 1997a Mar;112(3):943-51.

.-Nanji AA., Khwaja S., Rahemtulla A., Miao L., Zhao S., Tahan SR. Tromboxane inhibitors attenuate pathological changes in alcoholic liver disease in rat. *Gastroenterology*. 1997b Jan;112 (1):200-7.

.-Navarro Rodriguez MC., Sosa Henriquez M., Font de Mora Turan A., Novoa FJ., Gomez Diaz J., Betancort Leon P. Trace elements and chronic alcoholism. *Trace Elements*. 1986;3:164-7.

.-Naveau S, Giraud V., Borotto E., Aubert A., Capron F., Chaput JC. Excess weight risk factor for alcoholic liver disease. *Hepatology* 1997 Jan;25(1):108-11.

.-Nicolas JM., Antúnez E., Thomas AP., Fernández Sola J., Tobias E., Estruch R., Urbano-Márquez A. Etanol acutely decreases calcium transients in culture human myotubes. *Alcohol Clin Exp Res*. 1998 Agu;22(5):1086-92.

.-Nicolas JM., Estruch R., Antunez E., Sacanella E., Urbano Marquez A. Nutritional status in chronically alcoholic men from the middle socioeconomic class and its relation to ethanol intake. *Alcohol Alcohol*. 1993 Sep;28(5):551-8.

.-Nicolas JM., Fernández Sola J., Fatjo F., Casamitjana R., Bataller R., Sacanella E., Tobias E., Badia E., Estruch R. Increased circulating leptin levels in chronic alcoholism. *Alcohol Clin Exp Res*. 2001 Jan;25(1):83-8.

.-Nicolas JM., García G., Fatjo F., Sacanella E., Tobias E., Badia E., Estruch R., Fernández Sola J. Influence of nutritional status on alcoholic myopathy. *Am J Clin Nutr*. 2003 Aug;78(2):326-33.

.-Niemela O., Parkkila S., Yla-Herttuala S., Halsted C., Witztum JL., Lanca A., Israel Y. Covalent protein adducts in the liver as a result of ethanol metabolism and lipid peroxidation. *Lab Invest*. 1994;70 (4):537-46.

.-Niemela O., Parkkila S., Koll M., Preedy VR. Generation of protein adducts with malondialdehyde and acetaldehyde in muscles with predominantly type I and type II fibers in rats exposed to ethanol and acetaldehyde dehydrogenase inhibitor cyanamide. *Am J Clin Nutri* . 2002 Sep;76(3):668-74.

.-Nieto N., Friedman SL., Cederbaum AI. Stimulation and proliferation of primary rat hepatic stellate cells by cytochrome P450 2E1-derived reactive oxygen species. *Hepatology*. 2002 Jan;35(1):62-73.

.-Nieto N., Friedman SL., Greenwel P., Cederbaum AI. CYP2E1-mediated oxidative stress induces collagen type I expression in rat hepatic stellate cells. *Hepatology*. 1999 Oct;30(4):987-96.

.-Ninh NX., Thissen JP., Collete L., Gerard G., Khoi HH., Ketelslegers JM. Zinc supplementation increases growth and circulating insulin growth factor I (IGF-1) in growth-retarded Vietnamese children. *Am J Clin Nutr.* 1996 Apr;63(4):514-9.

.-Norii T., Suzuki H. Influence of dietary protein levels and phytate contents on zinc requirement in rats. *Int J Food Sci Nutr.* 2002 Jul;53(4):317-23.

.-Nyquist F., Ljunghall S., Berglund M., Obrant K. Biochemical markers of bone mineral metabolism after short and long time ethanol withdrawal in alcoholics. *Bone* 1996 Jul;19(1):51-4.

.-Oh SI., Kim CI., Chun HJ., Lee MS., Park SC. Glutathione recycling is attenuated by acute ethanol feeding in rat liver. *J Korean Med Sci.* 1997 Aug;12(4):316-21.

.-Ohlendieck K., Harmon S., Koll M., Paica AG., Preedy VR. Ca<sup>2+</sup>-regulatory muscle proteins in the alcohol-fed rat. *Metabolism.* 2003 Sep;52(9):1102-12.

.-Oppenheim WL. The "battered alcoholic syndrome". *J Trauma.* 1977 Nov;17(11):850-856.

.-Orrego H., Blake JE., Blendis LM., Compton KV., Volpe R., Israel Y. Long-term treatment of alcoholic liver disease with propylthiouracil. Part 2: Influence of drop out rates and continued alcohol consumption in a clinical trial. *J Hepatol.* 1994 Mar;20(3): 343-9.

.-Oster MH., Fielder PJ., Levin N., Cronin MJ. Adaptation of the growth hormone and insulin-like growth factor-I axis to chronic and severe calorie or protein malnutrition. *J Clin Invest.* 1995 May;95(5):2258-65.

.-Ozturk A., Baltaci AK., Mogulkoc R., Oztekin E., Sivrikaya A., Kurtoglu E., Kul A. Effects of zinc deficiency and supplementation on malondialdehyde and glutathione levels in blood and tissues of rats performing swimming exercise. *Biol Trace Elem Res.* 2003 Aug;94(2):157-66.

.-Pacy PJ., Preedy VR., Peters TJ., Read M., Halliday D. The effect of chronic alcohol ingestion on whole body and muscle protein synthesis- a stable isotope study. *Alcohol Alcohol.* 1991;26(5-6):505-13.

.-Passeri G., Pini G., Troiano L., Vescovini R., Sansoni P., Passeri M., Guerresi P., Delsignori., Pedrazzoni M., Franceschi C. Low vitamin D status, high bone turnover, and bone fractures in centenarians. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003 Nov;88(11):5109-15.

.-Pathak A., Mahmood A., Pathak R., Dhawan D. Effect of zinc on hepatic lipid peroxidation and antioxidative enzymes in ethanol-fed rats. *J Appl Toxicol.* 2002 May-Jun;22(3):207-10.

.-Peris P., Pares A., Guanabens N., Del Rio L., Pons F., Martinez de Osaba m., Monegal A., Caballeria J., Rodes J., Muñoz Gomez J. Bone mass improves in alcoholics after 2 years of abstinence. *J Bone Miner Res.* 1994 Oct;9(10):1607-12.

.-Perrien DS., Brown EC., Fletcher TW., Irby DJ., Aronson J., Gao GG., Skinner RA., Hogue WR., Feige U., Suva LJ., Ronis MJ., Badger TM. and Lumpkin CK. Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor Antagonists attenuate ethanol induced inhibition of bone formation in a rat model of distraction osteogenesis. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2002 Dec;303(3):904-8.

.-Perrone L., Salerno M., Gialanella G., Feng SL., Moro R., Di Lascio R., Boccia E., Di Toro R. Long-term zinc and iron supplementation in children of short stature: effect on growth and on trace element content in tissues. *J Trace Elem Med Biol*. 1999 Jul;13(1-2):51-6.

.-Petrides AS., Stanley T., Matthews DE., Vogt C., Bush AJ., Lambeth H. Insulin resistance in cirrhosis: prolonged reduction in hyperinsulinemia normalizes insuli sensivity. *Hepatology*. 1998 Jul;28(1):141-9.

.-Pfeifer M., Begerow B., Minne HW. Vitamin D and muscle function. *Osteoporos Int*. 2002 Mar;13(3):187-94.

.-Polavarapu R., Spitz DR., Sim JE., Follansbee MH., Oberley LW., Rahemtulla A., Nanji AA. Increased lipid peroxidation and impaired antioxidant anzyme function is associated with pathological liver injury in experimental alcoholic liver disease in rats fed diets high in corn oil and fish oil. *Hepatology*. 1998 May;27(5):1317-23.

.-Powell SR. The antioxidant properties of zinc. *J Nutr*. 2000;130:1447S-54S.

.-Prasad AS., Miale A., Farid Z. Biochemical studies on dwarfism, hypogonadism and anemia. *Arch Intern Med*.1967;67:183.

.-Preedy VR., Baldwin DR., Keating JW., Salisbury JR. Bone collagen, mineral and trace element compotition, histomorphometry and urinary hidroxiproline excretion in chronically-treated alcohol fed rats. *Alcohol Alcohol*. 1991;26(1):39-46.

.-Preedy VR., Adachi J., Ueno Y., Ahmed S., Mantle D., Mullati N., Rajendram R. Alcoholic skeletal muscle myopathy: definitions, features, contribution of neuropathy, impact and diagnosis. *Eur J Neurol*. 2001a Nov;8(6):677-87.

.-Preedy VR., Gove CD., Panos MZ. Liver histology, blood biochemistry and RNA, DNA and subcelular protein composition of varius skeletal muscles of rats with experimental cirrhosis: implications for alcoholic muscle disease. *Alcohol alcohol*. 1990b;25:641-9.

.-Preedy VR., Paice A., Mantle D., Dhillon AS., Palmer TN., Peters TJ. Alcoholic myopathy: biochemicals mechanism. *Drug Alcohol Depend*. 2001b Aug; 63(3):199-205.

.-Preedy VR., Patel VD., Reilly ME., Richardson PJ., Falkous G., Mantle D. Oxidants, antioxidants and alcohol: implications for skeletal and cardiac muscle. *Front Biosci*. 1999b Aug;4:e58-66.

.-Preedy VR., Peters TJ. Alcohol and skeletal muscle disease. *Alcohol Alcohol.* 1990a;25(2-3):177-87.

.-Preedy VR., Peters TJ. The effect of chronic ethanol ingestion on protein metabolism in type-I and type-II-fibre-rich skeletal muscle of the rat. *Biochem J.* 1988 Sep;254(3):631-9.

.-Preedy VR., Peters TJ., Patell VB., Miell JP. Chronic alcoholic myopathy: transcription and translational alterations. *FASEB J.* 1994b Nov;8(14):1146-51.

.-Preedy VR., Reilly ME., Patel VD., Richardson PJ., Peters TJ. Protein metabolism in alcoholism: effects on specific tissues and the whole. *Nutrition.* 1999a Jul-Aug;15(7):604-8.

.-Preedy VR., Salisbury JR., Peters TJ. Alcoholic muscle disease: features and mechanisms. *J Pathol.* 1994a Aug;173(4):309-15.

.-Pumarino H., González P., Oviedo S., Lillo R., Bustamante E. Assessment of bone status in intermittent and continuous alcoholics, without evidence of liver damage. *Revista Medica de Chile.* 1996 Apr;124(4):423-30.

.-Ragab AA., Nalepka JL., Bi Y., Greenfield EM. Cytokines synergistically induce osteoclast differentiation: support by immortalized or normal calvarial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002 Sep;283(3):C679-87.

.-Raynard B., Balian A., Fallik D., Capron F., Bedossa P., Chaput JC., Naveau S. Risk factors of fibrosis in alcoholic induced liver disease. *Hepatology.* 2002 Mar;35(3):635-8.

.-Reed AH., McCarty HL., Evans GL., Turner RT., Westerlind KC. The effect of chronic alcohol consumption and exercise on the skeleton of adult male rats. *Alcohol Clin Exp Res.* 2002 Aug;26(8):1269-74.

.-Reid MB., Li YP. Tumor necrosis factor-alpha and muscle wasting: a cellular perspective. *Respir Res.* 2001;2(5):269-72.

.-Rennie MG., Edwards RH., Halliday D. Muscle protein synthesis measured by stable isotope techniques in men, the effects of feeding and fasting. *Clin Sci.* 1982;63:519-23.

.-Rico H. Alcohol and bone disease. *Alcohol Alcohol.* 1990;25(4):345-52.

.-Rico H., Arribas I., Casanova FJ., Duce AM., Hernández ER., Cortés-Prieto J. Bone mass, bone metabolism, gonadal status and body mass index. *Osteoporos Int.* 2002 May;13(5):379-87.

.-Rivera J., Ruel MT., Santizo MC., Lönnerdal B., Brown KH. Zinc supplementation improves the growth of stunted rural Guatemalan infants. *J Nutr.* 1998 Mar;128(3):556-62.

.-Rizzoli R., Ammann P., Chevalley T., Bonjour JP. Protein intake and bone disorder in the elderly. *Joint Bone Spine*. 2001 Oct;68(5):383-92.

.-Rodríguez Rodríguez E., González Reimers E., Santolaria Fernández F., Milena Abril A., Rodríguez Moreno F., Oramas Rodríguez J., Martínez Riera A. Cytokine levels in acute alcoholic hepatitis: a sequential study. *Drug Alcohol Depend*. 1995 Jul;39(1):23-7.

.-Rojkind M., Dunn MA. Hepatic fibrosis. *Gastroenterology*. 1979 Apr;76(4):849-63.

.-Rolla R., Vay D., Mottaran E., Parodi M., Traverso N., Arico S., Sartori M., Bellomo G., Klasen LW., Thiele GM., Tuma DJ., Albano E. Detection of circulating antibodies against malondialdehyde-acetaldehyde adducts in patients with alcohol-induced liver disease. *Hepatology*. 2000 Apr;31(4):878-84.

.-Romero JC., Santolaria F., González Reimers E., Díaz-Flores L., Conde A. Chronic alcoholic myopathy and nutritional status. *Alcohol*. 1994 Nov-Dec;11(6):549-55.

.-Ross AD., Varghese G., Oporto B., Carmichael FJ., Israel Y. Effect of propylthiouracil treatment on NADPH-cytochrome P450 reductase levels, oxygen consumption and hydroxyl radical formation in liver microsomes from rat fed ethanol or acetona chronically. *Biochem Pharmacol*. 1995 Mar;49 (7):979-89.

.-Rouach H., Fataccioli V., Gentil M., French SW., Morimoto M., Nordmann R. Effect of chronic ethanol feeding on lipid peroxidation and protein oxidation in relation to liver pathology. *Hepatology*. 1997 Feb;25(2):351-5.

.-Russell JA. Osteomalacic myopathy. *Muscle Nerve*. 1994 Jun;17(6):578-80.

.-Ruz M., Castillo-Durán C., Lara X., Codoceo J., Rebolledo A., Atalah E. A 14-mo zinc supplementation trial in apparently healthy Chilean preschool children. *Am J Clin Nutr*. 1997 Dec;66(6):1406-13.

.-Sacanella E., Fernández Sola J., Cofan M., Nicolas JM., Estruch R., Antunez E., Urbano-Márquez A. Chronic alcoholic myopathy : diagnostic clues and relationship with other ethanol-related diseases. *QJM*. 1995 Nov;88(11):811-7.

.-Sadrzadeh SM., Nanji AA., Price PL. The oral iron chelator, 1,2-dimethyl-3-hydroxypyrid-4-one reduces hepatic-free iron, lipid peroxidation and fat accumulation in chronically ethanol-fed rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994 May;269(2):632-6.

.-Salisbury JR., Preedy VR., Rose PE., Deverell MH., Peters TJ. Ethanol-induced chronic myopathy in the young rat: a light and electron microscopic study in type I or type II fibre-rich skeletal muscles. *Alcohol Alcohol*. 1992 Sep;27(5):493-500.

.-Sampson HW, Gallager S., Lange J., Chondra W., Hogan HA. Binge drinking and bone metabolism in the young actively growing rat model. *Alcohol Clin Exp Res*. 1999 Jul;23(7):1228-31.

.-Sampson HW. Effect of alcohol consumption on adult and aged bone: a histomorphometric study of the rat animal model. *Alcohol Clin Exp Res.* 1998 Dec;22(9):2029-34.

.-Sampson HW., Hebert VA., Booe HL., Champney TH. Effect of alcohol consumption on adult and aged bone: composition, morphology, and hormone levels of a rat animal model. *Alcohol Clin Exp Res.* 1998a Nov;22(8):1746-53.

.-Santolaria Fernández F., Gonzalez Garcia C., Gonzalez Reimers E., Garcia Abreu JJ., Batista Lopez N., Jorge Hernández J., Hernández Nieto L., Bueno Gomez J. Alteraciones en el metabolismo de los hidratos de carbono en la cirrosis hepática. II. Niveles de insulinemia. *Rev Esp Enf Ap Digest.* 1983;63(2):163-71.

.-Santolaria F., Gonzalez Gonzalez G., Gonzalez Reimers E., Martinez Riera A., Milena A., Rodríguez Moreno F., Gonzalez Garcia C. Effects of alcohol and liver cirrosis o the GH-IGF-1 axis. *Alcohol Alcohol.* 1995 Apr;30(6):703-8.

.-Santolaria F., González-Reimers E., Pérez Manzano JL., Milena A., Gómez-Rodríguez MA., González Díaz A., De la Vega MJ., Martínez Riera A. Osteopenia assessed by body composition análisis is related to malnutrition in alcoholic patients. *Alcohol.* 2000b Nov;22(3):147-57.

.-Santolaria F., Perez Cejas A., Aleman MR., Gonzalez Reimers E., Milena A., de la Vega MJ., Martinez Riera A., Gomez Rodríguez MA. Low serum leptin levels and malnutrition chronic alcohol misusers hospitalized by somatic complications. *Alcohol Alcohol.* 2003 Jan-Feb;38(1):60-6.

.-Santolaria F., Pérez Manzano JL., Milena A., González Reimers E., Gómez Rodríguez MA., Martínez Riera A., Alemán Valls MR., de la Vega Prieto MJ. Nutritional assesment in alcoholic patients. Its relationship with alcoholic intake, feeding habits, organic complications and social problems. *Drug Alcohol Depend.* 2000a Jun;59(3):295-304.

.-Schuckit MA. Alcohol y alcoholismo. *Harrison. Principios de Medicina Interna.* Capítulo 386;2850-2856.

.-Schuckit MA., Daepfen JB., Tipp JE., Hesselbrock M., Bucholz KK. The clinical course of alcohol-related problems in alcohol dependent and non alcohol dependent drinking women and men. *J Stud Alcohol.* 1998 Sep;59(5):581-90.

.-Schurch MA., Rizzoli R., Slosman D., Vadas L., Vergnaud P., Bonjour JP. Protein supplements increase serum insulin-like growth factor-1 and attenuate proximal femur bone loss in patiens with recent hip fracture. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med.* 1998 May 15; 128(10):801-9.

.-Seco C., Revilla M., Hernández ER., Gervás J., González Riola J., Villa LF., Rico H. Effects of zinc supplementation on vertebral and femoral bone mass in rats on strenuous treadmill training exercise. *J Bone Miner Res.* 1998 Mar;13(3).508-513.

.-Sergent O., Morel I., Cogrel P., Chevanne M., Padeloup N., Brissot P., Lescoat G., Cillar P., Cillar J. Increase cellular pool of low-molecular-weight iron during ethanol metabolism in rat hepatocyte cultures. Relationship with lipid peroxidation. *Biol Trace Elem Res.* 1995 Jan-Mar;47(1-3):185-92.

.-Sherlock S., Dooley J. Anatomía y función. Diseases of the Liver and Biliary System. Novena edición. 1995. Capítulo 1:1-16.

.-Sheron N., Bird G., Koskinas J., Portmann B., Ceska M., Lindley I., Williams R. Circulating and tissue levels of the neutrophil chemotaxin Interleukin-8 are elevated in severe acute alcoholic hepatitis, and tissue levels correlate with neutrophil infiltration. *Hepatology.* 1993 Jul;18(1):41-6.

.-Smith-Kielland A., Aaseth J., Thomassen Y. Effect of long-term ethanol intake on the content of selenium in rat liver: relation to the rate of hepatic protein synthesis. *Acta Pharmacol Toxicol (Copen).* 1986 Mar;58(3):237-9.

.-Solis JA. Bases moleculares de la fibrosis hepática. *Gastroenterol Hepatol.* 1988;11:463-83.

.-Song MK., Adham NF. Role of prostaglandin E2 in zinc absorption in the rat. *Am J Physiol.* 1978;234:599.

.-Spotila LD., Colige A., Sereda L., Constantinou-Deltas CD., Whyte MP, Riggs BL., Shake K., Spetor TD., Hume E., Olsen N. et al. Mutation analysis of coding sequences for type I procollagen in individuals with low bone density. *J Bone Miner Res.* 1994;9:923-932.

.-Stal P., Hultcrantz R. Iron increase ethanol toxicity in rat liver. *J Hepatology.* 1993 Jan;17 (1):108-15.

.-Staron RS., Hikida RS., Hagerman FC., Dudley GA., Murria TF. Human skeletal muscle fiber type adaptability to various workloads. *J Histochem Cytochem.* 1984:146-52.

.-Sternlieb I. Copper and the liver. *Gastroenterology.* 1980 Jun;78(6):1615-28.

.-Svanberg E., Kiri A., Isgaard J., Goldspink G. Semi-starvation alters myofibrillar mRNA concentrations to expedite rapid recovery of muscle protein stores following feeding. *Eur J Clin Invest.* 2000 Aug;30(8):722-8.

.-Svegliati-Baroni G., Ridolfi F., Di Sario A., Saccomanno S., Bendia E., Benedetti A., Greenwel P. Intracellular signaling pathways involved in acetaldehyde-induced collagen and fibronectin gene expression in human hepatic stellate cells. *Hepatology.* 2001 May;35(5):1130-40.

.-Takahashi H., French SW., Wong PT. Alterations in hepatic lipids and protein by chronic ethanol intake: a high-pressure Fourier transform infrared spectroscopy study on alcoholic liver disease in the rat. *Alcohol Clin Exp Res.* 1991 Mar;15(2):219-23.

.-Teli MR., Day CP., Burt AD., Bennett MK., James OF. Determinants of progression to cirrhosis or fibrosis in pure alcoholic fatty liver. *Lancet*. 1995a Oct;346 (8981):987-90.

.-Teli MR., James OF., Burt AD., Bennett MK., Day CP. The natural history of non-alcoholic fatty liver: a follow-up study. *Hepatology*. 1995b Dec;22(6):1714-9.

.-Thiele MG., Duryee MJ., Willis MS., Sorrell MF., Freeman TL., Tuma DJ., Kalsen LW. Malondialdehyde-acetaldehyde (MAA) modified proteins induced pro-inflammatory and profibrotic responses by liver endothelial cells. *Comparative Hepatology*. 2004 Jan;3(suppl 1):S25.

.-Thun MJ., Peto R., Lopez AD., Monaco JH., Henley SJ., Heath CW Jr, Doll R. Alcohol consumption and mortality among middle-aged and elderly U.S. adults. *N Engl J Med*. 1997 Dec;337(24):1705-14.

.-Todd WR., Elvehjem CA., Hart EB. Zinc in the nutrition of the rat. *Am J Physiol*. 1934;107:146.

.-Trombetti A., Herrmann F., Hoffmeyer P., Schurch MA., Bonjour JP., Rizzoli R. Survival and potential years of life lost after hip fracture in men and aged-matched women. *Osteoporos Int*. 2002 Sep;13(9):731-7.

.-Trounce I., Byrne E., Dennett X. Biochemical and morphological studies of skeletal muscle in experimental chronic myopathy. *Acta Neurol Scand*. 1990 Dec; 82(26):386-91.

.-Tsukamoto H., Lin M., Ohata M., Giulivi C., French SW., Brittenham G. Iron primes hepatic macrophages for NF- $\kappa$ B activation in alcoholic liver injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 1999 Dec;277:G1240-G1250.

.-Tucker KL., Hannan MT., Chen H., Cupples LA., Wilson PW., Kiel DP. Potassium, magnesium, and fruit and vegetables intakes are associated with greater bone mineral density in elderly men and women. *Am J Clin Nutr*. 1999 Apr. 69(4):727-736.

.-Tucker KL. Dietary intake and bone status with aging. *Curr Pharm Des*. 2003;9(32):2687-704.

.-Tuma DJ. Role of malondialdehyde-acetaldehyde adducts in liver injury. *Free radical Biol Med*. 2002 Feb;32 (4):303-308.

.-Turner RT. Skeletal response to alcohol. *Alcohol Clin Exp Res*. 2000 Nov; 24(11):1693-701.

.-Turner RT., Evans GL., Zhang M., Sibonga JD. Effects of parathyroid hormone on bone formation in rat model for chronic alcohol abuse. *Alcohol Clin Exp Res*. 2001a May;25(5):667-71.

.-Turner RT., Kidder LS., Kennedy A., Evans GL., Sibonga JD. Moderate alcohol consumption suppresses bone turnover in adults female rats. *J Bone Miner Res.* 2001b Mar;16(3):589-94.

.-Turner RT., Sibonga JD. Effects of alcohol use and estrogen on bone. *Alcohol Res Health.* 2001c;25(4):276-81.

.-Uesugi T., Froh M., Arteel GE., Bradford BU., Thurman RG. Toll-Like receptor 4 is involved in the mechanism of early alcohol induced liver injury in mice. *Hepatology.* 2001 Jul;34(1):108-8.

.-Urbano-Márquez A., Estruch R., Fernández Sola J., Nicolas JM., Pare JC., Rubin E. The greater risk of alcoholic cardiomyopathy and myopathy in women compared with men. *JAMA.* 1995 Jul;274(2):149-54.

.-Urbano-Márquez A., Estruch R., Navarro López F., Grau JM., Mont L, Rubin E. The effects of alcoholism on skeletal and cardiac muscle. *N Engl J Med.* 1989 Feb; 320(7):409-15.

.-Valimaki MJ., Karkkainen M., Lamberg-Allardt C., Laitinen K., Alhava E., Heikkinen J., Impivaara O., Makela P., Palmgren J., Seppanen R. et al. Exercise, smoking, and calcium intake during adolescence and early adulthood as determinants of peak bone mass. Cardiovascular Risk in Young Finns Study Group. *BMJ.* 1994 Jul; 309(6949):230-5.

.-Van Thiel DH., Gavaler JS., Eagon PK., Chiao YB., Cobb CF., Lester R. Alcohol and sexual function. *Pharmacol Biochem Behav.* 1980;13 Suppl 1:125-9.

.-Vary TC., Nairn AC., Lang CH. Restoration of protein synthesis in heart and skeletal muscle after withdrawal of alcohol. *Alcohol Clin Exp Res.* 2004 Apr;28(4):517-25.

.-Vernet M., Cadafau JA., Balague A., Grau JM., Urbano-Márquez A.,Cusso R. Effect of chronic alcoholism on human glycogen and glucose metabolism. *Alcohol Clin Exp Res.* 1995 Oct;19(5):1295-9.

.-Villalta J., Balleca JL., Nicolas JM., Martínez de Osaba MJ., Antunez E., Pimentel C. Testicular function in asymptomatic chronic alcoholics: relation with intake. *Alcohol Clin Exp Res.* 1997 Feb;21(1):128-33.

.-Visser M., Kiel DP., Langlois J., Hannan MT., Felson DT., Wilson PW., Harris TB. Muscle mass and fat mass in relation to bone mineral density in very old men and women: The Framingham Heart Study. *Appl Radiat Isot.* 1998 May-Jun;49(5-6):745-7.

.-Ward RJ., Peters TJ. The antioxidant status of patients with either alcohol-induced liver damage or myopathy. *Alcohol Alcohol.* 1992 Jul;27(4):359-65.

.-Weber FL. Jr., Macechko PT., Kelson SR., Karajiannis E., Hassan MO. Increased muscle protein catabolism caused by carbon tetrachloride hepatic injury in rats. *Gastroenterology.* 1992 May;102(5):1700-6.

.-Willis MS., Klassen LW., Tuma DJ., Sorrell MF., Thiele GM. Adduction of soluble proteins with malondialdehyde-acetaldehyde (MAA) induces antibody production and enhances T-cell proliferation. *Alcohol Clin Exp Res.* 2002 Jan; 26(1):94(106).

.-Wilson JS., Korsten MA., Lieber CS. The combined effects of protein deficiency and chronic ethanol administration on rat ethanol metabolism. *Hepatology.* 1986 Sep-Oct;6(5):823-9.

.-Wing SS., Haas AL., Goldberg AL. Increase in ubiquitin-protein conjugates concomitant with the increase in proteolysis in rat skeletal muscle during starvation and atrophy denervation. *Biochem J.* 1995 May;307(Pt 3):639-45.

.-Yamaguchi M., Kishi S. Zinc compounds inhibits osteoclast-cell formation at the earliest stage rat marrow culture but not osteoclast function. *Mol Cel Biochem.* 1996 may;158(2):171-7.

.-Yamaguchi M., Matsui R. Effect of dipicolinate, a chelator of zinc, on bone protein synthesis in tissue culture. The essential role of zinc. *Biochem Pharmacol.* 1989 Dec;38(24):4485-9.

.-Yamaguchi M., Yamaguchi R. Action of zinc on bone metabolism in rats. Increases in alkaline phosphatase activity and DNA content. *Biochem Pharmacol.* 1986b Mar;35(5):773-7.

.-Yamaguchi M., Inamoto K. Differential effects of calcium-regulating hormones on bone metabolism in weaning rats orally administered zinc sulfate. *Metabolism.* 1986a Nov;35(1):1044-7.

.-Yang C., Zeisberg M., Mosterman B., Sudhakar A., Yerramalla U., Holtha K., Xu L., Eng F., Afdhal N., Kalluri R. Liver fibrosis: Insights into migration of hepatic stellate cells in response to extracellular matrix and growth factors. *Gastroenterology.* 2003 Jan;124(1):147-59.

.-Yang SQ., Lin HZ., Lane MD., Clemens M., Diehl AM. Obesity increase sensitivity to endotoxin liver injury: implications for the pathogenesis of steatohepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997 Mar;94 (6):2557-62.

.-Yin M., Gabele E., Wheeler MD., Connor H., Bradford BU., Dikalova A., Rusyn I., Mason R., Thurman RG. Alcohol-induced free radicals in mice: direct toxicants or signaling molecules?. *Hepatology.* 2001 Nov;34(5):935-42.

.-Yin M., Wheeler MD., Kono H., Bradford BU., Gallucci RM., Luster MI., Thurman RG. Essential role of tumor necrosis factor alpha in alcohol-induced liver injury in mice. *Gastroenterology.* 1999 Oct;117(4):942-52.

.-Yin SJ., Chou CF., Lai CL., Lee SL., Han CL. Human class IV alcohol dehydrogenase: Kinetic mechanism, functional roles and medical relevance. *Chem Biol Interact.* 2003 Feb;143-144:219-27.

.-Zhang J., Dai J., Habib P., Murtha J., Fu Z., Yao Z., Qi Y., Keller ET. Osteoprotegerin abrogates chronic alcohol ingestion-induced bone loss in mice. *J Bone Miner Res.* 2002 Jul; 17(7):1256-63.

.-Zhou Z., Sun X., Lambert JC., Saari JT., Kang YJ. Metallothionein-independent zinc protection from alcoholic liver injury. *Am J Pathol.* 2002 Jun; 160(6):2267-74.

.-Zima T., Fialova L., Mestek O., Janebova M., Crkovska J., Malbohan I., Stipek S., Mikulikova L., Popov P. Oxidative stress, metabolism of ethanol and alcohol-related diseases. *J Biomed Sci.* 2001 Jan-Feb;8(1):59-70.