

Curso 2012/13
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/36
I.S.B.N.: 978-84-15939-08-5

MARÍA JOSÉ MONEDERO PRIETO

**Efectos del selenio sobre las alteraciones hepáticas
inducidas por alcohol y malnutrición proteica**

Directores

**EMILIO GONZÁLEZ REIMERS
FRANCISCO VALLADARES PARRILLA
MARÍA DEL CARMEN DURÁN CASTELLÓN
JOSÉ MARÍA GONZÁLEZ PÉREZ**



SOPORTES AUDIOVISUALES E INFORMÁTICOS
Serie Tesis Doctorales

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Emilio González Reimers, por confiar en mí para de realizar este trabajo, por sus conocimientos y su paciencia hacia los que tenemos tanto que aprender. Por seguir teniendo ganas de enseñar, a pesar de que no siempre se lo pongamos fácil.

A mis codirectores de tesis, el Dr. Francisco Valladares, por su inestimable ayuda para poner en marcha este proyecto, a la Dra. María del Carmen Durán, y al Dr. Jose María González.

Al Dr. Luis Galindo Martín, por su gran colaboración para la determinación de los oligoelementos y por enseñarme que, aunque parezca imposible, la química es divertida.

Al Dr. Antonio Martínez Riera, por hacerme sonreír siempre y por su cariño. A él y al Dr. Francisco Santolaria, por haberme visto crecer profesionalmente y ayudarme a confiar en mis capacidades.

Muchas gracias en especial a José María, ya esta vez como amigo y compañero, y a Pepe, por ayudarme en todos los pasos del camino, desde el principio hasta el final a lo largo de estos años, y por compartir y suavizar los malos momentos. Espero que sigan ayudándome a mejorar y aprender cada día del camino. A Patri y a Paloma por aguantar los daños colaterales.

A mi familia, por ayudarme a mantener los pies en el suelo y por tener siempre una palabra de ánimo para mí. A mis Padres por enseñármelo todo, entre otras muchas cosas que aunque duro, el trabajo siempre tiene su recompensa.

Y a Onán. Por su ayuda en las grandes y en las pequeñas cosas, y por tratar de enseñarme a mantener la calma y ser paciente.

“¿Ves, Momo?

A veces tienes ante ti una calle que te parece terriblemente larga y que nunca podrás terminar de barrer. Entonces te empiezas a dar prisa, cada vez más prisa. Cada vez que levantas la vista, ves que la calle sigue igual de larga, y te esfuerzas más aún.

Empiezas a tener miedo, al final te has quedado sin aliento. Y la calle sigue estando por delante.

Así no se debe hacer. Nunca se ha de pensar en toda la calle de una vez, ¿entiendes? Hay que pensar en el paso siguiente, en la siguiente barrida. Entonces es divertido: eso es muy importante, porque entonces se hace bien la tarea. Y así ha de ser. De repente, se da uno cuenta de que, paso a paso, se ha barrido toda la calle. Uno no se da cuenta de cómo ha sido, y no se queda sin aliento.”

- Momo. (Michael Ende, 1973).

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

Acetil-CoA	=	<i>Acetil Coenzima A</i>
ACT	=	<i>Activación</i>
ACTH	=	<i>Adrenocorticotropic hormone</i>
ADH	=	Alcohol deshidrogenasa
ADN	=	Ácido desoxirribonucleico
AL	=	Grupo <i>ad libitum</i>
ALD	=	Alcoholic Liver Disease
ALDH	=	Aldehído deshidrogenasa
ARN	=	Ácido ribonucleico
ATP	=	adenosina tri-fosfato
CCl ₄	=	Tetracloruro de Carbono
CH ₃ CH ₂ OH	=	Etanol
CH ₃ CHO	=	Acetaldehído
CO ₂	=	Dióxido de Carbono
CTRL	=	Grupo Control
Cu	=	<i>Cobre</i>
CYP2E1	=	Citocromo P450 2 (familia) E (subfamilia) 1 (gen)
DTPA	=	Ácido dietilen-triaminopentaacético
EDTA	=	Ácido etilen-dinitrilo-tetraacético
ET	=	Endotelina
FAEE	=	<i>Fatty acid ethyl ester</i>
FDA	=	<i>Food and Drug Administration</i>
GOT	=	Glutamato oxalacetato transaminasa
GPT	=	Glutamato piruvato transaminasa
GPX	=	Glutación peroxidasa
GSH	=	<i>Glutation</i>
GSSG	=	Glutación disulfuro
HE	=	Hematoxilina Eosina
HER	=	Radical Hidroxietilo
HP	=	Grupo alimentado con dieta hipoproteica
HSC	=	Célula estrellada hepática
IFN- γ	=	<i>Interferón gamma</i>
IL	=	Interleukina
IMC	=	Índice de masa corporal
iNOS	=	Sintetasa de NO inducible
KC	=	<i>Kupffer cells</i>
K-W	=	<i>Kruskall-Wallis</i>
LDL	=	<i>Low density lipoprotein</i>

LPS	= <i>Lipopolisacárido</i>
MAT	= Metionina adenosiltransferasa
MCP	= Proteína quimiotáctica de monocitos
MEOS	= <i>Microsomal ethanol oxidizing system</i>
MFB	= Miofibroblastos
MIP	= Proteína inflamatoria de macrófagos
MMP	= Metaloproteasa matricial
NAD	= Nicotín-adenín dinucleótido
NADH	= Nicotín-adenín dinucleótido reducido
NADP	= Nicotín-adenín dinucleótido fosfato
NADPH	= Nicotín-adenín dinucleótido fosfato reducido
NFκB	= <i>Nuclear factor kappa B</i>
NO	= <i>Óxido Nítrico</i>
NS	= No significativo
OH	= Grupo tratado con alcohol
OHHP	= Grupo tratado con alcohol y alimentado con dieta hipoproteica
OMS	= Organización Mundial de la Salud
PDGF	= <i>Platelet-derived growth factor</i>
PNPLA3	= Patatin-like phospholipase domain-containing 3
ppb	= Partes por billón (10 ⁹)
ppm	= Partes por millón
PTFE	= Politetrafluoretilo
RNA _m	= ARN mensajero
ROS	= <i>Reactive oxygen species</i>
RPM	= <i>Revoluciones por minuto</i>
rT3	= Triyodotironina reversa
SAM	= S-adenosil- L-metionina
SD	= <i>Standard deviation</i>
Se	= Grupo tratado con selenio (al final del acrónimo de grupo)
Se-Cys	= Selenocisteína
Se-Met	= Selenometionina
SMF	= Sistema mononuclear fagocítico
SNK	= <i>Test de Student-Newmann-Keuls</i>
SOD	= Superóxido dismutasa
T3	= Triyodotironina
T4	= Tiroxina
TGF-β	= <i>Transforming growth factor beta</i>
TIMP	= Inhibidor tisular de las metaloproteasas
TLR	= <i>Toll-like receptor</i>
TNF-α	= <i>Tumor necrosis factor alpha</i>
TXA2	= Tromboxano A2
UCP	= <i>Uncoupling proteins</i>

VHB = *Virus de la Hepatitis B*
VHC = *Virus de la Hepatitis C*
VLDL = *Very low density lipids*
vs. = *Versus*

I. ÍNDICE

I. ÍNDICE.....	1
II. INTRODUCCIÓN	5
1. Metabolismo del Alcohol	8
1.1 Absorción del etanol.....	8
1.2 Distribución del etanol	9
1.3 Eliminación del etanol	10
1.4 Metabolismo del etanol	10
1.4.1. Vía de la Alcohol Deshidrogenasa	12
1.4.2. Vía del Sistema Microsomal de Oxidación del Etanol	14
1.4.3. Vía de la Catalasa	15
1.4.4. Metabolismo del Acetaldehído	17
1.4.5. Otras rutas metabólicas.....	18
2. Hepatopatía por Alcohol.....	20
2.1 Balonamiento hepatocitario.....	21
2.2 Hígado Graso	22
2.3 Necrosis e inflamación hepática.....	23
2.4 Fibrosis hepática	25
3. Papel oxidante del Alcohol en el daño hepático	34
3.1 Alcohol, estrés oxidativo y daño celular.....	36
3.2 Protección contra la toxicidad de los ROS.....	43
3.2.1 Mecanismos enzimáticos	43
3.2.2 Mecanismos no enzimáticos	44
4. Oligoelementos relacionados con la peroxidación lipídica y mecanismos antioxidantes.....	46
4.1 Hierro.....	46
4.2 Cobre	49
4.3 Manganeso	53
4.4 Zinc	54
4.5 Selenio	57
4.5.1 Absorción	57
4.5.2 Metabolismo del selenio.....	58
4.5.3 Funciones biológicas del selenio.....	61
4.5.4 Toxicidad por selenio	63
4.5.5 Selenio y enfermedad	64
III. OBJETIVOS	67
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	71
1. Población a estudio	73
1.1 Animales	73
1.2 Alimentación.....	73
2. Estudio de la sangre.....	77
2.1 Determinaciones serológicas	77

2.1.1 Determinación de selenio	77
2.1.2 Otras determinaciones.....	78
3. Estudio del hígado	78
3.1 Estudio histológico.....	78
3.2 Determinaciones enzimáticas.....	82
3.3 Determinación de oligoelementos	82
4. Determinaciones en orina.....	84
5. Análisis estadístico	84
V. RESULTADOS.....	87
1. Parámetros nutricionales	
1.1 Ingesta y Peso	89
1.2 Albúmina	90
2. Arquitectura Hepática	
2.1 Superficie Hepatocitaria	91
2.2 Superficie Nuclear	93
2.3 Grasa hepática	93
2.4 Fibrosis hepática.....	95
3. Antioxidantes	96
4. Oligoelementos	97
4.1 Oligoelementos en hígado.....	97
4.2 Selenio en suero	100
4.3 Oligoelementos en músculo	101
4.4 Excreción urinaria de oligoelementos.....	103
VI. DISCUSIÓN	107
1. Modelo dietético.....	109
2. Balonamiento hepatocitario y esteatosis	112
3. Superficie Nuclear	117
4. Fibrosis	118
5. Interacciones.....	119
VII. CONCLUSIONES.....	123
VIII. BIBLIOGRAFÍA	127

II. INTRODUCCIÓN

El consumo crónico excesivo de alcohol puede provocar alteraciones en la práctica totalidad de los órganos y sistemas del organismo. El hígado es la principal diana de su efecto tóxico probablemente debido a su papel central en el metabolismo de esta sustancia y a su condición de primera barrera frente a la invasión del torrente sanguíneo por gérmenes intestinales, que se favorece por la ingesta de alcohol, y en general frente a cualquier sustancia que llega desde el intestino. La célula de Kupffer es la encargada de detectar la presencia de gérmenes, respondiendo a ellos mediante su activación metabólica y la secreción de mediadores inflamatorios de diversa índole. Paralelamente, el alcohol absorbido llega al hepatocito y que ahí genera una serie de alteraciones metabólicas más o menos complejas, que van a justificar patogénicamente gran parte de las alteraciones observadas en el alcohólico crónico. En ambos casos se generan radicales oxigenados de alta reactividad metabólica (ROS, por sus siglas en inglés: *reactive oxygen species*), a los que se les atribuye, cada vez más, un papel relevante en la progresión de la enfermedad hepática e incluso en otras manifestaciones de la enfermedad alcohólica en órganos distantes.

Frente al exceso de ROS es imprescindible la preservación de los mecanismos antioxidantes, cuyo funcionamiento se ve comprometido en el alcohólico por varias razones: se consumen de forma excesiva al tener que neutralizar un exceso de ROS, los propios metabolitos del alcohol pueden comprometer la función antioxidante y algunos de esos sistemas dependen fuertemente de micronutrientes cuya absorción y metabolismo se ve alterado en el alcohólico crónico. Tal vez el más relevante de estos micronutrientes es el Selenio, un elemento cuya concentración sérica está fuertemente ligada a la actividad de la glutatión peroxidasa (GPX), principal efector antioxidante del organismo. Las concentraciones séricas y tisulares de selenio se encuentran frecuentemente descendidas en estos pacientes. Sin embargo, los estudios clínicos y experimentales arrojan resultados dispares acerca de la eficacia terapéutica de la adición de selenio a la dieta en el paciente alcohólico.

Por eso en este estudio hemos pretendido arrojar luz sobre esta cuestión, con el objetivo de clarificar los mecanismos por los que se establece la lesión hepática y el papel del selenio en los mismos.

Hemos organizado la introducción de este trabajo hablando inicialmente de las vías metabólicas que degradan el etanol, hemos dado un repaso de la patogenia de la hepatopatía etílica, con especial énfasis en los mecanismos que explican su desarrollo en relación con la peroxidación lipídica y en la evolución de las lesiones características de la hepatopatía alcohólica, y finalmente hemos expuesto qué papel juegan los diversos oligoelementos estudiados en este trabajo tanto en los mecanismos de peroxidación lipídica, como en los de defensa frente a la misma.

1. METABOLISMO DEL ALCOHOL

1.1.- Absorción del etanol .- El alcohol es una molécula ligera que se absorbe por difusión simple en el tracto digestivo tras la ingesta oral. Cuantitativamente el etanol se absorbe de forma principalmente en el intestino delgado. La duración media del proceso de absorción es de 1,7 minutos aproximadamente, aunque hay varios factores que pueden afectar a los procesos de incorporación-absorción (Holford, 1987), como pueden ser:

- *Cantidad de alcohol:* Existe una relación de "U" invertida entre la concentración del preparado etílico y la velocidad de absorción. Concentraciones entre el 15-30% se absorben más rápidamente que cantidades mayores o menores a estos límites (Álvarez-González y del-Río-Gracia, 2003).

- *Alteraciones del vaciamiento gástrico:* El tiempo que el alcohol permanece en el estómago permite su metabolismo a través de los sistemas enzimáticos propios, disminuyendo la cantidad de etanol que alcanza el intestino delgado.

- *Presencia de alimentos:* Los carbohidratos, grasas o proteínas dificultan la absorción del alcohol, ya que enlentecen el vaciamiento gástrico.

- *Características de la bebida consumida:* Las bebidas carbonatadas aceleran la absorción del alcohol.

- *Diferencias genéticas de enzimas del metabolismo del etanol:* Los diferentes polimorfismos de la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) pueden producir alteraciones en los niveles de etanol en sangre; esta enzima tiene una menor expresión en mujeres, facilitando que alcancen mayores concentraciones de alcoholemia que los varones ante un consumo similar de alcohol. También existen diferencias raciales en esta enzima, habiéndose encontrado una menor actividad de la ADH en la mucosa gástrica de los orientales respecto a los caucásicos.

- *Circulación sanguínea:* La concentración máxima de etanol en sangre es proporcional al nivel de circulación en la zona de absorción, ya que contribuye a mantener el gradiente y por tanto la difusión del alcohol. La administración de sustancias que modifican dicha circulación pueden producir cambios importantes en las concentraciones séricas de etanol.

- *Consumo de tabaco:* El consumo concurrente de tabaco y etanol parece producir una reducción en la concentración máxima de etanol, ya que produce un enlentecimiento del tránsito del paso de etanol de estómago a intestino (Johnson *et al.*, 1991).

Una vez consumido, el nivel máximo de etanol en sangre se alcanza a los 30-90 minutos tras la ingesta.

1.2.- Distribución del etanol.- El alcohol es una molécula hidrófila que se disuelve con mayor facilidad en el agua que en los lípidos, con una relación 30/1, distribuyéndose en el cuerpo de forma análoga al agua y con facilidad para atravesar las membranas corporales, incluyendo la barrera hematoencefálica y la membrana placentaria. La dificultad de paso al tejido graso induce diferencias en la distribución entre individuos según la proporción de grasa corporal a igualdad de peso y de la cantidad de etanol consumida. De este modo el volumen de distribución del etanol es diferente en hombres y mujeres debido al volumen de agua corporal $-0,7$ L/Kg en hombres respecto a $0,6$ L/Kg en mujeres- (Álvarez-González y del-Río-Gracia, 2003); además el incremento de la grasa corporal que se produce en los varones con la edad determina concentraciones séricas de alcohol mayores ante ingestas similares.

El alcohol accede con facilidad al torrente sanguíneo, vaporizándose en el aire a una velocidad constante; esto posibilita la estimación de concentraciones séricas de alcoholemia mediante controles de niveles en aire exhalado.

1.3.- Eliminación del etanol.- La mayor parte de la eliminación del etanol está mediada por su metabolismo (como se comentará más adelante), pero existe una proporción (entre el 2 y el 10%) que se elimina sin transformación a través de la orina, las heces, el sudor y el aire exhalado de forma no relacionada con el metabolismo (Álvarez-González y del-Río-Gracia, 2003). Existe una gran variabilidad entre la velocidad y las tasas de eliminación interindividual; la media de eliminación en la población es de 10-20 mg de etanol por cada 100 mL de sangre/hora. Esta velocidad se relaciona con la asiduidad de los episodios de ingesta, ya que con el aumento de éstos aumenta la capacidad metabólica y de eliminación al inducirse la actividad el Sistema Microsomal Oxidativo de Etanol (MEOS, por sus siglas en inglés). Otros factores que pueden alterar la eliminación del etanol son:

- *Factores genéticos:* polimorfismos dependientes de la expresión diferencial de los alelos que codifican la síntesis de enzimas de degradación del etanol.

- *Consumo de azúcares:* la fructosa puede incrementar la desaparición del etanol por cambios en la velocidad máxima de la función de la ADH (Brown *et al.*, 1972).

- *Fármacos:* el uso de contraceptivos orales reduce la eliminación de etanol hasta en un 20% (Jones y Jones, 1984); otros fármacos como el paracetamol o el ácido acetilsalicílico pueden interferir en el metabolismo del etanol al ser competidores del MEOS.

1.4.- Metabolismo del Etanol.- El 90% del etanol ingerido se metaboliza en el hígado, fundamentalmente mediante un proceso de oxidación convirtiéndose en acetaldehído. Esta transformación puede producirse por tres vías diferentes de las que hablaremos más adelante. En un segundo paso el acetaldehído es oxidado de nuevo en la mitocondria, transformándose principalmente en ácido acético por la acción de la

Aldehído Deshidrogenasa (ALDH) hepática. El tercer y último paso en el metabolismo del etanol es la transformación del ácido acético en acetil-coenzimaA (Acetil-CoA), permitiendo su incorporación a otras rutas metabólicas (Álvarez-González y del-Río-Gracia, 2003).

Las rutas de metabolismo del etanol se resumen en la Figura 1.

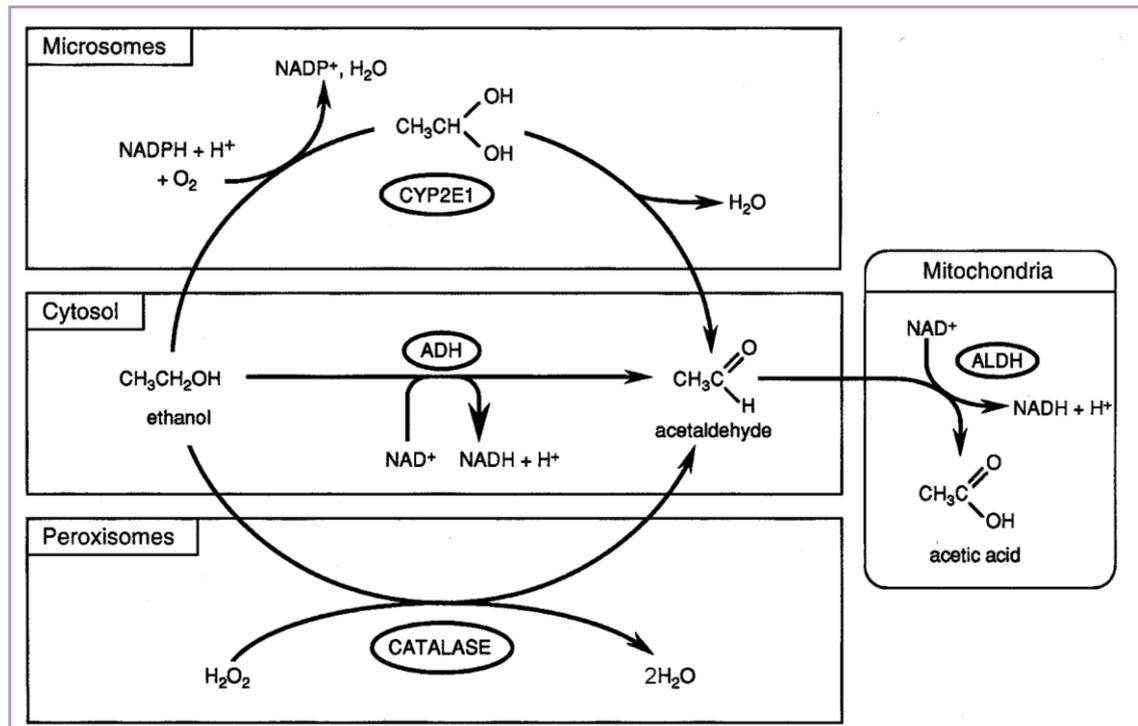


Figura 1: Metabolismo del alcohol. Imagen tomada de Tovar-Franco (2005) y modificada. Vías de la catalasa, alcohol deshidrogenasa y sistema microsómico oxidante del etanol y vía final común a las tres anteriores.

Existen indicios de metabolismo oxidativo del etanol a nivel extrahepático en diferentes órganos, como pueden ser el corazón, el estómago (Salmela *et al.*, 1996), los riñones (DeMaster *et al.*, 1986) y el cerebro (Cohen *et al.*, 1980). En estos casos el metabolismo está mediado por uno o más sistemas enzimáticos, con predominancia diferente según cada tejido.

Además de la producción de acetaldehído, a partir del metabolismo del alcohol consumido se ha descrito un metabolismo no oxidativo que produce los ésteres etílicos de los ácidos grasos (Goodman y Deyking, 1963; Mogelson y Lange 1984).

1.4.1.- Vía de la Alcohol-Deshidrogenasa.- La ADH es una metaloproteína dependiente de zinc (Auld y Bergman, 2008). Es una enzima citosólica de predominio hepático, con presencia variable en otros órganos, como pueden ser estómago, riñón, pulmón y cerebro -en este caso en menores cantidades- (Salmela *et al.*, 1996, DeMaster *et al.*, 1986, Cohen *et al.*, 1980 y Álvarez-González y del-Río-Gracia, 2003). Se ha sugerido la existencia de una asociación entre determinados polimorfismos de esta enzima con algunas enfermedades asociadas al alcoholismo, como puede ser la cirrosis hepática (Frenzer *et al.*, 2002).

En mamíferos se conocen seis isoenzimas de la ADH (I a VI) que se conforman como dímeros compuestos por 8 tipos de subunidades codificadas por los genes ADH 1-8 (Edenberg y Brown, 1992; Kitson y Weiner, 1996; Lieber, 1997). Cinco de estos genes (ADH 1-5) codifican las diferentes subunidades de la ADH hepática (α , β , γ , π , χ) que presentan polimorfismos asociados a cambios en su actividad, relacionándose con la variabilidad interindividual de este primer paso del metabolismo del alcohol, del desarrollo del alcoholismo y de la lesión hepática secundaria al alcohol (Salaspuro, 1999). Algunas de estas subunidades son específicas de alguna isoenzima concreta de la ADH y sus variaciones producen diferencias en las propiedades cinéticas de cada una (Kitson y Weiner, 1996; Lieber, 1997).

- Isoenzima I: Compuesta por subunidades α , β y γ (genes ADH1, ADH2 y ADH3). Tiene una alta afinidad por el etanol condicionando una velocidad metabólica alta. Se presenta de forma predominante en el hígado y condiciona la mayor parte del metabolismo del etanol en individuos con consumo esporádico de alcohol y en las fases iniciales del alcoholismo (Salaspuro, 1999).

- Isoenzima II: Es exclusiva del hígado y posee la subunidad π . Presenta menor afinidad por el etanol que la isoenzima I. En el caso de la isoenzima II se han encontrado diferentes alelos de la subunidad β según la raza (β_1 -población caucásiana-, β_2 -población oriental-, β_3 -poblaciones africanas) (Lieber, 1997).

- Isoenzima III: De localización ubicua y con menor afinidad por el etanol que la isoenzima I en condiciones fisiológicas, pero con una mejor función en el caso de concentraciones elevadas y crónicas de etanol, sustituyendo a la Isoenzima I tanto en el

etilismo crónico como en casos de hepatopatía avanzada (Haseba, 2009). Posee las subunidades χ y γ ($\gamma_1, \gamma_2, \gamma_3$)

- Isoenzima IV: Formada por subunidades μ/σ tiene una localización predominante en la mucosa gástrica, aunque también está presente en el hígado y en el tracto digestivo. Es una isoforma muy eficiente desde el punto de vista catalítico en los humanos tanto para la oxidación del etanol como para la del retinol. Es la responsable del primer paso del metabolismo del etanol en el estómago y participa en la síntesis de ácido retinoico, que se inhibe por el etanol (Salaspuro, 1999); esta disminución de síntesis puede contribuir a la patogenia del síndrome alcohólico-fetal y a la de la relación entre alcohol y cáncer de tracto digestivo alto (Yin *et al.*, 2003).

La acción de la isoenzima IV supone una protección frente a los efectos sistémicos del etanol, al contribuir a su metabolización en el estómago limitando con ello su llegada al intestino delgado. La actividad de la ADH gástrica puede verse reducida por múltiples causas: gastrectomía (vaciamiento gástrico acelerado), alcoholismo (descenso de la actividad de la isoenzima), sexo femenino (menor actividad), ayuno prolongado, fármacos (antiH2, aspirina y paracetamol, entre otros), etc. (Lieber *et al.*, 1994).

- Isoenzimas V y VI: la primera está presente en el hígado fetal y la segunda no se ha descrito en seres humanos

Este grupo de enzimas, además de participar en la oxidación del etanol, cataliza la deshidrogenación de esteroides y la oxidación omega de ácidos grasos, que se ve incrementada por el consumo de alcohol (Ma *et al.*, 1993).

En el metabolismo del etanol, la ADH es la enzima de mediación más importante (Petersen *et al.*, 1983) catalizando la conversión reversible de los alcoholes en sus aldehídos y cetonas (Kitson y Weiner, 1996), utilizando el Nicotinamin-Adenin-Dinucleótido (NAD) como cofactor al convertirlo en su forma reducida (NADH) y transformando el etanol en acetaldehído, un metabolito altamente tóxico (Lieber, 1997)



La velocidad de esta reacción depende en un 70% de la cantidad disponible de enzima y en un 30% de la cantidad de cofactor NAD presente. Esta reacción produce un aumento de equivalentes reducidos, y a consecuencia de este aumento del ratio NADH/NAD, se producen muchos de los trastornos metabólicos que causa el consumo crónico de alcohol (Álvarez-González y del-Río-Gracia, 2003).

La falta de NAD que se produce de forma consecuente condiciona la abolición del ciclo del ácido cítrico, que también lo precisa como cofactor. Por otro lado, el exceso de NADH causa acidosis láctica, que empeora la capacidad renal de excreción de ácido úrico, generando una hiperuricemia secundaria. La producción de esta hiperuricemia se ve favorecida por la cetosis inducida por el alcohol y el aumento de catabolismo de las purinas. Dicho incremento en la degradación de las purinas puede contribuir a la producción de ROS por el efecto de la Xantino-Oxidasa (Lieber, 1997).

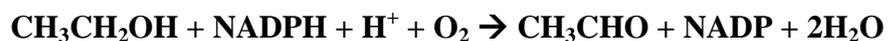
Otro efecto secundario del exceso de NADH es el aumento de la síntesis endógena de ácidos grasos. Por otra parte se produce una disminución de su β -oxidación al haber poca disponibilidad de NAD, que también es aquí un cofactor necesario, y una elevación del α -glicerol-fosfato que conduce al aumento de la síntesis de triglicéridos que se acumulan en el hígado produciendo esteatosis hepática (Lieber, 1997).

Además, el incremento del ratio NADH/NAD puede contribuir al riesgo de hipoglucemia en el contexto de la intoxicación etílica aguda al bloquear la gluconeogénesis. Esto se produce sobre todo en sujetos alcohólicos que presentan una reserva de glucógeno disminuida o agotada de forma secundaria a una mala alimentación (Santolaria *et al.*, 2000).

1.4.2.- Vía del Sistema Microsomal de Oxidación del Etanol.- El sistema MEOS es un sistema enzimático específico del hígado que se localiza en el retículo endoplasmático liso del hepatocito. Es denominado comúnmente citocromo p450 CYP2E1 –proteína purificada– al ser el miembro de la familia de los citocromos microsomales p450 predominantemente inducido en el hígado y en otros tejidos por la administración crónica de alcohol (Lieber y DeCarli, 1970; Roberts *et al.*, 1994; Upadhy *et al.*, 2000). Constituye una vía secundaria del metabolismo del etanol y tiene una cinética dependiente de la concentración del mismo, siendo responsable del 10% de

su metabolismo cuando se producen altas concentraciones sanguíneas de forma esporádica. Si el consumo de cantidades elevadas de alcohol se prolonga en el tiempo, y especialmente si coincide con fases de ayuno, se ha observado una activación transcripcional del gen del CYP2E1 (Hu *et al.*, 1995) que permite que en el alcoholismo crónico aumente su importancia, siendo responsable de hasta el 50% del metabolismo del etanol. En el alcohólico crónico puede llegar a aumentar su actividad en más de un 75% (Álvarez-González y del-Río-Gracia, 2003; Kunitoh *et al.*, 1993). Este aumento de su actividad produce un aumento del metabolismo de las sustancias degradadas por este sistema (como pueden ser diversos fármacos o el ácido retinoico –principal metabolito de la vitamina A–). Además, al compartir estas sustancias la vía de metabolismo, en presencia del etanol, otros sustratos pueden verse desplazados, aumentando su concentración en sangre.

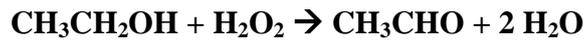
Esta vía produce la transformación de alcohol en acetaldehído y nicotín-adenín dinucleótido-fosfato (NADP) precisando de una molécula de oxígeno, nicotín-adenín-dinucleótido-fosfato reducido (NADPH) y un protón (H⁺). Al producirse esta reacción se obtiene dos moléculas de agua mediante la oxidación simultánea de ambos sustratos y la reducción de una molécula de oxígeno.



Esta reducción producida por la oxidación del segundo sustrato (el NADPH) está catalizada por oxidasas de función mixta como la NADPH-oxidasa, que generan ROS (Gropper *et al.*, 2008). Al producirse esta reacción aumenta el consumo de oxígeno, que puede producir una hipoxia relativa en las regiones pericentrales hepáticas que, como explicaremos más adelante, ya de por sí están menos oxigenadas que las áreas periportales (Brauer *et al.*, 1997), condicionando una mayor susceptibilidad a la lesión inicial de la hepatopatía alcohólica, que se observa predominantemente en el área 3 de Rappaport en torno a la vena centrolobulillar (Tsukamoto *et al.*, 1990).

1.4.3.- Vía de la Catalasa.- La catalasa es una enzima de localización ubicua y con mayor presencia en hígado, riñón, corazón y eritrocitos. Se trata de una enzima tetramérica con un grupo hemo en cada subunidad. El gen que la codifica se encuentra situado en el cromosoma 11 (Góth y Páy, 1996).

En el hígado se encuentra de forma predominante en los peroxisomas, con menor presencia en las mitocodrias (Kwo y Crabb, 2002); la mayor parte de su actividad sobre el etanol se produce en el hígado (Álvarez-González y del-Río-Gracia, 2003), oxidando el etanol a acetaldehído con mediación del peróxido de hidrógeno. Como resultado de esta reacción el peróxido de hidrógeno se degrada, con la subsecuente producción de agua.



La concentración de peróxido de hidrógeno actúa como regulador sobre esta enzima de una forma dual: a bajas concentraciones la enzima puede oxidar etanol, metanol o ácido ascórbico, mientras que a altas concentraciones descompone el peróxido de hidrógeno de forma rápida, utilizándolo como aceptor y como donante de moléculas de Hidrógeno. Por este motivo de forma fisiológica podemos encontrar niveles bajos de H_2O_2 , mientras que si la actividad de la catalasa se inhibe, aumentan las concentraciones de H_2O_2 hepático (Yang y DePierre, 1998).

Algunos estudios sugieren que el déficit de catalasa no produce alteraciones significativas en el metabolismo del alcohol. Sin embargo, otros estudios parecen indicar que su actividad puede haberse subestimado al inhibirse de forma directa por la ADH y de forma indirecta por algunos inhibidores de la ADH (Kwo y Crabb, 2002). Por otra parte sabemos que el déficit de H_2O_2 limita la actividad de la catalasa en el metabolismo del etanol. Este H_2O_2 se obtiene como consecuencia de la β -oxidación de los ácidos grasos –que como hemos visto está disminuida en el etilismo crónico– y de las reacciones mediadas por las oxidasas de acción mixta (Xantina-oxidasa y NADPH-oxidasa). Además, el metabolismo del alcohol puede ser inhibido por la presencia de ácidos grasos, que se acumulan en el alcohólico. De este modo se produce una reducción relativa de la concentración de H_2O_2 y de la actividad de la catalasa sobre el metabolismo del etanol (Lieber, 1997).

Tanto la actividad de las oxidasas de función mixta como la de la catalasa generan ROS, que son una parte fundamental de la patogenia de las alteraciones secundarias al consumo crónico de alcohol.

1.4.4.- Metabolismo del Acetaldehído.- Una vez producidas las tres reacciones previas de oxidación para producir acetaldehído a partir del etanol, este acetaldehído continúa su procesamiento mediante una nueva reacción de oxidación en el microsoma hepático. Más del 90% del metabolismo del acetaldehído ocurre en el hígado (Salaspuro, 1999) por dos vías diferentes: la *acetaldehído deshidrogenasa* (ALDH) y la *xantina-oxidasa* (Lieber, 1997).

La ALDH es una enzima tetramérica de localización microsomal, no inducible (Lumeng y Crabb, 2000) y sin especificidad de sustrato. Se han aislado 12 genes que codifican distintos tipos de ALDH con secuencias de aminoácidos bien diferenciadas. Estos genes se encuentran en diferentes cromosomas, habiéndose identificado hasta el momento en los cromosomas 9, 11, 12 y 17 (Kitson *et al.*, 1996; Xiao *et al.*, 1996). De las Isoenzimas de la ALDH sólo hay dos de localización hepática: la ALDH1 (citósólica) y la ALDH2 (mitocondrial), siendo la segunda más activa en la oxidación del acetaldehído. El resto de isoenzimas de la ALDH se encuentran en otros tejidos.

La ALDH lleva a cabo la mayor parte de la oxidación del acetaldehído, y para su correcto funcionamiento precisa del NAD como cofactor. Por otra parte, la xantina-oxidasa, metaboliza una pequeña parte del acetaldehído al presentar menor afinidad por él produciendo ROS en el proceso (Lieber, 1997).

La ALDH produce la oxidación del acetaldehído mediante la transferencia de un H⁺ al NAD:



Se ha descrito la existencia de una isoforma inactiva de la ALDH2 mitocondrial, presente en el 40% de los orientales y en menos del 10% de los caucasianos, que posee una sustitución en la posición 487 del glutamato por lisina. Esta modificación condiciona que, al ser inactiva, exista un déficit marcado de la oxidación del acetaldehído, con la consiguiente acumulación marcada del mismo, incluso en presencia de consumos moderados de alcohol. Esta acumulación del acetaldehído genera efectos tóxicos floridos, produciendo el Síndrome de Sensibilidad al Alcohol o *flushing response*; esta acumulación puede inducirse mediante la inhibición de la ALDH por medio de compuestos como el disulfirán y la carbamida de calcio (Eriksson, 2001),

fármacos muy utilizados en el tratamiento del alcoholismo para producir un condicionamiento negativo tras el consumo.

La acumulación de acetaldehído en los tejidos contribuye a las acciones crónicas patológicas que se asocian con el consumo de etanol (Álvarez-González y del-Río-Gracia, 2003), ya que resulta tóxico *per se* al ser capaz de producir peroxidación lipídica (Lieber, 1997). El acetaldehído también se une a otros compuestos alterando su función basal. Un ejemplo de ello es la GPX, que al unirse al acetaldehído, forma complejos hemiacetal, disminuyendo su acción y con ello su poder antioxidante, contribuyendo así al aumento de la lesión oxidativa. El acetaldehído también puede combinarse con otras proteínas y enzimas, modificando su función; de este modo disminuye la reparación del DNA y produce la activación de la respuesta inmune, haciendo que el organismo no reconozca ciertas proteínas como propias (Lieber, 1997). La activación de esta respuesta inmune produce la liberación de citoquinas proinflamatorias, atrayendo neutrófilos al foco de liberación y activando la proliferación y acción de las células NK, que generan ROS.

Debido a la producción de ROS aumenta la actividad de la cadena mitocondrial de transferencia de electrones, contribuyendo al aumento de consumo de oxígeno local y con ello a la lesión hepática que condiciona la hepatopatía alcohólica (Lumeng y Crabb, 2000). El aumento de actividad fagocítica y la activación de los neutrófilos genera mayor cantidad de ROS, creando un circuito de retroalimentación que perpetúa la reacción inflamatoria.

Además el acetaldehído estimula la producción de colágeno, favoreciendo aún más la aparición de fibrosis hepática (Lumeng y Crabb, 2000; Purohit y Brenner, 2006).

1.4.5.- *Otras rutas metabólicas*.- Una vez realizados todos los procesos descritos, el acetato debe transformarse en acetil-Coenzima A (acetil-CoA) para pasar a las vías del metabolismo general. Para ello es precisa la acción de una enzima mitocondrial, la acetil-CoA-sintetasa (Álvarez-González y del Río-Gracia, 2003). De forma paralela se producen una serie de reacciones que contribuyen de forma indirecta a dichos procesos. Un ejemplo de ello sería la vía de las oxidasas de función mixta.

Un resumen de las reacciones descritas hasta el momento puede verse en la Tabla 1 (pág. 19).

ENZIMA	LOCALIZACIÓN	REACCIÓN
ADH	Citosol	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{NAD} \rightarrow \text{CH}_3\text{CHO} + \text{NADH} + \text{H}^+$
MEOS	REL	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{NADPH} + \text{H}^+ + \text{O}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{CHO} + \text{NADP} + 2\text{H}_2\text{O}$
Catalasa	Perox. y mitoc.	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{CHO} + 2\text{H}_2\text{O}$
Xantino-oxidasa	Citosol	$\text{hipoxantina} + \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 \rightarrow \text{xantina} + \text{H}_2\text{O}_2$ $\text{CH}_3\text{CHO} + \text{O}_2 \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + \text{O}_2^-$
NADPH-oxidasa	Citos. y m. plasm.	$\text{NADPH} + \text{H}^+ + \text{O}_2 \rightarrow \text{NADP} + \text{H}_2\text{O}_2$
ALDH	Mitoc. y citosol	$\text{CH}_3\text{CHO} + \text{NAD} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + \text{NADH} + \text{H}^+$
Acetil-CoA sintetasa	Mitocondria	$\text{CH}_3\text{COOH} + \text{CoA} \rightarrow \text{acetil-CoA}$

Tabla 1: Enzimas y reacciones más importantes del metabolismo oxidativo del alcohol.

También existen vías de metabolización del etanol no oxidativas, aunque son menos importantes desde el punto de vista cuantitativo (Haber *et al.*, 2004); estas reacciones parecen relacionarse con el daño en órganos diana sin capacidad metabólica oxidativa en el alcohólico crónico, como pueden ser el páncreas y el pulmón (Werner *et al.*, 2001; Laposata y Lange, 1986; Manautou y Carlson, 1991).

Algunos autores sugieren que la inhibición de las vías oxidativas del etanol puede aumentar el flujo de las vías no oxidativas, aumentando el daño tisular pancreático mediado por etil-ésteres de ácidos grasos (FAEE, por sus siglas en inglés), que se producen como consecuencia (Werner *et al.*, 2001).

Como hemos visto el metabolismo del etanol tiene lugar casi exclusivamente en el hígado, por lo que es en esta víscera donde aparecen las lesiones más precoces observables en el alcohólico. Estas lesiones no sólo obedecen al efecto directo de la alteración metabólica que produce el alcohol, sino también al incremento de la permeabilidad intestinal producida por el alcohol, capaz de activar precozmente la producción de citoquinas por parte de las células de Kuppfer, de la que hablaremos con detalle más adelante.

2. HEPATOPATÍA POR ALCOHOL

Dado que el alcohol es un metabolito exógeno que llega al hígado a través del eje portal, es necesario que repasemos la anatomía normal del lobulillo hepático. Cada lobulillo hepático tiene forma piriforme, se constituye alrededor de una vena central del lobulillo (tributaria de las venas suprahepáticas) y se compone de múltiples placas celulares hepáticas que se alejan de la vena central de forma radiada. Cada placa hepática suele componerse de dos células y entre las células adyacentes se encuentran pequeños canalículos biliares que drenan en los conductos biliares que transcurren por los tabiques fibrosos que separan los diferentes lobulillos hepáticos.

En la periferia de cada lobulillo hepático se encuentran los espacios porta que contienen vasos arteriales, vasos venosos portales y el conducto biliar. Ambos sistemas vasculares se unen mediante columnas o trabéculas de células hepáticas y los sinusoides intercelulares. Desde los espacios porta, las ramas terminales de la porta y de la arteria hepática envían sangre oxigenada hacia los sinusoides, desde donde pasa a las venas centrolobulillares (Figura 2, pág. 21). En 1958, Rappaport sustituyó el concepto de lobulillo hepático por el de acino, que es una unidad estructural y funcional. Cada acino está formado por un espacio porta con una rama venosa portal y una arterial en el centro de dicho acino. De forma periférica se encuentran las venas centrolobulillares (Figura 3, página 21). Esta distribución tiene a su vez una repercusión funcional relacionada con el aporte de oxígeno y nutrientes a las distintas zonas. El eje arteriportal está rodeado por los hepatocitos del área 1 de Rappaport, que son metabólicamente muy activos y consumidores de gran cantidad de oxígeno. Tanto es así, que se ha descrito un “gradiente de oxígeno” desde el área 1 al área 3 (Ross *et al.*, 1995). Esta disposición espacial explica la diferente gravedad del daño hepático relacionado con la anoxia, con la peroxidación lipídica o con alteraciones metabólicas del equilibrio redox observándose, por ejemplo en el caso del alcoholismo, que las células pericentrales son las primeras en sufrir un daño, como analizaremos a continuación.

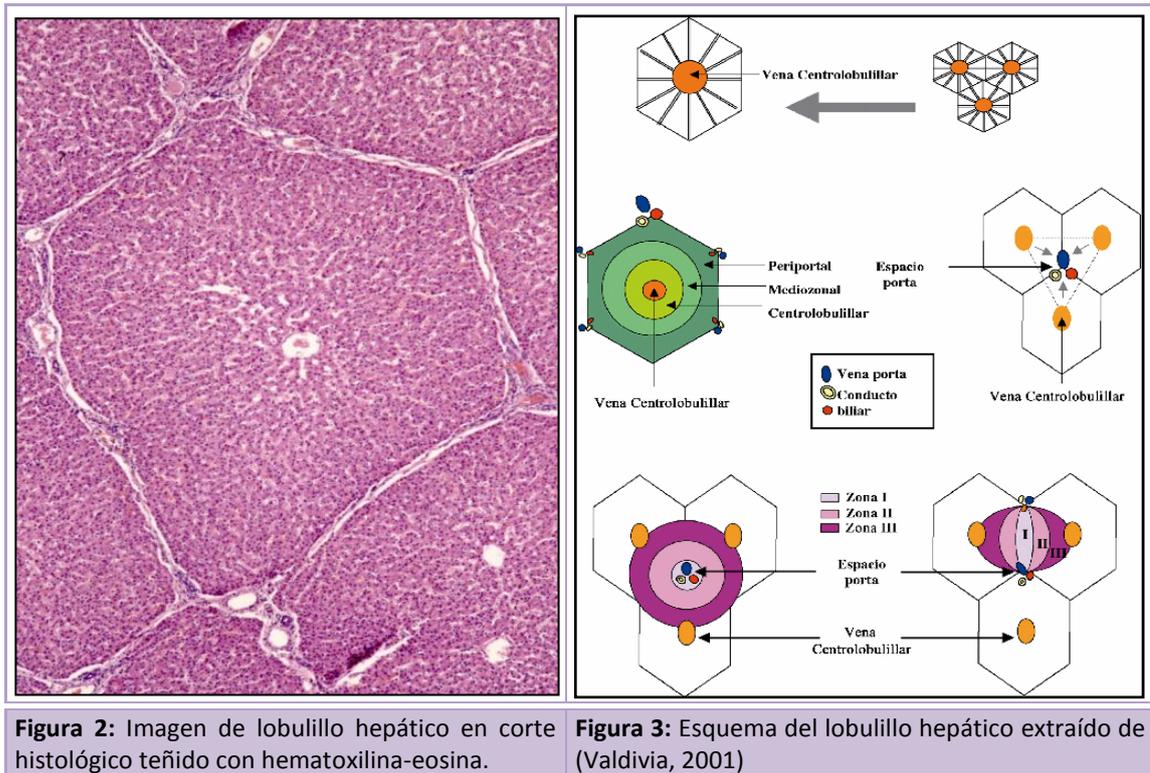


Figura 2: Imagen de lobulillo hepático en corte histológico teñido con hematoxilina-eosina.

Figura 3: Esquema del lobulillo hepático extraído de (Valdivia, 2001)

2.1.- Balonamiento hepatocitario.- Es la más precoz de las lesiones hepáticas observadas en la hepatopatía por alcohol. Consiste en un aumento del tamaño del hepatocito producido a consecuencia de un incremento de su contenido graso y de la acumulación citoplasmática de proteínas. Por una parte la síntesis de albúmina se encuentra aumentada mientras que la producción de tubulina se encuentra disminuida, por lo que se ve afectado el transporte de proteínas que normalmente se exportan al exterior como la albúmina, acumulándose ésta en el interior del hepatocito (Baraona *et al.*, 1977). Este aumento de proteínas intrahepatocitarias supone un aumento de la presión oncótica celular, que genera retención de agua y que también contribuye al crecimiento hepatocitario. Dada la diferencia de disponibilidad de oxígeno que existe entre el área 1 y el área 3, las lesiones de balonamiento van a verse de forma más precoz en la zona 3 que en la zona 1, siendo también más graves en ése área.

Como se ha comentado, el aumento del ratio NAD/NADH en los hepatocitos, la disminución de la β -oxidación de ácidos grasos junto con el aumento de absorción de lípidos desde el intestino delgado y las alteraciones de la regulación de factores de

transcripción del metabolismo, producen un aumento de la grasa hepática. Cuando la cantidad de grasa acumulada adquiere un valor importante desde el punto de vista cuantitativo, aparece la esteatosis hepática, que es detectable de forma directa mediante la observación con el microscopio óptico.

Debido al aumento general del tamaño celular se produce hepatomegalia, que puede comprimir los sinusoides hepáticos, condicionando la existencia de hipertensión portal que a su vez contribuye al desarrollo de cirrosis hepática, pudiendo decirse que hay tres fases evolutivas del daño hepático inducido por alcohol: el hígado graso, la necrosis y la fibrosis.

2.2 Hígado Graso.- La esteatosis hepática es la expresión de daño tisular más temprana consecuencia del abuso de alcohol y puede producirse de forma independiente

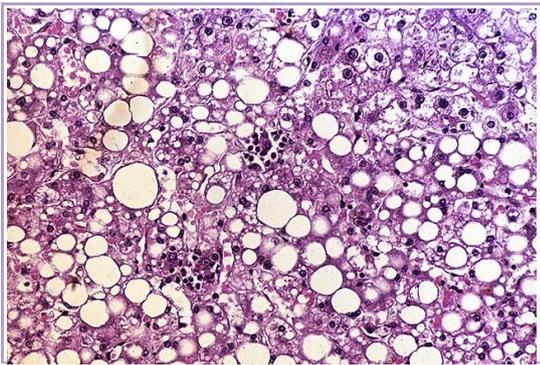


Figura 4: Esteatosis hepática. Tinción con hematoxilina-eosina.

del estado nutricional. Se caracteriza por la acumulación de grasa en los hepatocitos (sobre todo triglicéridos, fosfolípidos y ésteres de colesterol) en forma de macro o microvesículas (Figura 4), por la proliferación del retículo endoplasmático liso y por alteraciones de la estructura mitocondrial de forma más frecuente, con la inhibición de la β -oxidación de los ácidos grasos. En este

estadio el componente inflamatorio es mínimo salvo por la aparición de algunos linfogranulomas en las zonas pericentrales, donde el daño es más precoz y más grave a consecuencia de la menor concentración de oxígeno. A medida que la lesión progresa, el acúmulo de grasa puede apreciarse a lo largo de todo el lobulillo hepático. 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 predictores independientes de la progresión histológica si no cesaba el consumo de alcohol (Teli *et al.*, 1995a). En esta fase del daño hepático inducido por alcohol la interrupción del consumo de alcohol puede revertir la lesión, normalizándose la estructura hepática y el contenido hepático de grasa.

El hígado graso no es patognomónico de la ingesta de alcohol y se puede desarrollar en otras muchas circunstancias, entre otras el embarazo, el consumo de tóxicos, la malnutrición, el síndrome de Reye y la obesidad (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).

2.3.- Necrosis e inflamación hepática.- La acumulación de grasas y de proteínas de las que el hepatocito no se puede liberar favorecen la aparición de necrosis (Figura 5), fenómeno al que contribuyen la inflamación y la acción de las citoquinas pro-oxidantes.

Se ha comentado cómo la metabolización del etanol a través del MEOS induce la actividad del CYP2E1, generando acetaldehído y radicales hidroxietilos, que producen daño oxidativo, que a su vez produce inflamación y estimula aún más la peroxidación lipídica, generando un aumento de ROS. Al mismo tiempo el aldehído provoca

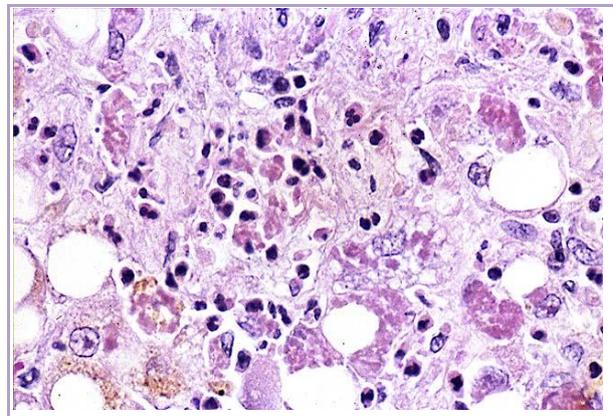


Figura 5: Inflamación y necrosis hepática. Tinción con hematoxilina-eosina.

la formación de enlaces covalentes con diferentes proteínas, al igual que lo hacen el malonildialdeído y los ROS; estas proteínas que se ven alteradas tanto de membrana como citosólicas, se denominan “aductos” y presentan una alteración en su función, pudiendo servir como sustratos con actividad antigénica, activando la inmunidad celular (Rolla *et al.*, 2000; Albano, 2002).

Como vemos existen multitud de factores que estimulan la producción de citoquinas proinflamatorias; estas citoquinas activan las células de Ito, generando la secreción de fibronectina y de matriz extracelular (Tuma, 2002). El conjunto de procesos que llevan a la lesión hepática en el alcoholismo crónico puede verse de forma esquemática en la Figura 6 (página 24):

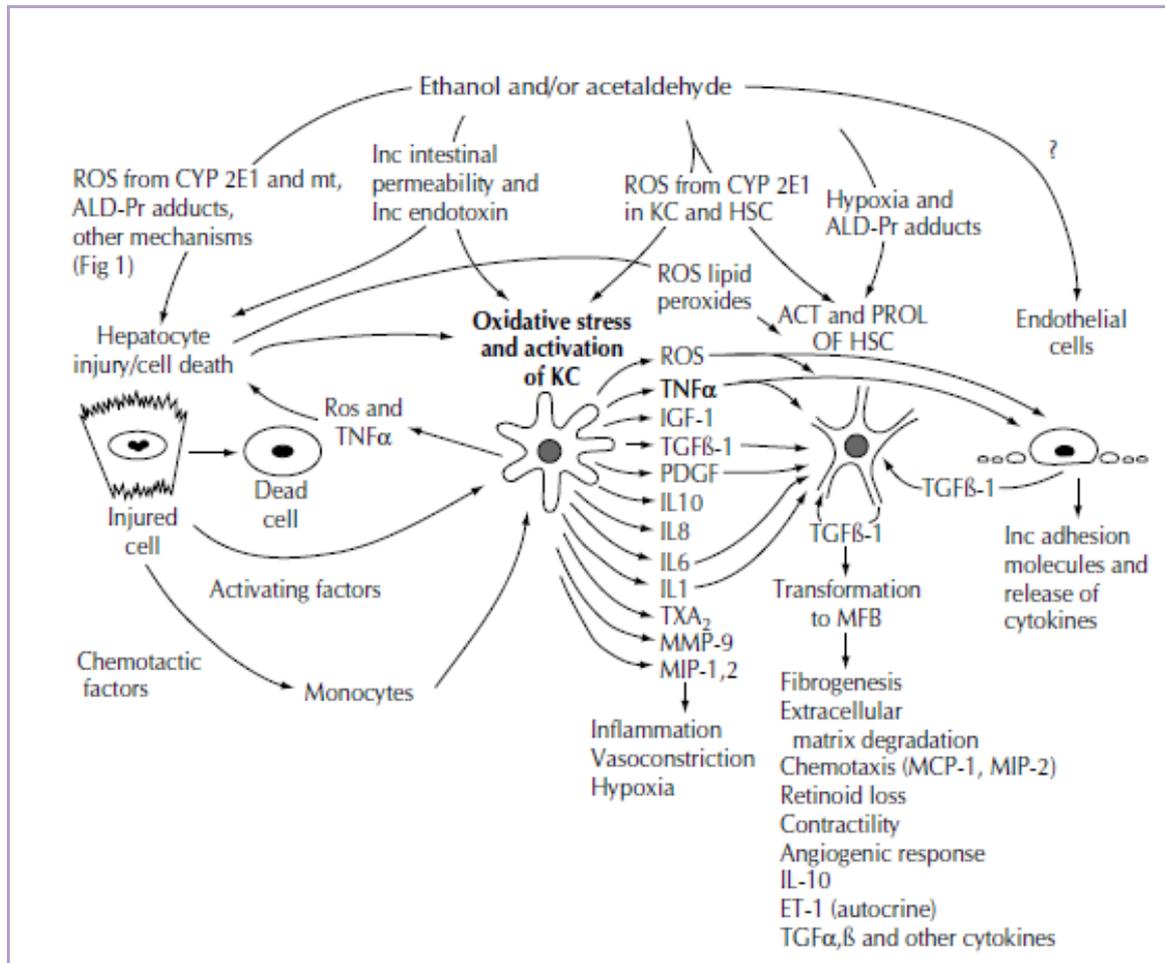


Figura 6: Efectos de la lesión hepatocitaria, endotoxina y de los cambios inducidos por etanol –y/o acetaldéhidoo– (incluyendo hipoxia y estrés oxidativo) sobre las vías autocrina y paracrina de las KC activadas, células estrelladas hepáticas y células endoteliales. Acrónimos: ACT, activación; ALD-Pr, aldehído-proteína; ET, endotelina; HSC, célula estrellada hepática; MCP, proteína quimiotáctica de monocitos; MFB, miofibroblastos; MIP, proteína inflamatoria de macrófagos; MMP, metaloproteasa matricial; mt, mitocondria; PDGF, factor de crecimiento derivado de plaquetas; PROL, proliferación; TXA $_2$, tromboxano A $_2$ (Lumeng y Crabb, 2000).

De forma paralela al aumento de la producción de ROS se produce la reducción de la actividad de los sistemas antioxidantes hepáticos, como pueden ser la disminución de la concentración de α -tocoferol (Rouach *et al.*, 1997), de la actividad de la superóxido-dismutasa (SOD), de la GPX hepática (Polavarapu *et al.*, 1998; Zima *et al.*, 2001) y de la actividad del sistema de reciclaje del glutatión (Oh *et al.*, 1997). El acetaldéhidoo también puede formar aductos de forma directa con la cisteína y el glutatión, contribuyendo a la inhibición de los sistemas antioxidantes. De este modo

aumenta la oxidación de proteínas y la peroxidación lipídica, generando un mecanismo de feedback positivo que perpetúa el daño hepático.

2.4.- Fibrosis hepática.- Debido a la estimulación de producción y depósito de fibras de colágeno en la matriz extracelular se distorsiona la arquitectura hepática, condicionando una alteración de su función. Como hemos comentado esta fibrogénesis se produce por la hiperactivación de múltiples estirpes celulares (hepatocitos, células de Kupffer, células del endotelio sinusoidal, miofibroblastos y células de Ito, siendo las células estrelladas las que tienen un papel primordial (Figura 6, pág. 24).

La fibrosis se produce de forma escalonada, iniciándose con cambios en la composición de la matriz extracelular del espacio de Disse que aumenta su proporción de fibronectina y colágenos tipo III y tipo I, que sustituyen al colágeno tipo IV habitual. Tanto el colágeno tipo I como la fibronectina, producen estimulación quimiotáctica de las células de Ito, atrayéndolas hacia el espacio de Disse (Figura 7).

El TNF- α producido por las células de Kupffer activadas actúa sobre las células de Ito, que responden con una sobreexpresión de receptores para factores de crecimiento, como el factor de crecimiento epidérmico, el factor de crecimiento de las plaquetas o el factor de crecimiento transformante- β 1 –TGF- β 1 por sus siglas en inglés–

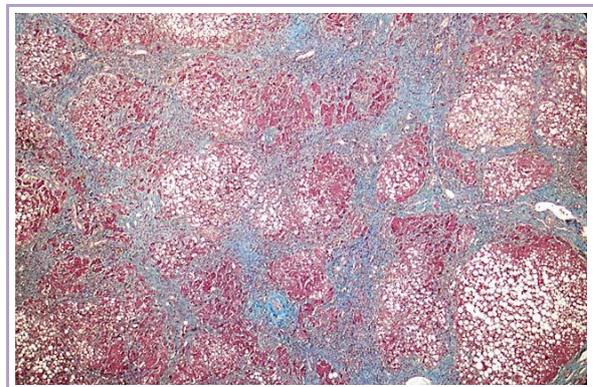


Figura 7: Fibrosis hepática. Tinción con tricrómico de Masson (colágeno en azul).

(Yang *et al.*, 2003). Esto produce un aumento de la producción de matriz extracelular. Además el TNF- α es capaz de inducir la división de células de Ito no activadas y su transformación en miofibroblastos, aumentando la secreción de citoquinas y factores de crecimiento, y retroalimentando el mecanismo de producción de la fibrosis.

Por otra parte, la disminución de la degradación de la colágena puede contribuir también a la fibrogénesis. De forma homeostática este proceso se regula por las

metaloproteasas de la matriz hepática y sus inhibidores, pero en el caso de la fibrosis hepática el funcionamiento de este sistema regulador se conoce sólo de forma parcial. Ciertos estudios sugieren que hay un incremento de la actividad de la colagenasa (Lieber, 1980) mientras que otros apuntan a que el depósito de tejido fibroso se asocia con un aumento inicial de la actividad de las metaloproteasas que desciende progresivamente al aumentar la actividad del inhibidor tisular de las metaloproteasas (TIMP), produciendo una disminución de la degradación de la colágena (Alcolado *et al.*, 1997). También se ha demostrado que tanto el acetaldehído como el etanol inducen la expresión del RNAm de la α -1 procolágena de forma dosis dependiente, induciendo una mayor expresión de los genes de la α -1 colágena y de la fibronectina (Svegliati-Baroni *et al.*, 2001).

Se ha observado que la activación de los neutrófilos y el aumento de la producción de ROS contribuyen al desarrollo de la fibrosis hepática. Esta activación de los neutrófilos también induce la producción de óxido nítrico (NO), que podría ejercer un efecto protector antioxidante (Casini *et al.*, 1997). Estudios experimentales han mostrado que los hepatocitos que expresan el CYP2E1 producen una mayor activación de las células estrelladas, convirtiéndolas en miofibroblastos (Nieto *et al.*, 2002). Los productos de la peroxidación lipídica también se han propuesto como potenciadores de la fibrosis hepática (Maher *et al.*, 1994; Lumeng y Crabb, 2000).

De forma característica, la fibrosis aparece de forma inicial en la zona pericentral y progresa hasta afectar todo el lobulillo hepático si se mantiene el consumo alcohólico; la presencia de fibrosis pericentral predice la evolución hacia la cirrosis hepática, aunque en estadios muy iniciales es potencialmente reversible con la interrupción del consumo de alcohol.

Llegados a este punto ya hemos descrito que la fibrosis y la necrosis intensas configuran las fases avanzadas de la hepatopatía alcohólica, que se compone de un conjunto de alteraciones que van desde el hígado graso hasta las formas más graves, incluyendo la hepatitis alcohólica, la cirrosis y el carcinoma hepatocelular. Los estudios más recientes indican que en esta lesión influye de manera marcada el estrés oxidativo

asociado al metabolismo del alcohol, la depleción de glutatión, y la alteración de los oligoelementos que actúan como cofactores de los antioxidantes. Como hemos detallado, todo este proceso es consecuencia de la activación de las células de Kupffer y de la cascada de citoquinas, en la que también juega un papel importante el aumento de la permeabilidad intestinal al lipopolisacárido (LPS). Sin duda alguna, la cuantía del consumo de alcohol influye en la génesis de la hepatopatía alcohólica: la dosis requerida para el desarrollo de daño hepático secundario al alcohol ronda el consumo de entre 40 y 80 g/día. En varones, un consumo de 40-80 g/día origina hígado graso, mientras que un consumo de 160 g/día durante un periodo de 10-20 años causa cirrosis hepática en un porcentaje elevado de pacientes. En el caso de las mujeres, la cirrosis puede alcanzarse con consumos menores, en torno a 40 g/día o incluso menos. El riesgo se cimienta en la cantidad consumida y no en el tipo de bebida, siendo la ingesta diaria más peligrosa que el consumo intermitente, en el que se le da al hígado una oportunidad de recuperación entre agresiones. Los grandes bebedores diarios o casi diarios, y los que comienzan a beber a edades tempranas tiene mayor riesgo de hepatopatía por alcohol (ALD, por sus siglas en inglés) que los bebedores episódicos o sociales (*binge drinkers*). Este hecho no obedece únicamente a observaciones clínicas, sino también a observaciones realizadas en estudios experimentales.

La rata tiene una aversión natural hacia el alcohol, lo que obliga a que si se utilizan modelos de administración oral, el alcohol tenga que estar diluido en el agua de bebida. El modelo más utilizado de este tipo es el modelo de Lieber-DeCarli que tiene la ventaja de contemplar aspectos nutricionales que comentaremos más adelante. En este modelo se pueden estudiar las alteraciones precoces producidas por el alcohol, como la esteatosis y el balonamiento hepatocitario. Pero las ratas alimentadas de esta manera difícilmente desarrollan una cirrosis florida. Para observar estos fenómenos de hepatopatía avanzada, la administración intragástrica de alcohol siguiendo el modelo de Frech-Tsukamoto es más adecuada, ya que sí conduce a la aparición de fenómenos fibróticos.

El hecho de que sólo el 30% de grandes bebedores desarrolle formas graves de ALD indica que hay otros factores que influyen en su patogénesis, pero ¿qué factores influyen en la aparición de la hepatopatía avanzada?

- *Sexo*: se ha demostrado que las mujeres tienen mayor susceptibilidad al desarrollo de ALD debido al menor nivel de alcohol deshidrogenasa gástrica, a la mayor proporción de grasa corporal y a la presencia de estrógenos, pudiendo desarrollar hepatopatía alcohólica con consumos a partir de 20 g/día.

- *Factores genéticos no ligados con el sexo*: Algunos polimorfismos genéticos de las enzimas responsables del metabolismo hepático (alcohol deshidrogenasa), el citocromo p450 CYP2E1, citoquinas y otros mediadores antiinflamatorios, pueden incrementar el riesgo. Estudios recientes sugieren que variaciones en el gen de la PNPLA3 (*Patatin-like phospholipase domain-containing 3*) afectan al desarrollo de cirrosis alcohólica en sujetos de raza blanca (Stickel *et al.*, 2011, Trépo *et al.*, 2011)

Ciertos fenotipos del HLA también parecen incrementar el riesgo de enfermedad hepática (Morgan *et al.*, 1980; Doffoel *et al.*, 1986) así como un polimorfismo del TNF- α que se encuentra más comúnmente en pacientes con esteatohepatitis alcohólica que en sujetos control (Grove *et al.*, 1997). Además las tasas de eliminación del alcohol varían hasta entre unos individuos y otros con variaciones que pueden llegar a triplicar los valores más bajos; esto puede estar relacionado con el polimorfismo genético de los dos sistemas de metabolización del alcohol, el MEOS y la ADH.

- *Tabaquismo*: La exposición crónica a la nicotina ha demostrado aumentar la producción de citoquinas proinflamatorias por parte de los macrófagos, así como un incremento de ROS y una disminución de los antioxidante endógenos en varios estudios experimentales, de forma independiente al consumo de alcohol y potenciando sus efectos deletéreos al ser consumidos en conjunto (Cooper *et al.*, 2008; Bailey *et al.*, 2009; Purohit *et al.*, 2013).

- *Hepatitis C y Hepatitis B*: La coinfección en pacientes con hepatopatía alcohólica se asocia a un inicio precoz de signos de gravedad, daño citoestructural más avanzado y acortamiento de la supervivencia al actuar ambos daños de forma sinérgica. La ingesta de cantidades de alcohol entre 20-50 g/día aumenta el riesgo de cirrosis y hepatocarcinoma en pacientes con VHC. Además la ingesta de más de 50 g/día de alcohol disminuye la eficacia del tratamiento antivírico con interferón.

- *Exposición a otras toxinas*: Dos agentes hepatotóxicos mediante la acción conjunta, producen potenciación el uno del otro, incrementando de este modo el riesgo de lesión hepática que producirían por separado. Sustancias como el paracetamol pueden inducir hepatotoxicidad en pacientes alcohólicos incluso a dosis terapéuticas, aunque hay resultados contradictorios a este respecto.

- *Malnutrición calórico-proteica en el alcohólico*: Tan importante o más que los factores mencionados hasta el momento es la alteración nutricional propia del alcohólico. Es preciso que distingamos lo que puede ser el aporte defectuoso de nutrientes específicos (vitaminas y oligoelementos) de lo que es el concepto de malnutrición calórico-proteica. Existen dos grandes formas de malnutrición calórico-proteica: el tipo marasmático y el tipo Kwashiorkor-like o malnutrición inflamatoria.

La malnutrición tipo marasmo se define como una pérdida progresiva de masa muscular y masa magra; el prototipo de este tipo de malnutrición es la que puede sufrir un individuo que ayuna, en el que no hay aporte exógeno de nutrientes. En este caso la insulina se encuentra inhibida y el hígado recibe un aporte adecuado de aminoácidos y ácidos grasos provenientes del catabolismo muscular y de una lipólisis que no se frena al no disponer de insulina. Esto condiciona el mantenimiento de los niveles de albúmina y reactantes de fase aguda en las fases iniciales.

En el caso de la malnutrición tipo Kwashiorkor-like, que recibe su nombre porque es la que padecen los niños del tercer mundo al finalizar el periodo de lactancia, por no tener un acceso adecuado al alimento proteico, pero sí una dieta basada en hidratos de carbono de forma predominante. Esto favorece la hiperinsulinemia, al no haber aminoácidos dietéticos disponibles y al estar bloqueada la proteólisis por la insulina, por lo que la síntesis hepática de proteínas de transporte y reactantes de fase aguda está comprometida.

En situaciones de respuesta inflamatoria existe un aumento de la secreción de insulina generando una situación metabólica que se parece a la del Kwashiorkor; además en este caso la liberación de citocinas frena, bloquea o induce una resistencia variable a la acción de la insulina, potenciando estos efectos. Como hemos apuntado, en el alcohólico predomina la malnutrición de tipo marasmático, pero no podemos olvidar

que el incremento de la permeabilidad intestinal con estimulación continua de la célula de Kuppfer y la liberación continua de citocinas de forma consecuente confieren rasgos de Kwashiorkor-like a la malnutrición subyacente.

El marasmo es un fenómeno muy frecuente en el contexto de alcoholismo; en nuestro medio está presente hasta en el 20% de individuos consumidores crónicos de alcohol (Estruch, 1998). En los alcohólicos la malnutrición puede tener dos etiologías primarias: la malnutrición primaria por una ingesta defectuosa y de alimentos de mala calidad (Santolaria *et al.*, 2000) y la malnutrición secundaria a la malabsorción que provoca el alcohol de forma directa o indirecta, ya sea por insuficiencia pancreática, por hipertensión portal o por ambos. A todo esto hay que asociar el efecto anorexígeno del alcohol en sí mismo.

En algunos estudios se han identificado como factores independientes para su desarrollo los hábitos alimenticios irregulares y la presencia de cirrosis descompensada con ascitis (Santolaria *et al.*, 2000). Otros factores que se han relacionado con el desarrollo de malnutrición son la dosis total de etanol, la ingesta calórica y la cirrosis (Nicolas *et al.*, 1993).

La malnutrición primaria en el paciente alcohólico ha sido ampliamente investigada. Cabe destacar el estudio llevado a cabo por Rubin y Lieber en 1968, en el que administraron una dieta isocalórica a individuos sanos, en unos individuos con aporte en forma de nutrientes habituales y en otros en forma de alcohol, describiendo por primera vez el concepto de *Empty calories*, o calorías vacías (aquellas que no tienen valor nutricional), siendo el aporte del alcohol de 7 calorías por gramo.

El fenómeno de las calorías vacías se ha querido explicar por múltiples mecanismos, desde la inducción del MEOS con la modificación de los sistemas de metabolismo orgánicos y el consumo de oxígeno con generación de calor (Addolorato *et al.*, 1997), hasta por la acción de las proteínas desacoplantes mitocondriales (uncoupling proteins o UCP), que son unas proteínas intermembrana mitocondriales que disipan el gradiente de protones sin producir ATP, desacoplando así la fosforilación oxidativa y generando calor en el proceso; esto condiciona una disminución de la proporción de ATP generado por mol de principio inmediato metabolizado (Nedergaard *et al.*, 2005)

Los individuos alcohólicos presentan de forma habitual hábitos erráticos de alimentación, con disminución de las ingestas, siendo estas habitualmente de baja calidad nutricional (Lieber, 1993; Santolaria *et al.*, 2000). También se han encontrado concentraciones disminuidas de leptina en sujetos con alcoholismo crónico de forma dependiente de la cuantía de alcohol consumido, pero de forma independiente del estado nutricional y de la presencia de enfermedad hepática compensada (Nicolas *et al.*, 2001; Santolaria *et al.*, 2003). La leptina es una hormona que actúa a nivel hipotalámico, encargándose de regular el apetito y de este modo la ingesta de alimentos. Esta disminución de leptina en pacientes alcohólicos condicionaría el efecto anorexígeno del alcohol.

En las situaciones con disminución del aporte energético por debajo de las necesidades mínimas del organismo se producen una serie de mecanismos adaptativos como respuesta, que tratan de movilizar aminoácidos del tejido muscular y grasas del tejido adiposo para obtener la energía suficiente que garantice el metabolismo adecuado del organismo, y en especial del cerebro (Denke *et al.*, 1998).

La primera semana de “ayuno” se suelen perder entre 4-5 Kg de peso de media, correspondiendo de forma pormenorizada un 25% a tejido graso, un 35% a líquido extracelular y un 40% a proteínas; inicialmente se consumen las reservas de glucógeno y se estimula la gluconeogénesis a partir de aminoácidos musculares con el fin de mantener el aporte energético necesario para el funcionamiento del cuerpo; estos mecanismos compensatorios disminuyen la masa magra corporal. Además se activa también la lipólisis, disminuyendo la masa grasa corporal con la liberación de ácidos grasos libres para ser utilizados como fuente de energía de forma directa por los tejidos periféricos, y para ser transformados por el hígado en cuerpos cetónicos para administrar energía a corazón y cerebro.

En las semanas siguientes, si persiste el estado de ayuno se mantienen las pérdidas, pero con un ritmo más lento y con diferente velocidad según cada compartimento corporal. A partir de la primera semana se generan nuevos fenómenos adaptativos:

- Adaptación del cerebro, corazón y otros tejidos a consumir cuerpos cetónicos como principal fuente de energía, reduciendo el consumo de glucosa y proteínas al máximo e inhibiéndose la neoglucogénesis hepática para ahorrar músculo.
- Aumento de la neoglucogénesis renal a partir de glutamina, con importancia progresiva hasta equipararse a la neoglucogénesis hepática.
- Reducción del metabolismo basal por la disminución de las somatomedinas y por el aumento de la rT3 (triyodotironina reversa), una subforma inactiva biológicamente de la hormona tiroidea T3, que producen un tono simpático bajo.

Inicialmente se mantiene de forma parcial la síntesis de albúmina mediante la movilización de aminoácidos esenciales musculares, pero estando “compensada” la hipoalbuminemia a pesar del estado de malnutrición. Con la continuidad del estado de ayuno se produce un aumento de la secreción de insulina, que inhibe la lipólisis y la movilización de aminoácidos musculares, comprometiendo la síntesis de albúmina y otras proteínas, como las VLDL. Los minerales del organismo se agotan por la reducción de la masa corporal y del líquido extracelular, y se produce una salida de magnesio y de potasio de sus depósitos intracelulares, pudiendo generarse una pérdida masiva de los mismos.

En el contexto de un estrés orgánico la inanición puede ser incluso más nociva debido a las consecuencias metabólicas que generan la inflamación, la infección y la fiebre, ya que se produce un aumento de las citoquinas proinflamatorias, elevando el metabolismo basal y acelerándose la pérdida de peso, de nitrógeno y de micronutrientes asociada a un aumento de la demanda de síntesis proteica, tanto para mantener la función inmune como la reparación tisular (Reid *et al.*, 2001)

En el contexto de la malnutrición proteica, se produce un aumento marcado de la peroxidación lipídica con la consecuente producción de malonaldehído y hexanal, la disminución de los antioxidantes y de los ácidos poliinsaturados plasmáticos (Lenhartz *et al.*, 1998), así como un descenso de las concentraciones de glutatión de los eritrocitos (Jackson, 1986), generando una predisposición al daño oxidativo (Grattagliano *et al.*, 2000).

Es tan frecuente la malnutrición proteica en el alcohólico que los modelos experimentales diseñados necesariamente han de contemplar esta circunstancia. Así el modelo de Lieber-DeCarli, ampliamente utilizado por diversos grupos de investigación, permite analizar los efectos combinados y relativos del alcohol y la malnutrición (Lieber y DeCarli, 1989) sobre diversas alteraciones metabólicas, histológicas y funcionales, por lo que nos hemos basado en él para la realización del presente estudio.

La malnutrición proteica induce lesión hepática de forma específica por múltiples mecanismos, asociándose a cambios histológicos hepáticos similares a los inducidos por el alcohol (esteatosis, necrosis y fibrosis hepática). Algunos de estos mecanismos son: la disminución de la síntesis proteica, la reducción del aclaramiento hepático de etanol por disminución de la actividad de la ADH y el MEOS, el aumento de la peroxidación lipídica y la disminución de los depósitos de Glutación y de la actividad de sistemas antioxidantes hepáticos (de forma más intensa cuando la malnutrición se produce sobre un hígado graso (Grattagliano *et al.*, 2000)) y de las concentraciones de selenio y zinc, ambos cofactores de la GPX, sobre todo en el caso del selenio, como veremos más adelante.

Al pormenorizar la fisiopatología hemos visto que la lipólisis está aumentada ya que en un marasmo puro no hay insulina. Por lo tanto, en una situación marasmática el hígado se enfrenta a una sobrecarga de ácidos grasos libres capaces de generar un hígado graso sin necesidad de ninguna noxa añadida. Por eso es necesario que en los modelos experimentales el aporte nutricional sea igual en los diferentes grupos de experimentación, como lo ha sido en nuestro estudio.

Como antes comentábamos, en el alcohólico es posible que exista un componente de malnutrición tipo Kwashiorkor o tipo inflamatorio. Es muy posible que un mecanismo de este tipo explique la **sobrecarga férrica** existente en estos pacientes. Debido a la capacidad del hierro para actuar como donante de electrones, que favorece la formación de radicales libres inestables que lesionan las membranas celulares, estimulan la producción de quimioquinas para atraer a los neutrófilos y aumentan la respuesta inflamatoria (Stal *et al.*, 1993; Hultcrantz *et al.*, 1991), la sobrecarga hepática de hierro se asocia con un aumento de la peroxidación lipídica y con un mayor depósito hepático de grasas (Sadrzadesh *et al.*, 1994). Este exceso sensibiliza a las células de

Kupffer para ser activadas por medio del NF- κ B y para la expresión de genes proinflamatorios en el contexto de la lesión hepática alcohólica (Tsukamoto *et al.*, 1999). Se ha observado que las concentraciones hepáticas de hierro se relacionan con la esteatosis sobre todo por la potenciación de la sobrecarga férrica inducida por el etanol (Conde Martel *et al.*, 1993).

3. PAPEL OXIDANTE DEL ALCOHOL EN EL DAÑO HEPÁTICO

Hemos visto la importancia que tiene el estrés oxidativo en la patogenia del ALD, por lo que ahondaremos un poco en los diferentes mecanismos oxidantes y antioxidantes influidos por el consumo de alcohol.

Los ROS se producen de forma natural en pequeñas cantidades como consecuencia de la actividad de las diferentes vías metabólicas del organismo, influyendo en el mantenimiento de la homeostasis y en la señalización celular. Son moléculas muy pequeñas que incluyen iones de oxígeno (O_2^-), radicales libres y peróxidos –tanto orgánicos como inorgánicos–; son moléculas muy reactivas por la presencia de una capa de electrones de valencia no apareada. Los ROS interpretan roles determinados en la muerte celular programada (apoptosis), en la necrosis, y tienen también efectos positivos como la inducción de sistemas de defensa (atraen neutrófilos y macrófagos, así como plaquetas) y la movilización de sistemas de transporte de iones. Se producen como consecuencia de varios procesos internos, como pueden ser los que implican a la cadena respiratoria mitocondrial (Chance *et al.*, 1979), el citocromo p450 (White, 1991; Blank *et al.*, 1991), las enzimas oxidativas como la xantina oxidasa, la aldehído oxidasa, la monoamina oxidasa y el complejo NADPH oxidasa (Toykuni, 1999; De Groot, 1994), así también como consecuencia de factores ambientales, como pueden ser la radiación, los rayos ultravioletas, el tabaco o algunos fármacos. El consumo de alcohol, ya sea agudo o crónico, además de disminuir el nivel o actividad de los mecanismos antioxidantes del organismo, aumenta la producción de ROS. Este exceso produce toxicidad.

En situaciones fisiológicas los neutrófilos y los macrófagos producen ROS mediante la acción de la NADPH oxidasa (Figura 8) para destruir organismos extraños (Rosen *et al.*, 1995). También la mieloperoxidasa cataliza una reacción entre el H₂O₂ y el cloro para producir hipoclorito, que ayuda a destruir cuerpos extraños, y a bajas dosis los ROS, y en especial el H₂O₂ pueden ser importantes para los mecanismos de transducción de señal celular, y con ello, para el metabolismo celular normal (Lander, 1997)

En general sus efectos nocivos se producen como consecuencia de daños en el DNA (por eliminación o cambio de bases, gene-rando mutaciones) y por la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados y de aminoácidos que genera en las proteínas su disfunción. Su toxicidad viene dada por su capacidad para reaccionar con la mayoría de enzimas inactivantes de macromoléculas, mediante la desnaturalización de proteínas, causando daños en el DNA (roturas, eliminación de algunas bases o modificación de las mismas produciendo mutaciones) o mediante la peroxidación lipídica, causando la destrucción de membranas biológicas y mediante la producción de metabolitos reactivos del aldehído, como el malondialdehído (Nakazawa *et al.*, 1996; McCord, 1998)

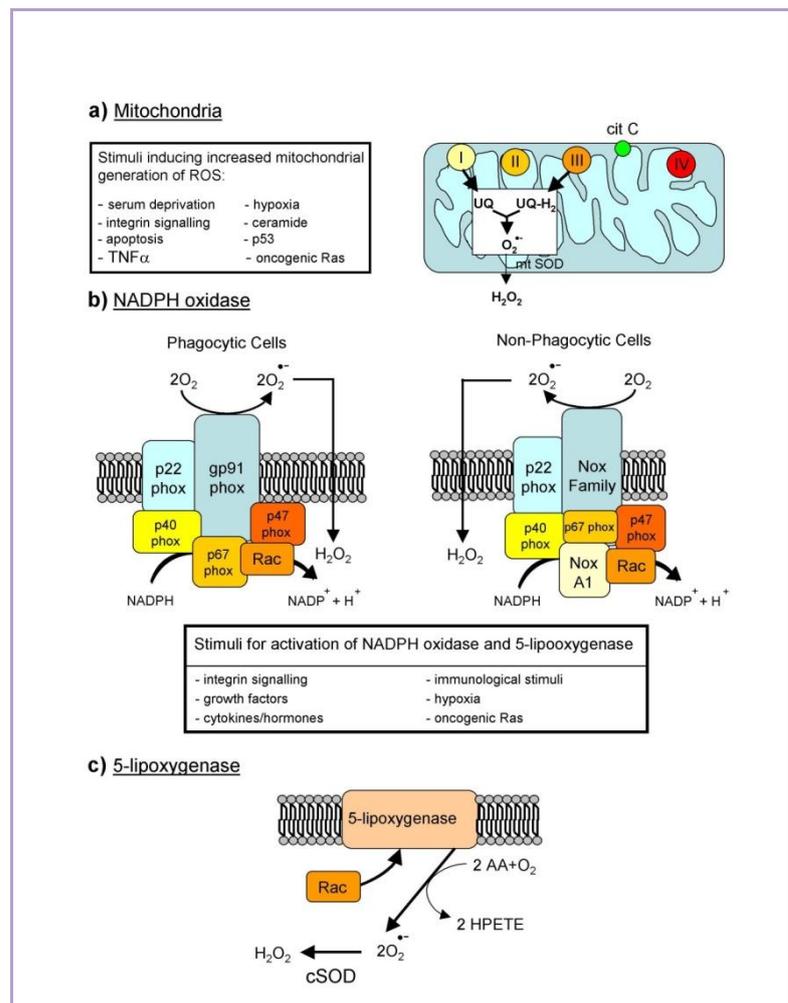


Figura 8: Fuentes principales de ROS a nivel celular (extraído de Novo y Paroloa, 2008)

En situaciones fisiológicas los neutrófilos y los macrófagos producen ROS mediante la acción de la NADPH oxidasa (Figura 8) para destruir organismos extraños (Rosen *et al.*, 1995). También la mieloperoxidasa cataliza una reacción entre el H₂O₂ y el cloro para producir hipoclorito, que ayuda a destruir cuerpos extraños, y a bajas dosis los ROS, y en especial el H₂O₂ pueden ser importantes para los mecanismos de transducción de señal celular, y con ello, para el metabolismo celular normal (Lander, 1997)

Habitualmente las células son capaces de defenderse de los daños producidos por los ROS mediante el uso de enzimas compensadoras, como la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa (GPX) y la catalasa. Colaboran también como antioxidantes celulares otras sustancias como pueden ser el ácido ascórbico (vitamina C), el ácido úrico y el glutatión (GSH).

Los ROS se han relacionado con múltiples enfermedades, como pueden ser la toxicidad intrínseca del O₂, el daño por isquemia-reperfusión, enfermedades cardiovasculares, arteriosclerosis, carcinogénesis, diabetes mellitus, enfermedades neurodegenerativas (Parkinson, Alzheimer), edad, inflamación, etc. También se relacionan de forma específica con la toxicidad por el consumo agudo y crónico de alcohol (Knight, 1998; Cederbaum, 2009, Nordman *et al.*, 1992).

Dado que los ROS se producen y compensan de forma natural en el organismo, se define el *Estrés Oxidativo* como la alteración en el balance homeostático corporal entre la producción de ROS, su eliminación y la reparación de las moléculas dañadas por acción (Cederbaum *et al.*, 2009). Como respuesta evolutiva a la producción de ROS, el organismo ha desarrollado una gran variedad de mecanismos compensatorios, tanto enzimáticos como no enzimáticos para proteger al cuerpo de sus efectos deletéreos, como describiremos.

3.1.- Alcohol, estrés oxidativo y daño celular.- La capacidad del alcohol para aumentar la producción de ROS y estimular la peroxidación de lípidos, proteínas y DNA se ha demostrado en múltiples modelos, tanto animales como humanos. El mecanismo por el que se produce es un conjunto complejo de múltiples enzimas y vías relacionadas con el metabolismo del alcohol tanto de forma directa como indirecta, mediante su efecto en la membrana y el funcionamiento celular. A pesar de que el conocimiento en este área aumenta de forma progresiva, el proceso completo por el que el alcohol causa el daño celular aún no está claro.

Dentro de los múltiples mecanismos etiopatogénicos referidos a lo largo de la literatura se han descrito los cambios en el estado redox (alteración del cociente redox NAD⁺/NADH) como resultado de la oxidación del etanol por la ADH con la producción

de acetaldehído, el daño mitocondrial secundario (que condiciona el descenso de la producción de ATP), los efectos directos en la membrana por la interacción hidrofóbica del etanol con los fosfolípidos y componentes proteicos o con las enzimas, la hipoxia inducida por el etanol (sobre todo en la zona pericentral del acino hepático, donde se consume oxígeno para detoxificar el alcohol mediante la oxidación del etanol), los efectos del etanol en el sistema inmunológico, las alteraciones en la producción de citoquinas, el aumento de la endotoxina bacteriana inducido por el etanol (con la consecuente activación de las células de Kupffer) y la movilización del hierro producida por el etanol con el aumento resultante de los niveles de hierro no hemo de bajo peso molecular (Cederbaum et al., 2009). Estas vías no son excluyentes unas de otras, contribuyendo de forma sinérgica a la capacidad del etanol de inducir un estado de estrés oxidativo.

En modelos murinos de alimentación intragástrica con etanol se ha encontrado que la sustitución de grasas poliinsaturadas por grasas saturadas o triglicéridos de cadena media disminuye o previene la peroxidación lipídica y con ello el ALD, así como que la adición de hierro promueve el estrés oxidativo (Tsukamoto *et al.*, 1995). Asimismo, muchos estudios han demostrado que la administración de quelantes del hierro, agentes reponedores del glutatión (GSH) y antioxidantes como la vitamina E, precursores de la GSH, Superóxido Dismutasa o Ebselen (un imitador de la glutatión peroxidasa) pueden prevenir o disminuir las acciones tóxicas del alcohol, así como que los estados deficitarios de sustancias antioxidantes promueven el ALD (Cederbaum, 2009)

En los casos de consumo crónico de alcohol, el aumento de la proporción de metabolismo del alcohol por la vía del MEOS produce un aumento en la producción de ROS, y con ello daño hepatocitario y alteraciones en la apoptosis, siendo estas reacciones parcialmente bloqueadas por la adición de antioxidantes (Adachi e Ishii, 2002; Bayley y Cunningham, 2002, Wu y Cederbaum, 1999.)

Entre los mecanismos que juegan un papel crucial en el estrés oxidativo inducido por alcohol cabe destacar:

- *Células de Kupffer*: El consumo crónico de alcohol estimula a las células de Kupffer mediante la endotoxina bacteriana o lipopolisacárido, lo que produce un

aumento en la producción de radicales libres con la mediación de la NADPH oxidasa y citoquinas, sobre todo TNF- α (Adachi *et al.* 1994, Imuro *et al.*, 1997); de este modo el daño hepático producido por alcohol se ve reducido si se disminuye la población intestinal de bacterias gram negativas, con la consecuente disminución de producción de endotoxina (Nanji *et al.*, 1994). La destrucción de células de Kupffer o el uso de anticuerpos anti-TNF- α disminuye el daño hepático (Adachi *et al.*, 1994, Imuro *et al.*, 1997).

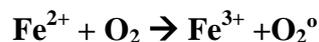
Además la endotoxina bacteriana, por el aumento de ROS, puede producir la activación del factor nuclear kappa beta (NF- $\kappa\beta$) que regula la activación de muchas sustancias proinflamatorias incluyendo el TNF- α , contribuyendo a aumentar y perpetuar el daño tisular (Thurman, 1998; Wheeler and Thurman, 2001; Enomoto *et al.*, 2000)

- *Metales y estrés oxidativo inducido por alcohol:* En presencia de hierro libre o iones de cobre, mediante reacciones de Fenton o de Haber-Weiss catalizada por metales, se pueden producir radicales hidroxilo (McCord, 1998), contribuyendo al desarrollo del estrés oxidativo.

Reacción de Fenton:



Reacción de Harber-Weiss Catalizada por Metales:



De este modo, el hierro cataliza la conversión de ROS menos potentes hacia oxidantes más poderosos, como el radical hidroxilo u oxidantes tipo perferil. En los alcohólicos se produce el aumento de las concentraciones hepáticas de hierro, siendo estos niveles aún más altos en pacientes con cirrosis hepática (Chapman *et al.*, 1983). El aumento de daño celular por el aumento de estos depósitos se ha demostrado en modelos animales (Valerio *et al.*, 1996; Stal *et al.*, 1996). En modelos de administración intragástrica una pequeña adición de hierro condiciona un aumento de los niveles hepáticos de hierro en 2-3 veces sobre lo normal, un aumento de la

peroxidación lipídica, de las transaminasas hepáticas e induce fibrosis (Tsukamoto *et al.*, 1995)

Además el aumento de contenido de hierro en las células de Kupffer por la administración de etanol las sensibiliza para su estimulación por el NF- κ B, con la consecuente superproducción de TNF- α , y el aumento de daño hepático (Tsukamoto *et al.*, 1999). Este efecto se ha visto reducido con la administración de quelantes del hierro, reduciendo la elevación de hierro no hemo, la peroxidación lipídica y la acumulación hepática de grasa y el daño hepático (Tsukamoto *et al.*, 1999; Sadzadeh *et al.*, 1994). La producción de ROS, la peroxidación lipídica y la interacción con quelantes del hierro están aumentados en los microsomas de ratas alimentadas con etanol (Cederbaum, 2003), lo que se asocia con un aumento de los niveles de citocromo CYP2E1.

- *Radical Hidroxietilo-1 (HER)*: El etanol es un agente neutralizador del radical hidroxilo; de su interacción se obtiene el Radical Hidroxietilo-1 (HER) de forma dependiente de una molécula de NADPH (Albano *et al.*, 1997), mediante la producción de superóxido y H₂O₂ a través del citocromo p450, seguido de una generación de radicales oxidantes hidroxil-like catalizada por el hierro. Esta reacción aumenta en presencia del etanol con mayor producción de HER, que se une a proteínas, produciendo aductos proteicos derivados del etanol que son inmunogénicos. La interacción del HER con antioxidantes celulares puede contribuir al mecanismo por el que el etanol produce un estado de Estrés Oxidativo (Reinke, 2002).

- *Mitocondrias, estrés oxidativo y ALD*: El consumo crónico de alcohol produce una alteración tanto estructural como funcional de la mitocondria hepática, produciendo un aumento en la producción de ROS y un aumento de la toxicidad celular (Cunningham *et al.*, 1990), habiéndose demostrado de forma experimental incrementos de radicales superóxido, hidroxilo y H₂O₂ (Boveris *et al.*, 1983; Kukielka *et al.*, 1994, Bailey y Cunningham, 1998-2002). Además se produce una disminución de la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial de forma secundaria que produce el aumento de la acumulación de transportadores de productos reducidos en los complejos I y III.

Hay estudios que demuestran la contribución mitocondrial al incremento de niveles de oxidantes en los hepatocitos, tanto en la exposición crónica al etanol como en la aguda; en modelos murinos se ha demostrado que una dosis única de etanol produce alteraciones en el DNA mitocondrial hepático, dañándolo y degradándolo (Massouri *et al.*, 1999) a pesar de no afectar al DNA nuclear hepático. La administración diaria de alcohol durante 4 días causa una depleción de larga duración en el DNA mitocondrial, probablemente por una afectación de la síntesis (Demeilliers *et al.*, 2002) asociada a un aumento de la peroxidación lipídica y los niveles de CYP2E1. En el caso de animales alimentados con etanol de forma crónica, se ha visto que son más sensibles a la permeabilidad mitocondrial inducida por calcio y otros estímulos apoptóticos que los sujetos control (Pastorino *et al.*, 1999)

- *Estrés oxidativo por óxido nítrico (NO)*: El óxido nítrico, dependiendo de las condiciones, puede ser hepatoprotector o potenciar el daño hepático (Hon *et al.*, 2002), aunque su papel en el desarrollo de ALD aún no está claro. La administración crónica de etanol a ratas aumenta la producción de NO (Wang *et al.*, 1995) que interacciona con el superóxido, contribuyendo al daño hepático por hipoxia inducida por alcohol. En el consumo crónico de alcohol, las células de Kupffer producen NO mediante la acción de la sintetasa de NO inducible (iNOS), habiéndose establecido que el NO producido por la sintetasa de NO endotelial puede ser protector, mientras que el producido por mediación de la iNOS es crítico para la producción de ALD (Mckim *et al.*, 2003). No se conoce aún qué regula el balance entre estos dos tipos de producción del NO en el daño hepático inducido por alcohol.

Además, el consumo crónico de etanol aumenta la sensibilidad a la inhibición del consumo de oxígeno por la mitocondria hepática en ratas mediante la inducción por el NO (Venkatraman *et al.*, 2003), contribuyendo a la hipoxia secundaria al consumo de etanol. Esto no se produce en ratones knockout para iNOS.

- *Reparación celular*: El proteosoma 26S juega un papel primordial en el catabolismo de proteínas dañadas producidas por el estrés oxidativo; una acumulación de las mismas puede generar toxicidad celular. En el consumo crónico de alcohol disminuye la tasa de catabolismo proteico, con la consiguiente acumulación de proteínas defectuosas debido a la correlación inversa entre la actividad de la quimotripsina

proteosomal y la peroxidación lipídica. Esto sugiere una inactivación del proteosoma (Fataccioli *et al.*, 1999) asociada a un aumento de los niveles de CYP2E1, que de forma habitual se degrada por la acción de este proteosoma (Donohue, 2007)

- *Aductos proteicos inducidos por etanol*: Como ya hemos comentado previamente, los aldehídos generados por el metabolismo del etanol (acetaldehído, malonildialdehído, y el 4-Hidroxinonenal (HNE)) pueden unirse a las proteínas, generando aductos proteicos que generan toxicidad mediante dos mecanismos: al alterar la función de dichas proteínas (Niemela, 2001) y por su capacidad inmunogénica (Duryee *et al.*, 2004) como la que presenta el aducto malonildialdehído-acetaldehído (MAA), que tiene capacidad para activar la inmunidad innata estimulando las células T (Willis *et al.*, 2002).

- *Citocromo P450 y estrés oxidativo*: La superfamilia del citocromo P450 está presente de forma ubicua en los organismos vivos, sirviendo como oxidasas terminales en el metabolismo oxidativo de múltiples sustancias: esteroides, ácidos grasos, xenobióticos, drogas, fármacos, toxinas y carcinógenos (Guengerich, 1987). Debido al tamaño de la familia P450, se ha generado un sistema de nomenclatura específico formado por el nombre “CYP” seguido de un número que se refiere a la familia, una letra refiriéndose a la subfamilia y un segundo número, que representa de forma individual el gen dentro de la subfamilia.

Los citocromos P450 catalizan muchas reacciones químicas, incluyendo monooxidación, peroxidación, reducción, dealquilación, epoxidación y dehalogenación (Guengerich, 2001); una de sus funciones principales es catalizar la conversión de una sustancia en metabolito más polar para favorecer su excreción. En algunos casos esta sustancia más polar puede ser más tóxica que el metabolito inicial (como en el caso del acetaminofén, por ejemplo). Para que el citocromo P450 pueda funcionar de forma catalítica, es necesaria la presencia de diferentes reductasas de flavoproteínas (como la NADPH reductasa-P450) necesarias para la transferencia de electrones desde la NADPH o la NADH, causando la reducción del grupo hemo de su estado redox férrico a ferroso. La activación de las enzimas catalíticas por oxígeno mediada por el P450 también puede producir ROS.

Dentro de la familia del P450 es necesario analizar de forma específica el CYP2E1 que es un componente del citocromo P450 inducible por el etanol que se ha aislado en múltiples especies; se encuentra de forma predominante en el hígado aunque también se ha encontrado en otros órganos como el cerebro (Hanson *et al.*, 1990). Dentro del acino hepático el CYP2E1 se encuentra de forma predominante en la región centrolobulillar, donde se produce el daño precoz por parte tanto del etanol como de otras toxinas, como el acetaminofen, las nitrosaminas, etc. (Ingelman-Sundberg *et al.*, 1988).

Se expresa de forma predominante por parte de los hepatocitos, aunque también se han encontrado cantidades significativas en las células de Kupffer y su localización principal es como parte de la membrana del retículo endoplasmático. También hay una proporción de localización plasmática, que puede influir en la hepatotoxicidad mediada por mecanismos inmunes que se observa en pacientes con ALD (Lytton *et al.*, 1999).

Se ha demostrado la dependencia del MEOS del citocromo P450 (Lieber, 1997), siendo éste una vía minoritaria de metabolismo del etanol (menos del 10%) para convertirlo en acetaldehído en condiciones estándar y aumentando su importancia hasta un 50% en casos de consumo crónico de alcohol, como se ha descrito previamente. Este aumento de su actividad se produce tanto por el aumento del contenido total de citocromo P450 como por la inducción específica del CYP2E1, aumentando la capacidad para oxidar el etanol.

El CYP2E1 actúa tanto sobre sustratos endógenos (como la acetona, ácidos grasos como el linoleico y el araquidónico y gases hidrocarbonados derivados de la peroxidación lipídica), como sobre sustratos exógenos, como sería el caso de alcoholes, hidrocarburos aromáticos, aldehídos, el acetaminofen, etc. e incluyendo múltiples procarcinógenos, como por ejemplo las nitrosaminas. La toxicidad de algunos de estos sustratos se ve aumentada con la activación del CYP2E1, como es el caso del etanol.

En el metabolismo del etanol el CYP2E1 influye en dos pasos: aumenta la proporción de su metabolismo por parte del MEOS, y tiene como consecuencia de su acción oxidante sobre el acetaldehído, lo que produce acetato (Terelius *et al.*, 1991). Muchos de los sustratos para el CYP2E1 pueden inducir su propio metabolismo, como

en el caso del etanol (Lieber, 1997 y 1999), que también tiene capacidad para inhibir el metabolismo de otros sustratos mediante competencia, saturando el CYP2E1.

También se ha demostrado la inducción del CYP2E1 en relación con parámetros nutricionales: se ha demostrado *in vitro* un aumento en los niveles en animales obesos, diabéticos y alimentados con una dieta rica en grasa (Raucy *et al.*, 1991), postulándose la influencia de la insulina y de los cuerpos cetónicos en esta activación. También se ha demostrado de forma específica que dietas con bajo contenido en carbohidratos estimulan el sistema MEOS, y que una dieta rica en grasa y con bajo contenido en carbohidratos produce mayores niveles de CYP2E1 en relación con el consumo de etanol (Yoo *et al.*, 1991), aumentando el ALD observado en estos sujetos (Badger *et al.*, 1999).

3.2.- Protección contra la toxicidad por ROS.- De forma natural el ser humano ha desarrollado varios mecanismos protectores contra el daño celular producido por los ROS (Halliwell, 1999; Yu, 1994). Algunos de ellos se ven afectados por el consumo prolongado de alcohol, siendo estos tanto enzimáticos como no enzimáticos:

3.2.1.- Mecanismos enzimáticos.- Incluyen múltiples enzimas como pueden ser las glutatión transferasas, que eliminan reactivos intermedios y aldehídos lipídicos, metalotioneínas, hemo-oxigenasas, tioredoxina, que elimina varios ROS, ceruloplasmina y ferritina, que eliminan metales como el hierro, que es pro-oxidante. Las más importantes en relación con el metabolismo del alcohol son:

- *Superóxido Dismutasa (SOD)*: La SOD es una enzima que elimina O_2^- muy relacionada con diferentes oligoelementos, existiendo diferentes subtipos dependientes de cobre y zinc (presente en citosol y espacio entre membranas mitocondriales, por ejemplo) y de manganeso (localizada en la matriz mitocondrial) y siendo claves para la protección frente a los ROS (Fridovich, 1997). En estudios de instilación intragástrica de etanol en ratones se ha demostrado un descenso de la actividad SOD hepática (Polavarapu *et al.*, 1998)

- *Catalasa*: Ayuda a eliminar H_2O_2 ; se encuentra en los peroxisomas y cataliza una reacción de $2 H_2O_2$ formando H_2O y O_2 . Puede promover la interacción del H_2O_2 con donantes de hidrógeno, convirtiéndose en una molécula de H_2O y oxidando los donantes reducidos (actividad peroxidante). Estos H^+ pueden obtenerse tanto del etanol como del metanol al ser oxidados a acetaldehído y formaldehído.

- *Sistema Glutathion Peroxidasa (GPX)*: Está formado por varios componentes, incluyendo las enzimas glutathion peroxidasa y glutathion reductasa y los cofactores glutathion y NADPH, que eliminan de forma eficaz moléculas de H_2O_2 . El glutathion (GSH) es un componente esencial de este sistema, sirviendo como cofactor a la glutathion transferasa, que colabora con la eliminación de drogas y productos químicos de las células. El sistema glutathion peroxidasa se compone de diferentes selenoproteínas, como veremos más adelante, dependiendo de forma directa de los niveles de selenio.

3.2.2.- *Mecanismos no enzimáticos*.- Se compone de antioxidantes de bajo peso molecular como el glutathion, vitamina E, vitamina C, vitamina A, ubiquinona, ácido úrico, bilirrubina (Halliwell, 1999; Yu, 1994).

- *Glutathion*: Es el antioxidante no enzimático más importante a nivel celular. Las enzimas que median su producción son esenciales para los mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo. El alcohol disminuye los niveles de GSH sobre todo en la mitocondria, donde son cruciales para la eliminación de los ROS generados por la cadena respiratoria (Fernández-Checa *et al.*, 1997). El alcohol puede afectar a sus niveles de forma variable (Fernández-Checa *et al.*, 1997, Iimuro *et al.*, 2000; Oh *et al.*, 1998), sobre todo disminuyéndolos.

La disminución del Glutathion a nivel mitocondrial en relación con el consumo crónico de alcohol es una parte crucial del mecanismo lesivo que conduce a la ALD; debido a la falta de catalasa hepática, el glutathion, mediante su unión a la GPX, genera el mecanismo principal para la detoxificación mitocondrial del H_2O_2 . El consumo crónico de alcohol tanto en el modelo de Lieber deCarli como en modelos de administración intragástrica de etanol ha demostrado producir la disminución de niveles mitocondriales de glutathion en los hepatocitos (Fernández-Checa *et al.*, 1989 y 1997),

preferentemente en los hepatocitos pericentrales donde se produce la mayoría del daño hepático secundario al alcohol (García-Ruiz et al. 1995). Esta disminución producida por el etanol es atribuible al transporte defectuoso de glutatión desde el citosol hacia la mitocondria.

- *Vitamina E (α -tocoferol)*: Es el principal antioxidante en la capa lipídica de la membrana celular, con efecto finalizador de la peroxidación lipídica. Se transforma en vitamina E-radical tras reaccionar con un radical lipídico y puede regenerarse mediante la acción del GSH y del ácido ascórbico. El alcohol puede interferir en el contenido corporal de vitamina E, reduciendo sus niveles (Nanji y Hiller Sturmhöfel, 1997)

- *Vitamina C (ácido ascórbico)*: colabora en la regeneración de la vitamina E en la peroxidación lipídica.

- *S-adenosil-L-metionina (SAM)*: Es el donante metilo principal de forma biológica. Es el precursor principal de la producción del GSH a nivel hepático a través de la conversión de una cisteína por la vía de la transulfuración (Lieber, 2002). Se han descrito alteraciones de su metabolismo en enfermedades hepáticas y enfermedades neurológicas. Su producción está mediada por la metionina adenosiltransferasa (MAT), que cataliza la producción de SAM a partir de metionina y ATP. En el daño hepático se ha identificado una disminución de la actividad de la MAT1A, condicionando la disminución de la concentración de SAM (Avila et al., 2000). Se piensa que la afectación de la producción de SAM puede formar parte en el desarrollo de daño hepático, habiéndose estudiado que el aporte de SAM puede proteger contra el daño inducido por CCl₄, acetaminofen, galactosamina, citoquinas, isquemia-reperfusión, etc. (Song et al., 2004, Chawla et al., 1998).

Los efectos del alcohol sobre las concentraciones de SAM son variables, y se han estudiado en modelos con ratas, cerdos y monos, con diferentes resultados.

Se ha estudiado su influencia en vivo sobre la toxicidad alcohol dependiente y en la mediada por CYP2E1 en múltiples trabajos. Se ha demostrado que el consumo de alcohol a largo plazo producía una disminución de los niveles hepáticos de SAM y de GSH (Lieber et al., 1990), y también que hay una gran correlación entre los niveles hepáticos de ambas sustancias, consiguiéndose el aumento del segundo al administrar

el primero. En el caso del consumo crónico de alcohol se ha visto que la administración de SAM previene los aumentos de producción de superóxido mitocondrial y el daño del DNA mitocondrial producidos por alcohol (Bailey *et al.*, 2006) mientras que en la administración aguda de alcohol la administración de SAM atenúa de forma significativa el daño hepático al disminuir la peroxidación lipídica consecuente a dicha administración de alcohol (Song *et al.*, 2003).

Además se ha sugerido que la disminución de glutatión producida por el alcohol sensibiliza los hepatocitos al daño celular inducido por TNF- α , y que el relleno de glutatión mitocondrial mediado por S-adenosilmetionina protege a los hepatocitos de las ratas tratadas con etanol de la toxicidad mediada por TNF- α (Colell *et al.*, 1998).

4. OLIGOELEMENTOS RELACIONADOS CON LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA Y MECANISMOS ANTIOXIDANTES

Muchas de las enzimas implicadas en los mecanismos de homeostasis del equilibrio redox necesitan diferentes oligoelementos para su correcto funcionamiento. El cobre, el zinc y el manganeso juegan un papel directo en estos mecanismos; en el caso del hierro éste tiene un papel más complejo, fundamentalmente por su acción prooxidante:

4.1.- Hierro.- El hierro se absorbe en el intestino delgado principalmente en el duodeno, donde se produce su reducción para convertirse en catión ferroso en el polo apical del enterocito por medio de una ferreductasa existente en los microvilli. El catión ferroso se transporta al interior del enterocito por el Transportador de Metales Divalentes tipo 1 (DMT-1), almacenándose en el enterocito en forma de ferritina que se transporta desde los enterocitos hasta a la sangre por medio de la ferroportina presente en la membrana basolateral. En este paso influye la hefestina, un análogo de la ceruloplasmina con actividad ferroxidasa.

El hierro también se absorbe desde la luz intestinal mediante su unión a la apotransferrina que se secreta en la bilis. Esta apotransferrina se une a moléculas complejas que contienen hierro estructural, como la mioglobina y la hemoglobina, formando un complejo apotransferrina-hierro denominado transferrina. Esta transferrina se une a receptores epiteliales específicos del intestino delgado, donde se absorbe por pinocitosis mediante un mecanismo lento y poco eficiente que se regula mediante la cantidad de apotransferrina existente, que varía según las necesidades de hierro en los depósitos del organismo. Una vez en la sangre el hierro llega al hígado como hierro libre o como hierro unido a la apotransferrina.

El organismo de forma fisiológica almacena 4-5 gramos de hierro, con una concentración aproximada de 70 ppm para un hombre medio de 70 Kg. Del total de hierro corporal, el 65% se encuentra en la hemoglobina formando parte del grupo hemo, siendo ésta su función principal. Además el hierro es cofactor de múltiples procesos metabólicos, actuando como catalizador enzimático en relación con citocromos, catalasas, peroxidasa, citocromo reductasas, etc. El 15-30% del hierro corporal se encuentra almacenado en el Sistema Mononuclear Fagocítico (SMF) y en las células que forman el parénquima hepático. El exceso de hierro se acumula en los hepatocitos y en menor medida en las células reticuloendoteliales de la médula ósea. Un 4% se encuentra en forma de mioglobina, un 1% formando parte de compuestos relacionados con reacciones de oxidación intracelular y un 0,1% transportándose en el plasma sanguíneo unido a la transferrina.

Del hierro presente en el cuerpo, se estima una pérdida de 0,6 mg/día en el varón, sobre todo en las heces. En la mujer, éstas pérdidas son mayores por las eliminación menstrual que se cuantifica en unos 1,3 mg/día durante ese periodo.

Como ya hemos dicho la mayoría del hierro plasmático no unido al grupo hemo se encuentra unido a la apoferritina formando ferritina; una parte pequeña se encuentra en forma de hemosiderina, una forma muy insoluble que aumenta en situaciones de sobrecarga férrica, pudiendo observarse al microscopio.

Cuando se produce un déficit de hierro, parte del hierro unido a la ferritina se libera para ser transportado por la transferrina, que se une con facilidad a la superficie

de los eritroblastos, produciéndose en ellos la incorporación del hierro mediante endocitosis para sintetizar grupo hemo en la mitocondria.

Cuando se destruyen los hematíes los macrófagos hepáticos (especialmente las células de Kupffer), los esplénicos y la médula ósea, recuperan la hemoglobina liberada separándola del resto de la molécula y liberándola a la sangre unida a la transferrina.

El metabolismo del hierro también se relaciona con la acción de interleukinas proinflamatorias, que producen la estimulación de la hepcidina favoreciendo que el hierro quede atrapado en el SMF y en el hepatocito, evitando su liberación a la sangre. La hepcidina es una hormona peptídica de producción hepática que contribuye a regular los depósitos corporales de hierro al bloquear la actividad de la ferroportina. Al unirse a ella y promover su degradación, atrapa dentro de los enterocitos el hierro procedente de la absorción intestinal y permite su pérdida con la descamación de los propios enterocitos (Ganz, 2003).

La cantidad de hierro almacenado en el SMF se puede estimar mediante la ferritina sérica, encontrándose un aumento de la misma en procesos inflamatorios, tanto agudos como crónicos, a pesar de la presencia de una sideremia disminuida. Esto ocurre incluso en el contexto de la presencia de anemia, condicionando la “anemia de procesos crónicos”, en la que está contraindicada la administración de suplementos de hierro ya que la sobrecarga férrica contribuiría a favorecer la lesión oxidativa.

Además el catión férrico es capaz de generar peroxidación lipídica y con esto daño celular. Se ha sugerido su relación con la lesión hepática producida en la hepatopatía alcohólica, la hepatitis C y en la hemocromatosis (Ren *et al.*, 2010). Se han descrito entidades nosológicas debido al exceso de hierro, como puede ser la hemocromatosis o en otras situaciones de sobrecarga de hierro, como la β -talasemia.

En el caso de sujetos alcohólicos se ha encontrado un aumento de la absorción intestinal de hierro al doble de las cantidades fisiológicas en estudios in vivo (Duane *et al.*, 1992), relacionándose este incremento con el aumento de permeabilidad intestinal al mismo. El exceso de hierro es lesivo para las células de Kupffer, aumentando en ellas la expresión de citocinas proinflamatorias, en especial del TNF- α . Se ha postulado que esta sobrecarga de hierro puede obedecer a una inhibición de la expresión de la

hepcidina hepática, provocando el aumento de actividad de la DMT-1 y con ello el aumento de la absorción intestinal (Harrison-Findik *et al.*, 2006).

El hierro actúa de forma sinérgica con el alcohol, potenciando la producción de ROS y con ello la lesión hepática mediada por alcohol (Kohgo *et al.*, 2005). El hierro agrava el desarrollo de ALD grave induciendo la activación del NF- κ B y de forma secundaria la producción de citocinas inflamatorias por parte de las células de Kupffer, exacerbando el estrés oxidativo inducido por CYP2E1 al producir más radicales hidroxilo y estimulando a las células estrelladas para producir más colágeno y proteínas de la matriz extracelular induciendo la fibrosis, y causando daños y mutaciones en el DNA que pueden promover el desarrollo de neoplasias hepáticas (Purohit, 2003).

4.2.- Cobre.- El 50% de la ingesta diaria de cobre (entre 2 y 5 mg/día) se absorbe para mantener un equilibrio adecuado en el adulto (Solomons, 1980). Es un metal con gran biodisponibilidad. Los alimentos más ricos en cobre son los mariscos y crustáceos, las vísceras, avellanas, legumbres, pasas, frutas con hueso y cacao. Una vez ingerido se absorbe en el estómago y el intestino delgado, sobre todo en su parte proximal. Su absorción está influida por la edad del individuo, por la cantidad y por la forma química del cobre ingerido y por los niveles de otros oligoelementos en la dieta, como el calcio, cadmio, zinc, hierro, plomo, etc. (Underwood, 1977).

La absorción se regula según las necesidades del organismo. Se ha observado que aumenta con el déficit plasmático y con la baja ingesta, aumentando de forma paralela a las ingestas, alcanzando un punto de “saturación” (Underwood, 1977). Una vez absorbido, el cobre plasmático se adhiere de forma laxa a la albúmina y a los aminoácidos, distribuyéndose de forma global y accediendo a los eritrocitos.

El hígado es el órgano principal en el almacenamiento del cobre, siendo un órgano diana en su metabolismo. Al llegar a él, el cobre se distribuye almacenándose de forma variable en diferentes partes del hepatocito (núcleo, mitocondria, microsoma...), o se libera para su unión plasmática a diferentes cuproenzimas como la eritrocupreína producida en la médula ósea o la ceruloplasmina hepática, con actividad en el metabolismo del hierro. El hígado también se encarga de la eliminación del cobre a

través de la vía biliar. De los 2-5 mg que se ingieren al día se absorben 0,6-1,6 mg y 0,5-1,3 mg se excretan por la bilis, 0,1-0,3 mg pasan a través del intestino y 0,01-0,06 mg se eliminan por la orina (Underwood, 1977).

El cuerpo de un adulto sano contiene aproximadamente 80 mg de cobre, con una alta variabilidad individual; los niveles son mayores en el recién nacido, cayendo de forma estable durante los seis primeros meses de vida hasta alcanzar los valores del adulto (Underwood, 1977). En el organismo se distribuye de forma diferente según especie, edad y niveles individuales de cobre. En los seres humanos, el hígado y el cerebro contienen una cantidad similar, estando también presente en riñones, corazón y cabello. Hígado, riñón, sangre, bazo, pulmón, cerebro y hueso reaccionan ante los cambios en las concentraciones orgánicas del cobre.

El 60% del cobre de los glóbulos rojos se encuentra unido a la eritrocupreína, una proteína soluble con afinidad por el cobre de presencia en múltiples tejidos. En el caso de los humanos, la eritrocupreína posee dos átomos de zinc y tiene una actividad similar a la Superóxido-Dismutasa (SOD), convirtiendo dos radicales superóxido monovalentes en agua oxigenada y oxígeno molecular utilizando dos protones. Además, en el plasma, el cobre se encuentra unido fuertemente a la ceruloplasmina, existiendo una gran correlación entre sus niveles plasmáticos y los de cobre sérico, y con ello, con el contenido total de cobre. También se encuentra unido a la albúmina, que es el verdadero transportador sanguíneo del cobre. La ceruloplasmina es una ferroxidasa que aumenta la saturación de la transferrina plasmática, interfiriendo en el metabolismo del hierro. El resto del cobre plasmático se encuentra unido a aminoácidos y formando parte de cuprometaloenzimas en diferentes proporciones según el estado de cobre del individuo.

La concentración normal de cobre en plasma en seres humanos adultos es de $105,5 \pm 5,03 \mu\text{g}/100 \text{ mL}$ para el hombre y $114 \pm 4,67 \mu\text{g}/100 \text{ mL}$ para la mujer (Underwood, 1977). Se ha documentado un aumento de los niveles plasmáticos de cobre tanto en el embarazo como en el contexto de toma de anticonceptivos, relacionándose con los estrógenos. El déficit de ingesta de cobre se relaciona con niveles plasmáticos bajos de cobre, mientras que la intoxicación por exceso precisa ingestas muy elevadas.

El hígado almacena el cobre incluso en estados de déficit marcado en el sistema nervioso central, huesos, tejido conectivo y médula ósea. La hipocupremia se puede asociar con estados patológicos como el de la nefrosis, el Kwashiorkor y la fibrosis quística, pudiendo mostrar niveles séricos de cobre inferiores a la mitad de lo normal. Estos individuos también presentan niveles de ceruloplasmina anormalmente bajos (Underwood, 1977). La hipocupremia de forma mantenida produce anemia y disminución del número de reticulocitos, disminuye la vida media de los eritrocitos y produce alteraciones en la capacidad de absorber hierro, movilizarlo y utilizarlo en la síntesis de hemoglobina, acumulándose en la mucosa duodenal con alteraciones de su liberación al plasma.

En la inducción de hipocupremia en modelos experimentales se ha apreciado un agrandamiento de las mitocondrias hepatocelulares, con una deformidad consecuente en probable relación con la alteración de la permeabilidad de la membrana de las organelas.

La mayoría de las infecciones, tanto agudas como crónicas y de cualquier etiología (bacteriana o vírica) pueden producir hipercupremia. Esto también se ha observado en la leucemia, anemias, hemocromatosis o Enfermedad de Hodgkin, evidenciándose elevaciones en los niveles de cobre sérico y ceruloplasmina por asociación con una redistribución del cobre desde el hígado, probablemente en relación con la acción de citocinas proinflamatorias que estimulan el hígado para producir cantidades extra de ceruloplasmina (Underwood, 1977). En el caso de la enfermedad de Wilson se produce la acumulación anormal de cobre en hígado, cerebro, riñón y córnea.

En modelos experimentales con animales se ha observado que la necrosis produce una liberación del cobre desde el hígado a la sangre, que produce hemólisis fatal y un cuadro de insuficiencia renal similar al que se observa en pacientes con Enfermedad de Wilson Fulminante (Ishmael *et al.*, 1971). Cualquier componente del hepatocito es susceptible de ser dañado por el exceso de cobre. En el caso de la membrana plasmática ésta se altera, afectando su capacidad para comportarse como barrera contra la difusión de moléculas pequeñas e iones, modificando la interacción de las proteínas con la membrana lipídica (Hwang *et al.*, 1972). La unión del cobre a los grupos sulfidrilos interfiere con la polimerización de la tubulina citosólica, produciendo la degradación de

los microtúbulos y afectando la formación del huso mitótico, las funciones nucleares y la exportación de proteínas y triglicéridos desde el hepatocito, con el depósito intracelular con balonamiento hepatocitario (Sternlieb, 1980).

Además el exceso de cobre se relaciona con la depleción de las reservas celulares de glutatión, favoreciendo la necrosis, y con ello la desestabilización del DNA nuclear y la labilización de las membranas lisosomales, con la consecuente pérdida de enzimas en el citoplasma estimulando la producción de fibrosis. Tanto en modelos animales como humanos, en el contexto de la enfermedad de Wilson, esta hepatitis focal progresa a hepatitis crónica y cirrosis hepática.

La intoxicación aguda por cobre produce daños gastrointestinales y necrosis hepática junto con clínica de náuseas y diarrea. En el caso de la toxicidad crónica, como la que se produce en la enfermedad de Wilson –una enfermedad autosómica recesiva de depósito de cobre-, se produce un acúmulo inicial de cobre en el hígado y posteriormente en otros tejidos, como el sistema nervioso central, los ojos y los riñones. Se desarrolla de forma predominante en estadios tempranos de la vida y se manifiesta con debilidad, ictericia, dolor abdominal, ascitis, hipertensión portal e incluso insuficiencia hepática. Histológicamente en sus fases iniciales se caracteriza por la aparición de gotas lipídicas en el citoplasma y balonamiento del núcleo hepatocitario por el contenido de glucógeno junto con el pleomorfismo de la mitocondria hepática y una matriz intracelular con un aumento de densidad. Esta esteatosis inicial progresa hacia la fibrosis y finalmente a cirrosis hepática.

La acción antioxidante del cobre se centra en su función como cofactor de la Superóxido-Dismutasa (SOD), catalizando la unión de dos aniones superóxido y dos iones de hidrógeno para convertirlos en una molécula de agua oxigenada y una de oxígeno, de forma similar a lo que hemos descrito para la eritrocupreína:



El agua oxigenada resultante es mucho menos lesiva que los aniones superóxido, contribuyendo así de forma marcada en el mantenimiento del equilibrio Redox.

4.3.- Manganeso.- Las necesidades de manganeso de un adulto sano se estiman entre 2-5 mg/día; es un oligoelemento muy común en la dieta, encontrándose en frutos secos, cereales, tubérculos, frutas, vegetales sin hoja, y tejidos y fluidos animales. El contenido orgánico de manganeso es de entre 12-20 mg para un adulto de 70 Kg con una distribución más o menos uniforme (Underwood, 1977). Se encuentra más concentrado en las mitocondrias, siendo más abundante en órganos con alto contenido mitocondrial, como pueden ser el hígado, el hueso y el riñón.

El 3-4% de la absorción de manganeso se produce en el intestino, captándose desde la luz intestinal a lo largo de todo el tracto digestivo y transfiriéndose a través de las células de la mucosa intestinal de forma simultánea mediante un mecanismo que compite con el hierro y el cobre. La absorción de manganeso se ve aumentada en situaciones de déficit de hierro, y disminuye con la administración oral del mismo. Hay evidencias que apoyan que el calcio disminuye la cantidad de manganeso disponible en la luz intestinal, por adsorción dificultando además su retención hepática (Underwood, 1977).

La concentración sanguínea de manganeso varía desde desde 8,45 µg/L hasta 69 µg/L; se han encontrado niveles superiores a lo habitual en casos de eventos isquémicos coronarios agudos y artritis reumatoide. Una vez absorbido, el manganeso puede permanecer libre en la circulación portal o unirse rápidamente a la α_2 -macroglobulina antes de atravesar el hígado. A su paso por el hígado la mayor parte del manganeso unido a proteínas se extrae, quedando una pequeña parte aún relacionada con la α_2 -macroglobulina que pasará a la circulación sistémica para ser oxidado a estado mangánico y unirse a la transferrina.

La alimentación con etanol ha demostrado incrementar el manganeso hepático, en probable relación con un incremento en la absorción, que puede llegar a verse duplicada mediante el metabolismo intestinal del etanol (Underwood, 1977).

El aclaramiento ocurre en tres pasos: primero se produce el movimiento del ión por transcipilaridad, posteriormente la entrada del metal en las mitocondrias y por último la entrada de manganeso en los núcleos celulares. Este último proceso se produce de forma lenta debido a la baja tasa de recambio de los núcleos celulares. Los patrones

de aclaramiento sanguíneo y de captación de manganeso en el hígado son similares (Underwood, 1977).

La excreción principal del manganeso se produce a través de su paso por la bilis, siendo secretado con las heces. La concentración biliar de manganeso puede aumentar de forma exponencial ante situaciones de sobrecarga. En caso de bloqueo de la vía biliar, la secreción pancreática de manganeso puede aumentar. La excreción urinaria en condiciones normales es muy escasa.

El déficit de manganeso se ha observado en humanos en asociación con un déficit de vitamina K. Sus manifestaciones dependen del grado y duración del mismo, así como de la edad y el estado de desarrollo del sujeto. Se producen alteraciones de la función reproductiva, ataxia del recién nacido, defectos en el metabolismo de lípidos e hidratos de carbono, defectos en el crecimiento y anormalidades esqueléticas. En el caso del manganeso es muy relevante considerar el estado nutricional del sujeto y el aporte de proteínas, ya que es un elemento fuertemente ligado a proteínas animales, al igual que el zinc. De modo similar al cobre, el manganeso también es un cofactor de la SOD, por lo que su déficit podría contribuir a la lesión oxidante asociada al consumo de alcohol.

La intoxicación por manganeso produce retraso en el crecimiento, disminuye el apetito y de forma consecuente el peso corporal.

4.4.- Zinc.- Un adulto sano ingiere unos 10-15 mg de zinc al día; el ser humano presenta requerimientos variables a lo largo de la vida, con diferencias entre hombres y mujeres. Las fuentes más ricas de zinc son las ostras y mariscos, la carne, los cereales en grano y las avellanas (Underwood, 1977). El zinc se absorbe sobre todo en el intestino delgado, con una escasa absorción en el estómago o el intestino grueso; la captación se produce por una proteína de unión al zinc, secretada por el páncreas y transportada a través de las microvellosidades al interior de la célula epitelial, donde se transfiere al lado plasmático de la membrana basocelular por medio de sitios de unión específicos. Desde aquí se une a la albúmina plasmática, que determina la cantidad de zinc que se libera de la membrana basocelular a partir de la cantidad que entra en el organismo.

El zinc de la dieta es secuestrado al interior de las células epiteliales intestinales por proteínas de unión formadas en respuesta a la concentración zinc, inhibiendo su transferencia a la albúmina y permitiendo que se excrete por descamación del epitelio mucoso. El calcio, el cobre y otros metales inhiben parcialmente su absorción mediante competición por los sitios de unión de la albúmina (Underwood, 1977). La ingesta elevada de fosfato inorgánico también agrava el déficit de zinc en modelos animales, con efecto independiente y aditivo al efecto del calcio. La caseína y los extractos de hígado pueden aumentar la absorción de zinc, mejorando también su utilización. Otros factores relevantes en la absorción de zinc son la cantidad de alimento del individuo, la velocidad del tránsito intestinal y la etapa de crecimiento (Underwood, 1977). El zinc presenta un antagonismo con el calcio en cuanto a su absorción intestinal, a nivel de la transferencia desde la mucosa al plasma, al igual que con otros metales divalentes.

El zinc, una vez absorbido en el intestino delgado, se transporta al hígado en el plasma del sistema portal, unido en su mayoría a albúmina y en pequeñas cantidades a la transferrina y otras α_2 -macroglobulinas. Se incorpora a velocidad variable a diferentes tejidos, con tasas de recambio diferentes. El zinc presente en páncreas, hígado, riñón o bazo está disponible de forma rápida para su uso metabólico (Underwood, 1977) en el caso de que sea preciso.

El principal órgano del que depende el metabolismo del zinc es el hígado. El aumento de la cantidad de zinc hepático se asocia a la cantidad del mismo en forma de metalotioneína o metalotioneína-like, proteínas que aumentan proporcionalmente con el aumento de entrada de zinc al organismo. La metalotioneína es una reserva proteica de zinc análoga al de la ferritina para el hierro presentando una unión lábil que permite su rescate en caso de necesidad y su secuestro en situaciones de sobrecarga de zinc, impidiendo su unión a albúmina.

El cuerpo humano contiene de 1,4 a 2,3 g de zinc, de los cuales un 90% se encuentra en el tejido muscular, óseo, piel y pelo. Menos del 1% se encuentra circulando en sangre, tanto en plasma como en sus elementos formes. El 75-88% del zinc total en sangre se encuentra en los eritrocitos, el 12-22% en el plasma y el 3% en leucocitos. La concentración de zinc en suero humano es superior a la del plasma en aproximadamente un 16%. El 30-40% del zinc plasmático se encuentra unido a una α_2 -

macroglobulina, y el 60-70% a la albúmina de una forma más laxa. En los eritrocitos el zinc se encuentra de forma predominante en la anhidrasa carbónica, con una pequeña fracción asociada a otras enzimas.

La excreción del zinc ocurre de forma predominante por las heces. En ellas se encuentra hasta el 70% del zinc ingerido. Una cantidad de origen endógeno se secreta hacia el intestino delgado y una pequeña cantidad hacia bilis, ciego y colon. Sólo un 0,25-0,30% del zinc ingerido se excreta por la orina (Underwood, 1977). La excreción urinaria de zinc aumenta en situaciones como la nefrosis, la cirrosis hepática alcohólica y la porfiria hepática, así como en situaciones de inanición absoluta y en la administración de sustancias quelantes, como el DTPA y el EDTA (ácidos dietilenti-aminopentaacético y etilen-dinitrilo-tetraacético) (Underwood, 1977)

La enfermedad y el estrés producen cambios en la concentración plasmática de este metal. Se han encontrado valores inferiores a lo normal en pacientes con aterosclerosis, enfermedad hepática (incluyendo cirrosis alcohólica), enfermedad neoplásica, tuberculosis, lepra, anemia perniciosa y lesiones infecciosas agudas o crónicas. También se ha evidenciado un descenso en los niveles plasmáticos en relación con administración de grandes dosis de corticoides en situaciones de gran estrés quirúrgico o quemados, con un descenso rápido y sostenido (Underwood, 1977).

El déficit de zinc puede producir alteraciones del crecimiento, del desarrollo esquelético, del apetito, del gusto, la queratogénesis, la cicatrización, el metabolismo proteico, hidrocarbonado, lipídico y de ácidos nucleicos, así como la alteración de funciones enzimáticas, cambios hematológicos y desarrollo de aterosclerosis. La falta de zinc puede provocar un deterioro en la síntesis de DNA y del metabolismo proteico, ya que enzimas como al RNA y la DNA polimerasa son zinc-metaloenzimas relevantes para la división celular y la síntesis proteicas. También es importante para el funcionamiento de otras dipeptidasas, decarboxilasas y deaminasas, que lo utilizan como cofactor, afectando al metabolismo de los aminoácidos y de la síntesis de colágena.

Se ha atribuido un papel importante al déficit de zinc presente en el alcohólico en la progresión de la hepatopatía etílica (Kang *et al.*, 2009) de modo similar al selenio,

especialmente si se asocia a cirrosis hepática (Sullivan y Heaney, 1970) ya que también es cofactor de enzimas antioxidantes, como la SOD y la GPX7; además el zinc inhibe la prolilhidroxilasa. Por eso el déficit de zinc puede favorecer la fibrogénesis hepática, existiendo datos experimentales que apoyan este fenómeno (Anttinen *et al.*, 1984)

De forma teórica, el tratamiento con un cofactor antioxidante como el selenio podría minimizar el déficit de mecanismos antioxidantes en presencia de un déficit de zinc.

4.5.- Selenio.- El selenio es un elemento traza esencial que es parte constituyente fundamental de las selenoproteínas; también es un micronutriente necesario para todas las formas de vida conocidas. Descubierta en 1.817 por Berzelius, ha sido descrito tanto en células eucariotas como procariotas. Schwartz y Foltz establecieron en 1.957 su papel esencial como micronutriente en la nutrición animal descubriendo que era el llamado “Factor 3”, que asociado a la vitamina E y los aminoácidos azufrados podía prevenir la degeneración necrótica del hígado (Schwartz y Foltz, 1957). En 1.973 Rotruck lo identifica como parte del centro activo de la enzima Glutathion Peroxidasa de los mamíferos y en 1977 se descubre una segunda selenoproteína que contiene selenio y selenocisteína, la selenoproteína P (Herrman, 1977). A día de hoy se han identificado 15 selenoproteínas, lo que incluye 7 glutathion peroxidases, 3 deiodinasas de las yodotironina y la tioredoxín reductasa.

El selenio juega un papel tanto a nivel estructural como de la función enzimática en las selenoproteínas. Su función antioxidante ha demostrado importantes implicaciones en la protección contra el daño producido por los radicales libres, la producción de hormona tiroidea activa y para el correcto funcionamiento del sistema inmune

4.5.1.- Absorción.- El selenio es una sustancia que ha de ingerirse. Se encuentra presente en la dieta como el resto de micronutrientes, aunque su concentración en los alimentos depende de la concentración existente en el suelo de las áreas de producción de los alimentos (disponibilidad biológica). Hay ciertas regiones con cantidad insuficiente, como Estados Unidos, Finlandia, Noruega, Nueva Zelanda y algunas

provincias de la República Popular China, condicionando el desarrollo de algunas enfermedades por su déficit.

En la naturaleza se puede encontrar en diversas formas químicas: selenato (Se^{+6}), selenito (Se^{+4}), selenio elemental (Se^0) y selenuro (Se^{-2}). Se consume principalmente en forma de dos selenoaminoácidos: la selenocisteína y la selenometionina, presentes en el pan, cereales, pescado, carnes, legumbres y huevos. La selenometionina procede de fuentes vegetales y animales, mientras que la selenocisteína sólo se obtiene de fuentes animales, que es la forma más biodisponible. La ingesta diaria recomendada según la FDA varía según la edad del individuo, alcanzando unos niveles en adultos de entre 55 μg (en adultos) y 70 μg (en embarazadas lactantes), pudiendo provocar efectos tóxicos en dosis de más de 400 μg .

La concentración plasmática de selenio se correlaciona de forma adecuada con el contenido corporal de selenio en el organismo, siendo la espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica y corrección de fondo por efecto Zeeman la técnica de elección para su determinación (Casals-Mercadal *et al.*, 2005)

4.5.2.- Metabolismo del selenio.- Se postula que la forma química en la que se consume (selenito, selenato o selenoaminoácido) puede afectar a su absorción y con ello a su posible toxicidad. Actualmente se cree que la forma orgánica, en forma de selenoaminoácidos constituyentes de proteínas es la más beneficiosa, siendo estas las formas más biodisponibles:

- *Selenometionina (Se-Met)*: Procede tanto de fuentes vegetales como animales. No puede sintetizarse el cuerpo humano y constituye un reservorio de selenio en el organismo, mediante su incorporación a las proteínas. No se conoce que tenga una función fisiológica separada de la de la metionina, a la que sustituye de forma aleatoria. En casos de déficit de selenio, puede extraerse de la selenometionina mediante la proteólisis, obteniéndose en forma de selenuro.

- *Selenocisteína (Se-Cys)*: Es la forma biológica más activa. Se obtiene a partir de fuentes animales; puede sintetizarse por parte del organismo mediante la reprogramación de la transcripción del codón UGA del RNA mensajero, siendo conocida como el aminoácido 21 (en condiciones normales este codón es leído como un

codón de finalización). No se conoce que pueda intercambiarse con la cisteína, con la que comparte estructura con la excepción de que sustituye el azufre por selenio. Este cambio permite una mayor ionización, ya que los grupos selenol se ionizan más que los tiol en presencia de un pH fisiológico. Constituye el 80% del selenio que forma parte de las selenoproteínas y se cataboliza de forma directa, sin constituir un almacén.

Las formas inorgánicas Se^{+6} y Se^{+4} no contribuyen prácticamente al aporte diario en condiciones normales; sólo son importantes como formas de suplementación en dietas experimentales o situaciones concretas (pacientes sometidos de forma exclusiva a nutrición parenteral durante un periodo de tiempo o disfunciones intestinales severas). El selenuro, sea cual sea su origen, se utiliza para la formación de selenofosfato, el precursor de la selenocisteína, y con ello de las selenoproteínas.

La absorción del selenio se produce de forma fisiológica en el tracto gastrointestinal, predominantemente en el duodeno. El 90% de la Se-Met se absorbe por el mismo mecanismo que la metionina, pero se conoce poco el mecanismo de absorción de la Se-Cys. Ambas promueven mayor retención de selenio en los tejidos corporales que ingestas equivalentes de selenito o selenato (Underwood, 1977). Tras su absorción el selenio circula en plasma mediante la unión a diferentes selenoproteínas. La selenoproteína P contiene 1/3 del Se plasmático, mientras que la selenoproteína W contiene 1/6 parte; el resto se encuentra unido de forma no específica a la albúmina, desde donde se desplaza a los tejidos.

En el caso de los eritrocitos, el selenio unido a la albúmina es desplazado a las fracciones globulares; en ellos se transporta en gran medida por β -lipoproteínas y por una fracción globulínica entre la α_1 y α_2 (Underwood, 1977), formando parte de sus proteínas de por vida. También se incorpora a la mioglobina, el citocromo C, enzimas musculares (miosina, aldolasa) y nucleoproteínas. En sangre la concentración de selenio es mayor dentro de los eritrocitos que en el plasma, con valores de $0,130 \pm 0,014$ ppm en sangre y $0,102 \pm 0,018$ ppm de selenio en plasma (Underwood, 1977) en adultos sanos.

En tejidos diferentes de los eritrocitos, el selenio es una sustancia lábil que se moviliza rápidamente de forma inicial y posteriormente a menor velocidad. Se

distribuye principalmente por el hígado, riñones, páncreas y músculos. Atraviesa la barrera placentaria y se excreta en la leche materna en cantidades proporcionales a la ingesta, por lo que las cantidades diarias recomendadas en mujeres lactantes son mayores para la correcta nutrición del recién nacido. Presenta diferentes concentraciones en los diferentes tejidos. Hígado y riñón son las vísceras más ricas en selenio, con menor concentración en hueso, músculo y sangre (Underwood, 1977). El depósito de selenio en estos tejidos mantiene una relación directa con el nivel inorgánico del mismo en la dieta (hasta dietas de 0,2-0,3 ppm), que puede incrementarse con dietas algo más ricas (hasta 0,8 ppm) en hígado y riñón, aunque no en los otros tejidos.

En caso de que exista un exceso de selenio, se procede a su excreción principalmente por metabolismo renal, que es el que condiciona su homeostasis y gastrointestinal, tanto por excreción fecal como por las secreciones biliar, pancreática e intestinal. En algunos casos de intoxicación extrema puede producirse eliminación pulmonar en aire espirado, aunque esta excreción depende tanto de las cantidades ingeridas como de los niveles de otros elementos en la dieta, como pueden ser el arsénico, el talio, el cadmio y el mercurio, no siendo así en el caso del plomo y el zinc. En intoxicaciones leves, la eliminación pulmonar es apenas relevante (Underwood, 1977).

Dado su papel antioxidante, sus necesidades se ven aumentadas en casos de aumento del estrés oxidativo celular, como pueden ser la patología vascular, tumoral, la diabetes, etc.

En el paciente alcohólico, muchos estudios (González-Reimers *et al.*, 2008; Thuluvath y Triger, 1992; Dworkin *et al.*, 1988) –aunque no todos– encuentran niveles bajos de selenio, especialmente en cirróticos, que se relacionan con el pronóstico (González-Reimers *et al.*, 2008). En la malnutrición calórico-proteica se han descrito niveles bajos de selenio (Sempertegui *et al.*, 2003) y también se han encontrado niveles descendidos en niños afectos de Kwasiorkor (Underwood, 1997).

4.5.3.- *Funciones biológicas del selenio.*- El selenio se encuentra en los tejidos unido o formando parte de proteínas, en sustitución del azufre y formando seleno-aminoácidos, siendo la máxima expresión de esto la Glutathion-Peroxidasa (GPX) (Underwood, 1977).

Al ser constituyente de las selenoproteínas en forma de Se-Cys se producen las principales funciones biológicas del selenio; la Se-Cys se integra en la cadena polipeptídica principal como un aminoácido más, sustituyendo a la cisteína y contribuyendo a favorecer la actividad catalítica (cuando en lugar de una selenocisteína se coloca una cisteína, se produce una reducción drástica de la actividad catalítica). La transcripción de la Se-Cys no tiene relación con la concentración de selenio del individuo, aunque hay estudios que sugieren que su producción puede estar inhibida en situaciones de respuesta de fase aguda, en relación con las concentraciones de TNF- α , interferón γ e interleukina 1B. Las selenoproteínas más conocidas son:

- *Selenoproteína P:* Glicoproteína extracelular abundante de producción hepática, con gran potencia antioxidante y de recambio rápido. Contiene más de 12 residuos de Se-Cys y tras su producción se libera a la circulación, contribuyendo a proteger al endotelio de oxidantes de producción local. Además transporta 1/3 de la cantidad corporal de selenio; se han descrito hasta 4 isoformas en el plasma murino que comparten el extremo N-terminal y se ha aislado sólo en vertebrados.

- *Selenoproteína W:* Proteína muscular de función no conocida, que se expresa en músculo esquelético y miocardio. Transporta 1/6 parte del selenio del organismo.

- *Glutathion Peroxidasa (GPX).*- Es una enzima catalítica que se encarga de participar en la reacción de oxidación del glutathion a glutathion disulfuro mediante la utilización de peróxido de hidrógeno utilizando el selenio como cofactor. Se encuentra de forma amplia en la naturaleza, siendo constituyente celular en múltiples organismos (bacterias, protozoos, vertebrados...). Mediante la GPX el selenio ejerce su función principal y más importante, la de antioxidante.

La oxidación rápida de la Se-Cys por los hidroperóxidos contribuye de forma sustancial en el primer paso catalítico de la reacción peroxidasa, utilizando el glutathion para reducir los peróxidos lipídicos y protegiendo de este modo las membranas celulares

de su acción oxidativa. Su actividad antioxidante se lleva a cabo a través de las siguientes reacciones acopladas:



La funci3n principal de la GPX es proteger el organismo del efecto delet3reo de los hidroper3xidos que se forman de forma end3gena; la mayor parte de la actividad de la GPX se produce en el h3gado y de forma moderada hay actividad en eritrocitos, m3sculo cardiaco, pulmones y ri3ones. La glutati3n peroxidasa humana tiene varias isoformas, con diferentes caracter3sticas distintivas:

Glutati3n peroxidasa 1 (GPX1).- Tiene como funci3n proteger la hemoglobina de los eritrocitos de una rotura oxidativa. Se constituye como un homotetr3mero, y su localizaci3n principal es el citoplasma celular.

Glutati3n peroxidasa 2 (GPX2).- Tiene como funci3n proteger a los mam3feros de la toxicidad de los hidroper3xidos org3nicos ingeridos en la dieta. Se constituye como un homotetr3mero de localizaci3n citoplasm3tica y nuclear, y se expresa sobre todo en el h3gado y el tracto intestinal (sobre todo en las c3lulas de Paneth del intestino delgado, influyendo en la inmunidad a nivel de la mucosa)

Glutati3n peroxidasa 3 (GPX3).- Su funci3n es proteger a las c3lulas y las enzimas del da3o oxidativo, catalizando la reducci3n del per3xido de hidr3geno por el glutati3n. Se constituye como un homotetr3mero secretado en el plasma, siendo una enzima citos3lica presente en h3gado, coraz3n, g3nadas, plasma, suero y l3quido cefalorraqu3ideo.

Glutati3n peroxidasa 4 (GPX4).- Es un fosfol3pido hidroperoxidasa que protege las membranas celulares del da3o oxidativo al producir la reducci3n de los hidroper3xidos de fosfol3pidos y colesterol a sus alcoholes correspondientes. Se encuentra en citoplasma, n3cleo y mitocondrias. Su p3rdida de actividad se ha asociado con infertilidad masculina, arterioesclerosis, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson.

Glutation peroxidasa 5 (GPX5).- Tiene una función similar a la GPX3, constituyendo un sistema de protección contra el daño de los peróxidos en los lípidos de membrana. Se secreta en el epidídimo y posee una cisteína en el lugar de una selenocisteína, confiriéndole una actividad menor.

Glutation peroxidasa 6 (GPX6).- Se expresa en el epitelio olfativo.

Glutation peroxidasa 7 (GPX7).- Se encuentra en el citoplasma; de morfología monomérica se postula su utilidad para mejorar el estrés oxidativo en el cáncer de mama en relación con la ingesta de ácidos grasos en la dieta.

Se encuentran en estudio otras probables isoformas, como la glutacion peroxidasa 8, cuyo papel no está definido por el momento.

El selenio es un componente esencial de la GPX; la actividad de esta enzima depende del selenio de tal forma que ante la disminución extrema de la concentración de este elemento, su actividad catalítica queda prácticamente anulada (Underwood, 1977).

- *Tioreduxín reductasa:* De función principalmente inmunológica, tiene tres isoformas y colabora en procesos tan diversos como la reducción de ribonucleótidos o la regulación redox de las señales de citocinas.

- *Iodotironina desyodasa:* cataliza la desiodación de la tiroxina (T4) y otras iodotironinas, regulando la síntesis y degradación de las hormonas tiroideas.

4.5.4.- Toxicidad por selenio.- La ingesta diaria máxima tolerable se considera de 400 µg/día. (MacFarguhar *et al.*, 2010). Se han descrito síntomas de toxicidad tanto en animales como en seres humanos en zonas con una edafología abundante en selenio, produciéndose el *blind staggers disease*, que consiste en alteraciones de la visión, pérdida del apetito y alteraciones de la marcha (deambulación en círculos). Se evidencia tras un periodo breve de ingesta diaria muy elevada, que si persiste puede producir parálisis de la lengua, de mecanismos deglutorios y depresión respiratoria con la muerte consecuente. (Casals-Mercadal *et al.*, 2005). En casos de concentraciones menos elevadas pero mantenidas en el tiempo se puede desarrollar Selenosis, una entidad consistente en fragilidad y pérdida de pelo y uñas, con afectación gastrointestinal, lesiones cutáneas, caída de los dientes y afectación del sistema nervioso. La toxicidad

aguda se caracteriza por náuseas, vómitos, diarrea, pérdida de pelo, cambios ungueales, acidosis metabólica, irritabilidad, fatiga, neuropatía periférica y fetor a ajo (por exhalación de dimetil selenio, un metabolito intermedio en la excreción del exceso de selenio)

4.5.5.- *Selenio y enfermedad.*- En relación con el déficit crónico de selenio, se han descrito dos enfermedades principalmente: la *Enfermedad de Keshan*, que es una miocardiopatía endémica descrita en Keshan (China) en 1935 en relación con cofactores tales como la infección por Cocksackie (Rayman, M., 2000), y la *Enfermedad de Kashin-Beck*, una osteoartritis endémica en adolescentes y preadolescentes (Rayman, M., 2000).

Déficits parciales de selenio se han relacionado con la etiología de múltiples enfermedades, aunque en varios casos se ha demostrado que dicho déficit puede ser consecuencia de la propia enfermedad, al tiempo que contribuye a exacerbarla (Rayman, M., 2000). Además se ha demostrado relación del selenio con los siguientes procesos patológicos:

- *Inmunología.*- Múltiples estudios sufieren que el déficit de selenio se asocia con pérdida de inmunocompetencia. La suplementación de la dieta con selenio, incluso en casos de contenido corporal de selenio adecuado, tiene efectos inmunoestimulantes, con mejor proliferación de células T activadas (expansión clonal), y también mejor regulación de la expresión del receptor para IL-2 en la superficie de linfocitos activados y células NK (Rayman, M., 2000)

- *Infecciones:* El selenio es un potente inhibidor de la replicación del VIH in vitro, siendo su concentración plasmática predictor de la progresión e la infección por VIH, al disminuir de forma paralela a los linfocitos CD4 (Look *et al.*, 1997). Además parece proteger contra la progresión a carcinoma en individuos VHB y VHC positivos (Yu *et al.*, 1999)

- *Reproducción:* el selenio es preciso para la biosíntesis de testosterona y para la formación y normal desarrollo de los espermatozoides

- *Estado de ánimo*: varios estudios relacionan la deprivación de selenio con ánimo deprimido y comportamiento hostil. También se ha descrito que la suplementación de selenio disminuye la ansiedad y la depresión (Finley, J.W; Penland, J.G., 1998)

- *Función tiroidea*: se produce una exacerbación del hipotiroidismo al sumar un déficit de yodo al déficit de selenio (Rayman, M., 2000)

- *Enfermedad cardiovascular*: Varios estudios muestran concentraciones de selenio significativamente bajas en pacientes con cardiopatías de diversas etiologías, no se sabe si como causa o como consecuencia (Guo *et al.*, 2012, Alissa *et al.*, 2003)

- *Cáncer*: Se ha relacionado déficit relativo de selenio con la posibilidad de desarrollar cáncer de próstata (Klein EA *et al.*, 2011), con la mortalidad del carcinoma renal (Drewniak *et al.*, 2012), con el riesgo de cáncer colorrectal y con el riesgo de melanoma (Vinceti *et al.*, 2012), siendo en este momento un campo muy activo de la investigación oncológica, incluido su uso como prevención de toxicidades por quimioterapia.

III. OBJETIVOS

Hemos visto por lo tanto la importancia de la lesión oxidante en la génesis de la hepatopatía etílica y el papel relevante que puede jugar el déficit de selenio en la misma. También hemos esbozado que las lesiones iniciales de la hepatopatía alcohólica consisten en el balonamiento hepatocitario y esteatosis hepática constituyendo los primeros eslabones en la cadena que conduce a la fibrosis y cirrosis hepática. Hemos señalado también que la administración de alcohol como parte de una dieta líquida ayuda a discernir en modelos experimentales las lesiones hepáticas precoces, permitiendo valorar también el efecto de la malnutrición proteica sobre estas alteraciones. Por todo ello hemos planteado el este trabajo con los siguientes objetivos:

- 1.- Analizar los efectos de la suplementación con selenio sobre los cambios morfológicos precoces de la hepatopatía etílica, utilizando para ello un modelo murino alimentado según la pauta de Lieber-DeCarli.
- 2.- Analizar las alteraciones que tanto alcohol como malnutrición producen sobre la actividad antioxidante hepática (valorada como actividad de la Glutación Peroxidasa) y peroxidación lipídica (valorada por los niveles hepáticos de Malonildialdehído)
- 3.- Analizar el efecto de la suplementación con selenio sobre la actividad antioxidante y peroxidación lipídica
- 4.- Analizar los efectos del selenio sobre el metabolismo y distribución corporal (niveles séricos, hepáticos, musculares y urinarios) de zinc, cobre, manganeso y hierro, involucrados también en la lesión oxidativa.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

1. POBLACIÓN A ESTUDIO

1.1.- Animales.- Se realiza el estudio utilizando ratas macho tipo Sprague-Dawley organizadas en grupos de diez animales para conformar grupos experimentales, que se complementan con un grupo de ratas alimentadas con dieta control *ad libitum*.

Las ratas se alimentaron de forma neutra con pienso estándar y agua hasta alcanzar un peso de inicio en torno a los 300 gramos. Al llegar a dicho peso fueron incluidas y distribuidas de forma aleatoria entre los distintos grupos de estudio.

Se establecieron 8 grupos experimentales según el tipo de dieta que iban a recibir, así como el grupo *ad libitum* (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**)

Grupo 1	Control (Ctrl)
Grupo 2	Hipoproteico (HP)
Grupo 3	Alcohol (OH)
Grupo 4	Alcohol-Hipoproteico (OHHP)
Grupo 5	Control-Selenio (Ctrl-Se)
Grupo 6	Hipoproteico-Selenio (HP-Se)
Grupo 7	Alcohol-Selenio (OH-Se)
Grupo 8	Alcohol-Hipoproteico-Selenio (OHHP-Se)
Grupo 9	<i>ad libitum</i> (Adlib)
Tabla 2: grupos experimentales.	

Los animales se distribuyeron en jaulas de metacrilato de forma individual, cubiertas con rejillas de acero inoxidable; se incluyó en las mismas una base de viruta de madera tratada para establecer un ambiente confortable, que se completó mediante

ciclos circadianos de luz-oscuridad de 12 horas de duración, con una temperatura ambiente estable y constante de $24 \pm 2^\circ\text{C}$.

Se establecieron los 9 grupos previamente referidos, con una composición de 10 ratas cada uno, a excepción del grupo *ad libitum*, compuesto por 6 ejemplares.

Se realizaron ciclos de alimentación de 4 semanas, para proceder posteriormente al sacrificio y la recogida de muestras.

1.2.- Alimentación.- Se alimentó a los animales desde el momento de inclusión en el estudio con dieta líquida preparada según el modelo experimental de Lieber-DeCarli (Dyets Inc., Bethlehem, Pennsylvania).

Los animales se distribuyeron en diferentes grupos según su alimentación:

- Dieta Control, con un contenido del 18% del total en forma de proteínas, con la que se alimentó al grupo Ctrl.

- Dieta Hipoproteica, con un 2% del total en forma de proteínas con la que se alimentó al grupo HP.

Dichas dietas se suplementaron con alcohol etílico al 95%, en una cantidad de 5 g/dl, constituyendo el 36% del aporte calórico de la dieta suplementada; de este modo se establecieron dos nuevos grupos con dieta alcohólica (grupo OH) y dieta alcohólica hipoproteica (grupo OHHP).

Grupos	Prot. (%)	Líp. (%)	CH (%)	Se (mg/l)	OH 36%
1 (Ctrl)	18	35	47	0	No
2 (HP)	2	35	63	0	No
3 (OH)	18	35	47	0	Sí
4 (OHHP)	2	35	63	0	Sí
5 (Ctrl-Se)	18	35	47	2,425	No
6 (HP-Se)	2	35	63	2,425	No
7 (OH-Se)	18	35	47	2,425	Sí
8(OHHPSe)	2	35	63	2,425	Sí
9Ad Libitum	18	35	47	0	No

Tabla 3: Características nutricionales de la dieta de los grupos de estudio. Porcentajes de Kcal.

Asimismo se establecieron 4 grupos homólogos, con dietas similares que se suplementaron disolviendo selenio en forma de selenometionina, con una dosis de 1 mg/Kg de peso (grupos Ctrl-Se, OH-Se, OHHP-Se, HP-Se; Tabla 3).

Se procedió a la alimentación de los animales según un proceso de pair feeding, ajustando la cantidad ingerida cada 24-36 horas al individuo con menor ingesta, permitiendo de este modo que la cantidad calórica de la ingestas fuera similar, haciendo los grupos más homogéneos. En el caso del grupo 9, o grupo *ad libitum*, se alimentó con dieta control a demanda.

Tanto la dieta como la sal de selenio se conservaron a una temperatura de 4°C. La dieta se preparó de forma semanal, siguiendo las indicaciones de la empresa distribuidora de la misma (Dyets Inc. 1993/1994 Catalog). Se preparó mediante la adición de agua ultrapura según el Sistema de deionización Milli-Q OM-140.

Cada litro de las distintas dietas se realizó de la siguiente manera, de forma que todas las dietas proveyeran 1 Kcal/mL, ajustadas con los aportes de alcohol (Lieber *et al.*, 1989):

- *Dieta control:* Se disolvieron 221,78 g de dieta en polvo en agua Milli-Q hasta alcanzar un litro.

- *Dieta hipoproteica*: Se disolvieron 224,77 g de dieta en polvo en agua Milli-Q hasta alcanzar un litro.

- *Dieta alcohólica*: Se disolvieron 138,18 g de dieta en polvo con 67 cc de alcohol ultrapuro al 95% y agua Milli-Q hasta alcanzar un litro.

- *Dieta alcohólica hipoproteica*: Se disolvieron 133,87 g de dieta en polvo, con 67 cc de alcohol ultrapuro al 95%.

Componentes de la dieta (g/L/1000 Kcal)	CT	HP
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 de la dieta líquida Lieber-DeCarli (Dyets Inc.).

Para las dietas de los animales tratados con selenio, se añadió selenometionina a razón de 6 mg por litro, con una correspondencia a 2,4 mg de selenio puro (2,4 ppm de selenio elemento). Dicha cantidad se añadió de forma complementaria a la ya presente en la dieta de Lieber-DeCarli (Tablas 3, página 74; Tabla 4 y Tabla 5), asegurando una ingesta diaria media en nuestros animales de 120-140 μg al día, siendo esta dosis similar a la empleada por

otros investigadores en modelos experimentales con selenio a altas dosis (Sieber *et al.*, 2009 utiliza 100 μg de selenio o Ip, 1986, que utiliza dietas que contienen 2-4 ppm de selenometionina).

Minerales y Oligoelementos	$\mu\text{g}/1 \text{ Kcal}$	Vitaminas	$\mu\text{g}/1 \text{ Kcal}$
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 (μg)	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 (μg)	125
Sulfato	250	Vitamina E	30

Tabla 5: Composición en minerales, oligoelementos y vitaminas (Dyets Inc.).

A pesar de todas estas precauciones hubo diferencias en la ingesta total de nuestros animales ($F=7,47$; $p<0,001$; Tabla 6), habiéndose observado que las ratas alcohólicas hipoproteicas que recibieron una dieta suplementada con selenio presentaron menores ingestas en comparación con las ratas control, que fueron las que consumieron una mayor cantidad.

Grupo	Peso inicial (g)	Peso Final (g)	Ingesta (Kcal/d)
1 (CT)	318,7 ± 15,8	285,6 ± 43,3	54,3 ± 3,1
2 (HP)	317,3 ± 19,2	278,4 ± 32,8	51,4 ± 1,5
3 (OH)	318,0 ± 17,9	272,0 ± 21,0	49,4 ± 3,7
4 (OHHP)	323,3 ± 18,5	232,9 ± 28,0	51,7 ± 4,3
5 (CT-Se)	309,7 ± 24,0	254,6 ± 34,9	49,0 ± 1,1
6 (HP-Se)	301,0 ± 8,4	215,6 ± 18,5	49,7 ± 1,5
7 (OH-Se)	302,0 ± 15,9	210,3 ± 32,4	49,6 ± 3,2
8 (OHHP-Se)	304,0 ± 10,6	227,9 ± 9,5	46,8 ± 1,2
F; p	NS	$F=7,47$; $p<0,001$	$F=5,62$; $p<0,001$
Diferencias entre grupos (SNK)		1-3 vs. 4, 6-8; 5 vs. 7	1 vs. 3, 5-8; 2,4 vs. 8
Efectos principales			
	OH	$F=8,67$; $p=0,005$	$F=6,4$; $p=0,014$
	HP	$F=4,77$; $p=0,034$	NS
	Se	$F=26,9$; $p<0,001$	$F=18,1$; $p<0,001$
	Interacción triple	$F=8,16$; $p=0,006$	$F=10,3$; $p=0,002$
9 (AL)	306,8 ± 12,2	339,6 ± 27,9	90,2 ± 7,9
Diferencias 1-9	NS	$T=2,5$; $p=0,032$	$T=12,3$; $p<0,001$

Tabla 6: Promedio de peso y desviación estándar, por grupos, al inicio y al final del experimento, y de ingesta diaria de dieta. Grupos: CT – control; HP – hipoproteico; OH – alcohólico; OHHP – alcohólico hipoproteico; AL – *ad libitum*; Se – grupo tratado con selenio. Efectos principales: OH – alcohol; HP – dieta hipoproteica; Se – adición de selenio. Otros acrónimos: NS – no significativo; SNK – Student-Newman-Keuls.

Tanto el alcohol como el tratamiento con selenio ejercieron un efecto independiente en la cantidad de ingestas de nuestros animales.

Los animales se manipularon siguiendo las normas del *Comité para el Bienestar del Animal de Experimentación de La Universidad de La Laguna*.

1.3 Sacrificio: Tras un periodo de 4 semanas de alimentación según la dieta correspondiente los animales fueron trasladados a jaulas metabólicas durante las 24 horas previas al sacrificio, obteniéndose de este modo la orina excretada durante ese periodo, para poder realizar un análisis de la misma.

Los animales fueron sacrificados mediante la inyección intraperitoneal de 1.5 mL de solución de Hidrato de Cloral en una concentración de 160 mg/dl (una dosis de 240 mg en cada inyección), siendo el doble de la dosis anestésica y encontrándose dentro del rango de dosis letal.

1.4. Recogida de muestras.- Tras el sacrificio se tomaron muestras de hígado y sangre.

La sangre se recogió mediante punción directa intracardiaca tras la administración del Hidrato de Cloral, mientras el corazón permanecía latiendo. Dicha sangre fue centrifugada durante 5 minutos a 3500 rpm, obteniéndose de este modo suero para la determinación de parámetros bioquímicos y hormonales. Se conservó dicho suero a una Temperatura de -80°C.

El hígado se recogió mediante extracción directa de parénquima hepático tras una laparotomía media; se extrajeron tres porciones. La primera se conservó en un congelador a -80°C distribuida en tubos Eppendorf para análisis enzimático, la otras dos porciones se conservaron en formol al 10%. Se conservaron dichas muestras en nevera a una temperatura de 4°C hasta su procesamiento posterior, una para cuantificación de oligoelementos, y la otra para el estudio histológico.

La orina recogida en la jaula metabólica se conservó en nevera a 4°C hasta su procesamiento posterior.

2. ESTUDIO DE LA SANGRE

2.1.- Determinaciones Serológicas.-

2.1.1.- Determinación de selenio.- El suero obtenido mediante centrifugación se diluyó con una disolución de Triton-X 0,1% (Fluka y Sigma-Aldrich, p.a.) en disoluciones apropiadas según la cantidad de muestra disponible y la concentración de selenio estimada por otros trabajos (Odabasi *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 1999).

Para la calibración del espectrofotómetro de absorción atómica se utilizó una disolución patrón de selenio, así como el material de referencia *Seronorm® Trace Elements Serum L-1* (Sero AS, Billingstad, Norway). Se procedió a la determinación de la concentración de selenio siguiendo la metodología analítica recomendada.

2.1.2.- Otras Determinaciones.-

-*Albúmina*: Determinada mediante técnica colorimétrica con kit de Roche®, que presenta una sensibilidad analítica de 0,2 g/dl.

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

-*Fósforo*: Determinado 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*: Determinada por fotometría con test colorimétrico enzimático por fotometría utilizando el kit de Roche Diagnostics®, con una sensibilidad de 0,03 mg/dl.

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

3. ESTUDIO DEL HÍGADO

3.1.- Estudio Histológico.- Una de las muestras de tejido hepático conservadas en formol al 10% fue introducida en parafina, realizándose posteriormente cortes seriados

de 5 micras con un microtomo Reichert-jung 1130 Biocut. Se tiñeron dichas muestras según dos técnicas, Hematoxilina-Eosina y Tricrómico de Masson.

* **Hematoxilina-Eosina:** Para la realización de la misma se precisa de:

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.....800 mL.

Veinticuatro horas después de haber preparado las soluciones se añaden 2,5 g. de óxido de mercurio rojo; se mantiene la mezcla en ebullición durante 20 minutos y se introduce posteriormente en un matraz aforado que se sumerge en agua fría.

A.2) Eosina

Eosina.....2 g.
Agua destilada.....160 mL.
Alcohol al 95%.....640 mL.
Ácido acético.....10 gotas.

Una vez obtenidas ambas soluciones se realizan los siguientes pasos:

1.- Se desparafina la muestra con dos pases de Xilol de 10 minutos de duración cada uno.

2.- Se hidrata con pases sucesivos de 5 minutos cada uno con alcohol de 90°, alcohol de 96° y alcohol absoluto.

3.- Se lava con agua corriente durante 2 minutos.

- 4.- Se tiñe la muestra con Hematoxilina de Harris durante 3 minutos.
- 5.- Se lava con agua durante 5 minutos.
- 6.- Se tiñe con Eosina durante tres minutos.
- 7.- Se realizan tres pases rápidos con alcohol de 90°, alcohol de 96° y alcohol absoluto sin lavar previamente la muestra.
- 8.- Se aclara con carboxilol.
- 9.- Se hacen dos nuevos pases por xilol.
- 10.- Se realiza el montaje en un kit.

* **Tricrómico de Masson:** Para la realización de la misma se precisa de:

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.

Se mezcla la solución A con la solución 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 fosfotúngstico:

Ácido fosfomolibdico	5 g.
Ácido fosfotúngstico	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.

Una vez obtenidas ambas soluciones se realizan los siguientes pasos:

- 1.- Se hidrata la muestra con agua destilada lavándola durante 5 minutos .
- 2.- Se tiñe con hematoxilina férrica durante 5 minutos.
- 3.- Se lava con agua corriente durante 10 minutos, hasta que el agua salga clara.
- 4.- Se realiza un lavado en Ponceau de xilidina durante 45 minutos.
- 5.- Se realiza un lavado rápido en ácido acético al 1%.
- 6.- Se realiza un lavado rápido en agua destilada.
- 7.- Se realiza la diferenciación en ácido fosfotúngstico-Orange G durante 10 minutos.
- 8.- Se realiza un nuevo lavado rápido en ácido acético al 1%.
- 9.- Se realiza un lavado rápido en agua destilada.
- 10.- Se añade Verde luz al 2% durante 15 minutos.

11.- Se realiza un lavado rápido en ácido acético al 1%.

12.- Se realiza un lavado rápido con agua destilada.

13.- Se deshidrata la muestra y se vuelve a montar en un kit para su observación.

A continuación se procede al estudio histológico mediante microscopio óptico Leica y al análisis posterior semiautomatizado mediante el programa de análisis de imagen Leica Qwin para medición de áreas, determinándose el área nuclear, la superficie hepatocitaria, el área de grasa en las muestras teñidas con Hematoxilina-Eosina y el porcentaje de fibrosis en las muestras teñidas con Tricrómico de Masson, tanto en los espacios pericentrales como en los periportales de cada individuo.

3.2.- Determinaciones enzimáticas.- Se realizó la determinación de la actividad de la glutatión peroxidasa (GPX), de la superóxidodismutasa (SOD) y de productos de la peroxidación lipídica (Malonilaldehído -MDA-) a partir de las muestras de tejido hepático conservadas a -80° C.

Las muestras congeladas se lavaron con solución de cloruro sódico al 0,9% y heparina y/o EDTA; se secaron con papel absorbente y se pesaron; se procesaron para determinar la actividad de:

- Malonildialdehído (MDA): se determina mediante el kit de Calbiochem® (San Diego, California, USA) con una absorbancia a una longitud de onda de 586 nm en el espectrofotómetro ultravioleta.

- Glutatiónperoxidasa (GPX): se utiliza el Kit de Calbiochem® (San Diego, California, USA) para medirla de forma indirecta usando la oxidación de NADPH a NADP con una absorbancia a una longitud de onda de 340 nm.

3.3.- Determinaciones de oligoelementos.- Se estudió el contenido en hígado de selenio, zinc, cobre, manganeso y hierro. Para ello las muestras de hígado conservadas en formol al 10% a 4°C se sometieron al siguiente proceso:

1.- Se procede al pesado de la muestra y posterior desecación en estufa a 100°C hasta constancia en peso durante al menos 24 horas.

2.- Se realiza una nueva tara de la muestra seca situándola en un vaso de teflón PTFE (TFM-HPV100), en una balanza analítica de 0,1 mg de precisión previamente calibrada.

3.- Se realiza la disolución de la muestra mediante un sistema de digestión por microondas: en vaso de teflón PTFE conteniendo la muestra se adicionaron 7 mL de ácido nítrico al 65% (Fluka puriss. p.a. plus) calidad *suprapur*, y se procede a introducir los vasos sellados en un sistema de digestión por microondas (Milestone modelo Ethos Plus y unidad de control terminal 320), sometiendo el conjunto a la ejecución del programa de control tiempo-temperatura específico para hígado recomendado en el manual de aplicaciones de Milestone (Milestone Inc., CT, USA).

4.- Una vez disuelta la muestra se trasvasa el contenido de la disolución a un matraz aforado de 25 mL, enrasando con agua ultrapura obtenida mediante sistema de purificación de agua grado reactivo Milli-Q modelo Gradient A-10 (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA).

Se conservaron dichas muestras a 4°C hasta el análisis ulterior, que se realizó mediante espectrofotometría de absorción atómica.

El análisis químico cuantitativo de los oligoelementos se llevó a cabo con la técnica analítica de espectrofotometría de absorción atómica con atomización por llama aire-acetileno (Varian, SpectrAA 220FS, Mulgrave, Victoria, Australia) y con la espectrofotometría de absorción atómica con atomización electrotermal de cámara de grafito (Varian, SpectrAA 220Z, GTA-110, sistema de introducción de muestras automático, corrector de fondo por *efecto Zeeman* y control automático desde ordenador), según elemento a analizar y la concentración esperada del mismo en la muestra, estimada por otros trabajos (González-Reimers *et al.*, 2002; González-Reimers *et al.*, 1998; Odabasi *et al.*, 2008) o por estimaciones de las propias muestras.

Para la correcta realización de dicha cuantificación fue necesaria la calibración de los espectrofotómetros: se prepararon las disoluciones patrón correspondientes a diferentes concentraciones del elemento químico a estudio mediante disoluciones

estándar certificadas de 1000 ppm. (Fluka y Sigma-Aldrich, disoluciones certificadas para espectrofotometría de absorción atómica).

En la cuantificación mediante cámara de grafito fue necesario el uso de los programas de control tiempo-temperatura y los modificadores de atomización (Sigma-Aldrich y Merck, calidad pro.*analysis*) recomendados en la metodología del manual de aplicaciones (Varian, Mulgrave, Victoria, Australia).

Se procedió a la optimización del método analítico específico adaptado a la naturaleza de la matriz de la muestra y a la concentración de analito en la muestra original. En términos generales zinc, cobre y hierro fueron medidos con la técnica de espectrofotometría de absorción atómica con atomización por llama aire-acetileno mediante el análisis de una dilución de la disolución obtenida, mientras que manganeso y selenio lo fueron en un sistema de atomización electrotermal en cámara de grafito mediante el análisis directo de dicha disolución. Los límites de detección en esta técnica para los oligoelementos estudiados fueron los siguientes:

Elemento	En Cámara de Grafito		En Llama
	Masa característica	Límite de detección	Límite de detección
Zinc	0,15 pg	0,00005 ng/g	0,0008 mg/Kg
Cobre	6 pg	0,001 ng/g	0,0010 mg/Kg
Selenio	14 pg	0,003 ng/g	0,3500 mg/Kg
Manganeso	0,6 pg	0,0002 ng/g	0,0015 mg/Kg
Hierro	1,2 pg	0,005 ng/g	0,0060 mg/Kg

Tabla 7: Límites de detección según técnica y elemento traza.

4. DETERMINACIONES EN ORINA

Se realizó la determinación de calcio, fósforo, magnesio y creatinina, mediante las mismas técnicas y kits utilizados para las muestras de sangre, realizándose detecciones con límites inferiores (con mayor sensibilidad) para el fósforo (5,0 mg/dl) y la creatinina (0,3 mg/dl).

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó el test de *Kolmogorov-Smirnov* para determinar si la distribución de las variables era o no paramétrica.

Para valorar las diferencias existentes entre los grupos experimentales, utilizamos un Análisis de Varianza en aquellas variables que se distribuyeron de forma *normal*. En los casos en que existían diferencias estadísticamente significativas, se realizó *post hoc* el Test de *Student-Newman-Keuls* para determinar los grupos entre los que se establecían diferencias. Para las variables no paramétricas utilizamos el Test de *Kruskall-Wallis*.

Para analizar las relaciones existentes entre variables, utilizamos los test de la *R de Pearson* y la *Rho de Spearman*, según el tipo de distribución de las variables en cuestión.

Se realizó un Análisis de Varianza de dos vías para evaluar la influencia de alcohol, malnutrición proteica y tratamiento con selenio sobre las diversas variables a estudio, valorando asimismo las interacciones de estas variables entre sí.

Finalmente, las variables a estudio fueron comparadas entre el grupo Control y el grupo *Ad Libitum* haciendo uso del test *T de Student* para variables independientes, siempre que la distribución fuera normal, o la *U de Mann-Whitney* en caso de distribución no paramétrica.

Para evaluar los efectos combinados y relativos de alcohol, malnutrición proteica (dieta hipoproteica) y selenio sobre los diversos parámetros analizados y las posibles interacciones entre los tres factores señalados, utilizamos el modelo lineal general univariante (SPSS), es decir, el análisis de varianza de dos vías.

Toda la estadística fue realizada utilizando el SPSS.20.

V. RESULTADOS

1. PARÁMETROS NUTRICIONALES

1.1.- Ingesta y peso.- Los animales incluidos en el análisis final presentaban un peso similar en el momento de la inclusión en el estudio en los 8 grupos. A pesar de una estrategia de *pair feeding* cuidadosa se encontraron diferencias significativas en relación con la ingesta media diaria, siendo las ratas control las que presentaron mayores ingestas en comparación con el resto de grupos.

El aporte de alcohol y el aporte de selenio mostraron un efecto independiente en la cuantía de las ingestas, existiendo una interacción significativa entre los tres parámetros, como puede verse en la tabla 8:

Grupo	Peso inicial (g)	Peso Final (g)	Vari. peso (g)	Ing. (Kcal/d)	Albúm. (g/dl)
1 (CT)	318,7 ± 15,8	285,6 ± 43,3	-32,1 ± 32,4	54,3 ± 3,1	4,02 ± 0,37
2 (HP)	317,3 ± 19,2	278,4 ± 32,8	-44,4 ± 16,5	51,4 ± 1,5	3,26 ± 0,28
3 (OH)	318,0 ± 17,9	272,0 ± 21,0	-46,3 ± 22,9	49,4 ± 3,7	3,74 ± 0,30
4 (OHHP)	323,3 ± 18,5	232,9 ± 28,0	-92,3 ± 24,7	51,7 ± 4,3	3,21 ± 0,23
5 (CT-Se)	309,7 ± 24,0	254,6 ± 34,9	-55,1 ± 26,6	49,0 ± 1,1	4,38 ± 0,30
6 (HP-Se)	301,0 ± 8,4	215,6 ± 18,5	-85,4 ± 19,1	49,7 ± 1,5	3,36 ± 0,22
7 (OH-Se)	302,0 ± 15,9	210,3 ± 32,4	-91,8 ± 38,5	49,6 ± 3,2	3,94 ± 0,43
8 (OHHP-Se)	304,0 ± 10,6	227,9 ± 9,5	-76,1 ± 11,0	46,8 ± 1,2	3,00 ± 0,06
F; p	NS	F=7,47; p<0,001	F=6,23; p<0,001	F=5,62; p<0,001	F=7,76; p<0,001
Diferencias entre grupos (SNK)		1-3 vs. 4, 6-8; 5 vs. 7	1 vs. 4, 6-8; 2 y 3 vs. 4, 6 y 7	1 vs. 3, 5-8; 2,4 vs. 8	1 y 5 vs. 2, 4, 6 y 8; 7 vs. 2, 4 y 8; 3 vs. 8
Efectos principales	OH	F=8,67; p=0,005	F=10,65; p=0,002	F=6,4; p=0,014	F=5,7; p=0,026
	HP	F=4,77; p=0,034	F=7,08; p=0,01	NS	F=46,84; p<0,001
	Se	F=26,9; p<0,001	F=11,59; p=0,001	F=18,1; p<0,001	NS
	Interacción triple	F=8,16; p=0,006	F=8,44; p=0,005	F=10,3; p=0,002	NS
9 (AL)	306,8 ± 12,2	339,6 ± 27,9	+32,8 ± 16,4	90,2 ± 7,9	3,94 ± 0,33
Diferencias 1-9	NS	T=2,5; p=0,032	T=4,1; p=0,002	T=12,3; p<0,001	NS

Tabla 8: Resumen de promedios y desviación estándar, por grupos, de: peso al inicio y al final del tratamiento, variación del mismo a lo largo del experimento; ingesta calórica y albúmina sérica. Acrónimos: Grupos: CT – control; HP – hipoproteico; OH – alcohólico; OHHP – alcohólico hipoproteico; AL – *ad libitum*; Se – grupo tratado con selenio. Otros acrónimos: NS – no significativo; SNK – Test de Student-Newman-Keuls.

Al corregir la ingesta media utilizando la pérdida de peso que experimentaron los animales durante el estudio, se aprecia que no hay diferencias significativas entre los

grupos. Llama la atención que algunos animales del grupo control presentaron una ganancia de peso, produciendo que el cociente ingesta/variación de peso tenga valores positivos en este grupo en comparación con el resto de grupos, que presentan un cociente negativo.

De forma general los sujetos del estudio presentaron una pérdida progresiva de peso a lo largo del tiempo de observación; dichas diferencias de peso entre la inclusión y la finalización del estudio fueron significativas para todos los grupos. Realizando un análisis de T apareada destaca el grupo de ratas OH con dieta HP, tanto con (T=19,55; $p<0,001$ –grupo 8–) como sin adición de selenio (T=9,89; $p<0,001$ –grupo 4–), así como el grupo hipoproteico tratado con selenio (T=12,66; $p<0,001$ -grupo 6-)

De este modo podemos observar que los tres factores estudiados (OH, HP y Se) ejercen un efecto independiente en la pérdida de peso, sin existir interacciones dobles al considerar los factores por parejas. Sí existe interacción entre los tres parámetros al evaluarlos conjuntamente. Se apreciaron diferencias significativas en la variación de peso entre los ocho grupos (Tabla 8 en página 89).

Según lo previsto, los animales alimentados *ad libitum* presentaron una ganancia significativa de peso ($32,8 \pm 16,4$ g), frente a los animales del grupo control (T=4,1; $p=0,002$).

1.2.- Albúmina sérica.- La albúmina fue significativamente superior en el grupo control, independientemente de la administración o no de selenio (grupos 1 y 5). Se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control, que fueron diferentes del resto. Se observó un descenso significativo en aquellos animales alcohólicos alimentados con dieta hipoproteica (grupos 4 y 8), sobre todo en el grupo suplementado con selenio (grupo 8). El grupo 8 (OHHP-Se) mostró niveles de albúmina significativamente inferiores al resto de los grupos (Tabla 8, página 89).

Mediante el análisis de varianza de dos vías se comprobó nuevamente que tanto el alcohol como la dieta hipoproteica producían un descenso en los niveles de albúmina de forma significativa. No se hallaron interacciones significativas ni entre ambos factores ni con el selenio.

No hallamos diferencias significativas entre los niveles de albúmina del grupo control respecto al grupo *ad libitum* ($T=0,33$; $p=0,75$).

2. ARQUITECTURA HEPÁTICA

2.1.- Superficie hepatocitaria.- Al analizar la *superficie hepatocitaria total* se observó que las ratas alimentadas con dieta alcohólica hipoproteica (grupos 4 y 8) presentaban un área hepatocitaria mayor que el resto de los grupos (Tabla 9, Figura 9).

Grupo	Superficie hepatocitaria total (μm^2)	Superficie Hepatocitaria Periportal (μm^2)	Superficie Hepatocitaria Pericentral (μm^2)
1 (CT)	174,51 \pm 37,29	166,99 \pm 39,51	182,08 \pm 37,67
2 (HP)	171,45 \pm 30,47	179,67 \pm 30,92	161,39 \pm 30,00
3 (OH)	171,99 \pm 30,27	168,59 \pm 40,94	175,39 \pm 23,46
4 (OHHP)	233,36 \pm 120,95	170,79 \pm 50,82	184,15 \pm 42,01
5 (CT-Se)	150,46 \pm 22,69	145,44 \pm 33,57	155,48 \pm 23,57
6 (HP-Se)	156,64 \pm 21,41	153,23 \pm 21,18	160,01 \pm 24,38
7 (OH-Se)	121,61 \pm 32,72	113,52 \pm 39,21	129,69 \pm 26,67
8 (OHHP-Se)	157,83 \pm 20,35	152,45 \pm 23,32	163,22 \pm 25,03
F; p	F=3,316; p=0,005	F= 2,704; p=0,018	F= 2,735; p=0,016
Diferencias entre grupos (SNK)	1-3 y 5-8 vs. 4	1-4 vs. 7	1, 3 y 4 vs. 7
Efectos principales			
HP	F=5,27; p=0,026	NS	NS
Se	F=12,68; p=0,001	F=10,47; p=0,002	F=7,56; p=0,008
Interacción doble OH-HP	F=4,41; p=0,04	NS	NS
Interacción doble OH-Se	F=4,45; p=0,039	NS	NS

Tabla 9: Valores promedio y desviación estándar por grupos de la superficie hepática (μm^2) total, periportal y pericentral. Acrónimos: Grupos: CT control; HP hipoproteico; OH alcohólico; OHHP alcohólico hipoproteico; -Se grupo tratado con selenio. Efectos principales: OH alcohol; HP dieta hipoproteica; Se adición de selenio. Otros acrónimos: NS no significativo; SNK Test de Student-Newman-Keuls.

La adición de selenio provocó en todos los grupos suplementados un descenso de la superficie hepatocitaria total; de este modo, de los parámetros analizados, el selenio es el que ejerce un efecto más potente de forma independiente ($F=12,68$; $p<0,001$, Figura 9), se

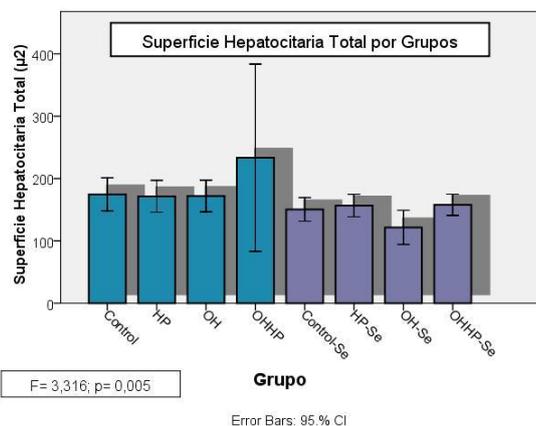


Figura 9: Superficie hepatocitaria total por grupos. Acrónimos: Grupos: CT control; HP hipoproteico; OH alcohólico; OHHP alcohólico hipoproteico; -Se grupo tratado con selenio.

aprecia también un efecto de la dieta hipoproteica ($F=5,27$; $p=0,026$). Existe una interacción positiva entre el alcohol y la dieta hipoproteica, así como entre el alcohol y el selenio.

En el caso de la *superficie hepatocitaria pericentral*, el selenio tiene un efecto independiente en dicho parámetro ($F=7,56$; $p=0,008$); al analizar la *superficie hepatocitaria periportal*, también apreciamos un efecto notorio ($F=10,47$; $p=0,002$). De este modo el selenio sérico es el único factor con efecto significativo estadísticamente, tanto sobre la superficie hepatocitaria pericentral como sobre la periportal, inhibiendo el balonamiento hepatocitario (Figura 9, página 91 y Figura 10).

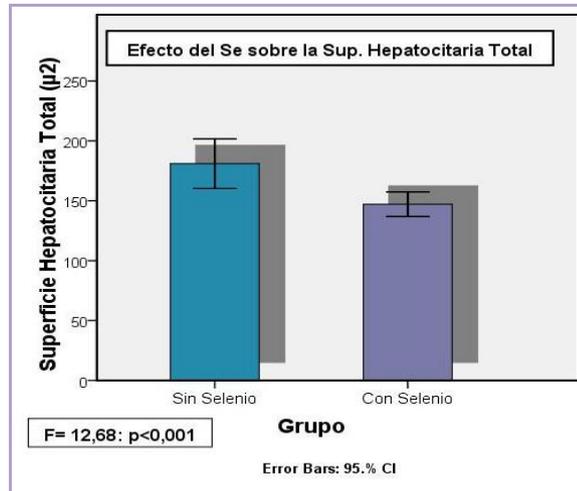


Figura 10: Efecto del selenio sobre la superficie hepatocitaria total (μm^2).

Al intentar relacionar la actividad antioxidante con la superficie hepatocitaria encontramos una correlación significativa entre los niveles de selenio hepáticos y la superficie hepatocitaria periportal ($\rho=-0,26$, $p=0,040$) y pericentral ($\rho=-0,27$; $p=0,034$); en el caso de la superficie hepatocitaria total, en nuestra muestra se bordeaba la significación estadística mostrando una tendencia.

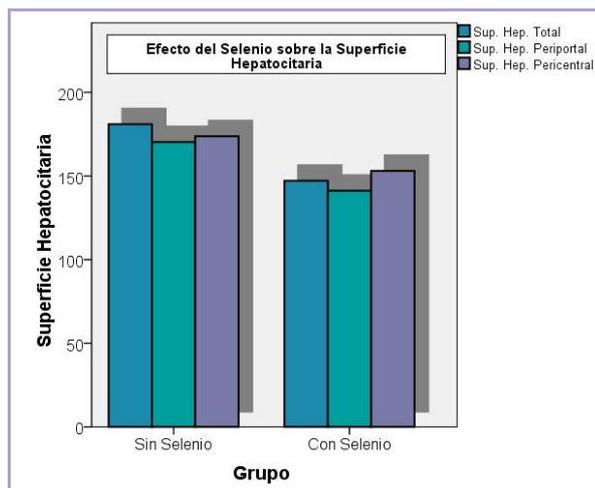


Figura 11: Efecto del selenio sobre la superficie hepatocitaria total, periportal y pericentral (μm^2).

Los niveles de actividad de la GPX hepática mostraron una

relación inversa con la superficie hepatocitaria total ($\rho=-0,28$; $p=0,038$), y bordearon la significación estadística con la superficie hepatocitaria periportal ($\rho=-0,025$; $p=0,059$)

Encontramos una relación significativa entre los niveles de selenio sérico y los niveles de actividad de la GPX hepática ($\rho=0,34$; $p=0,01$), así como una relación inversa con los niveles hepáticos de MDA ($\rho=-0,16$; $p=0,091$), bordeando la significación estadística.

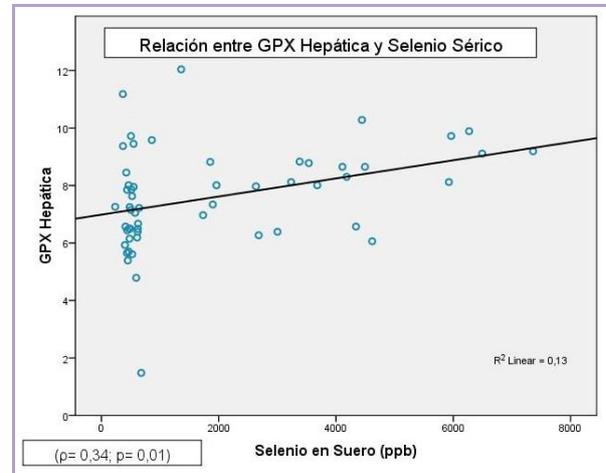


Figura 12: Relación entre actividad de GPX (mU/mg) y selenio sérico (ρ de Spearman).

2.2.- Superficie nuclear.- No encontramos diferencias significativas entre los diferentes grupos de estudio (Tabla 10).

Grupo	Superficie Nuclear total (μm^2)	Superficie Nuclear Periportal (μm^2)	Superficie Nuclear Pericentral (μm^2)
1 (CT)	16,87 \pm 2,41	16,00 \pm 2,24	17,74 \pm 2,75
2 (HP)	15,20 \pm 1,89	14,96 \pm 2,17	15,45 \pm 1,79
3 (OH)	16,45 \pm 2,13	16,08 \pm 1,92	16,81 \pm 2,65
4 (OHHP)	14,19 \pm 1,20	12,66 \pm 1,13	15,72 \pm 1,43
5 (CT-Se)	15,47 \pm 2,29	14,97 \pm 2,26	15,98 \pm 2,46
6 (HP-Se)	15,68 \pm 0,99	15,52 \pm 1,23	15,83 \pm 1,02
7 (OH-Se)	16,37 \pm 2,68	15,41 \pm 3,09	17,09 \pm 2,34
8 (OHHP-Se)	16,49 \pm 1,96	16,10 \pm 1,92	16,89 \pm 2,40
F; p	NS	NS	NS

Tabla 10: Valores promedio y desviación estándar por grupos de la superficie nuclear (μm^2) total, periportal y pericentral. Acrónimos: Grupos: CT control; HP hipoproteico; OH alcohólico; OHHP alcohólico hipoproteico; -Se grupo tratado con selenio. Otros acrónimos: NS no significativo.

2.3.- Grasa hepática.- En general se observó que los grupos suplementados con selenio presentaron una cantidad de grasa marcadamente inferior que aquellos sin suplementación, siendo este efecto especialmente notable al analizar la grasa periportal (KW 18,02; $p=0,012$; Figura 13, pág. 94) y la grasa total (KW 15,30; $p=0,032$; Figura

14, pág 94) . No encontramos diferencias significativas en el caso de la grasa pericentral (Tabla 11 y Tabla 12, pág. 95).

Al realizar un análisis univariante, se observó que el único factor que guarda relación significativa independiente con la grasa hepática total es el selenio (F=5,60; p=0,022), siendo este efecto más marcado si analizamos la grasa periportal (F=10,63; p=0,002). No existe efecto independiente del selenio al analizar la grasa pericentral.

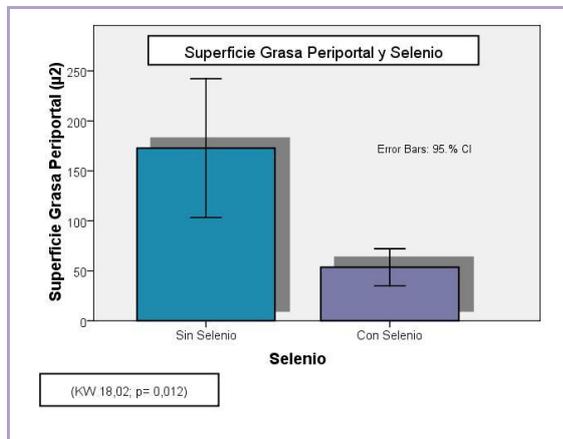


Figura 13: Efecto del selenio sobre la superficie grasa periportal.

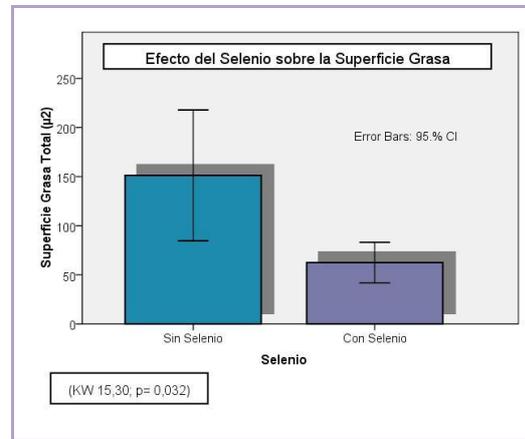


Figura 14: Efecto del selenio sobre la superficie grasa total.

Grupo	Superficie Grasa Total (μm^2)			Superficie Grasa Periportal (μm^2)		
	X \pm SD	Md	(p25 - p75)	X \pm SD	Md	(p25 - p75)
1 (CT)	79,09 \pm 74,14	52,07	(33,08 - 125,16)	94,60 \pm 106,54	51,78	(31,04 - 134,69)
2 (HP)	120,40 \pm 53,61	119,66	(74,2 - 173,66)	161,65 \pm 79,04	143,13	(94,85 - 251,63)
3 (OH)	188,75 \pm 158,56	126,65	(105,21 - 255,35)	202,00 \pm 211,39	123,76	(91,52 - 305,79)
4 (OHHP)	139,85 \pm 179,76	74,12	(30,71 - 281,85)	201,98 \pm 266,33	117,47	(36,36 - 409,86)
5 (CT-Se)	79,20 \pm 69,57	31,47	(7,72 - 149,19)	54,11 \pm 57,04	28,90	(10,63 - 99,54)
6 (HP-Se)	58,98 \pm 52,66	40,76	(15,01 - 99,79)	65,48 \pm 63,96	37,27	(19,43 - 109,54)
7 (OH-Se)	51,42 \pm 51,96	26,08	(19,83 - 91,88)	44,38 \pm 47,91	26,69	(19,00 - 56,14)
8 (OHHP-Se)	63,42 \pm 44,75	52,84	(38,01 - 67,53)	45,41 \pm 39,91	35,28	(19,80 - 55,07)
K-W; p	K-W 15,30; p= 0,032			K-W 18,02; P= 0,012		
SNK	NS			NS		
Ef. Princip.	Se: F=5,60; p=0,022			Se: F=10,63; p=0,002		

Tabla 11: Valores promedio y desviación estándar (SD); mediana (Md) y rango intercuartílico (p25-p75), por grupos, de Superficie Grasa Total y Periportal. Acrónimos: Grupos: CT – control; HP – hipoproteico; OH – alcohólico; OHHP – alcohólico hipoproteico; -Se – grupo tratado con selenio. Otros acrónimos: NS – no significativo; K-W – Test de Kruskal-Wallis; SNK – Test de Student-Newman-Keuls.

Grupo	Superficie Grasa Pericentral (μm^2)		
	X \pm SD	Md	(p25 - p75)
1 (CT)	63,57 \pm 49,38	49,8	(31,42 - 88,32)
2 (HP)	79,15 \pm 38,53	78,51	(45,84 - 109,14)
3 (OH)	175,50 \pm 115,43	140,19	(98,42 - 241,28)
4 (OHHP)	77,72 \pm 69,57	30,78	(25,06 - 153,85)
5 (CT-Se)	84,30 \pm 109,89	35,19	(5,62 - 157,10)
6 (HP-Se)	52,46 \pm 45,81	47,13	(9,10 - 101,40)
7 (OH-Se)	58,47 \pm 60,06	27,46	(20,65 - 126,02)
8 (OHHP-Se)	81,44 \pm 59,93	63,93	(40,85 - 108,69)
K-W; p		NS	
SNK		NS	
Efectos principales		NS	

Tabla 12: Valores promedio y desviación estándar (SD); mediana (Md) y rango intercuartílico (p25-p75), por grupos, de Superficie Grasa Pericentral.

Al analizar nuestros resultados relacionando la grasa y los efectos antioxidantes, se observó una relación inversa entre la grasa periportal y la actividad de la GPX hepática, siendo ésta estadísticamente significativa ($\rho=-0,33$; $p=0,011$; Figura 15); se apreció una relación rozando la significación estadística al relacionar la actividad de la GPX hepática con la grasa total ($\rho=-0,25$; $p=0,062$)

No encontramos relación entre la grasa y la cantidad de selenio hepático, pero sí una relación inversa entre la cantidad de selenio en suero en el caso de la grasa periportal ($\rho=-0,33$; $p=0,014$) y la grasa total ($\rho=-0,27$; $p=0,046$).

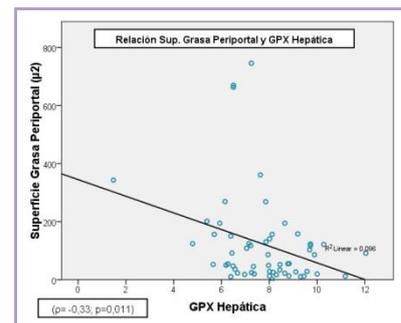


Figura 15: Relación entre la superficie de grasa periportal (μm^2) y la actividad de GPX hepática (mU/mg)

2.4.- Fibrosis Hepática.- Al analizar globalmente la cantidad de fibrosis en nuestras ratas, observamos que había diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos de estudio ($F=2,6$; $p=0,021$). Al analizar entre qué grupos se establecían las diferencias, apreciamos que el grupo hipoproteico con selenio presentaba unos niveles ligeramente más elevados que el resto, y sólo significativamente más elevados que los del grupo alcohólico hipoproteico suplementados con selenio (Tabla 13, pág. 96).

En el análisis de varianza de dos vías encontramos que la dieta alcohólica guardaba una relación directa con la cantidad de fibrosis ($F=7,18$; $p=0,01$), siendo las ratas alimentadas con la dieta alcohólica las que presentan mayor cantidad de fibrosis. Encontramos una interacción triple entre el selenio, el alcohol y la dieta hipoproteica de tal manera que, si bien el alcohol y el selenio tienden a sumar efectos incrementando la cantidad de fibrosis, la adición de los tres tiene un efecto opuesto ($F= 6,74$; $p= 0,012$; Tabla 13).

La cantidad de fibrosis guarda relación con la superficie nuclear, siendo estadísticamente significativo en relación con la superficie nuclear pericentral ($R=0,28$; $p=0,03$) y aproximándose a la significación estadística cuando el parámetro considerado es la superficie nuclear total ($R=0,23$; $p=0,07$)

Grupo	Fibrosis (μm^2)
1 (CT)	7,81 \pm 3,42
2 (HP)	5,61 \pm 1,96
3 (OH)	5,48 \pm 2,66
4 (OHHP)	6,34 \pm 1,86
5 (CT-Se)	6,91 \pm 1,62
6 (HP-Se)	8,27 \pm 1,96
7 (OH-Se)	6,08 \pm 0,96
8 (OHHP-Se)	4,53 \pm 1,88
F; p	F=2,63; p=0,021
SNK	6 vs. 8
Efectos principales	OH: F=7,18; p=0,01
	Interacción triple OH-HP-Se: F=6,74; p=0,012

Tabla 13: Valores promedio y desviación estándar, por grupos del área de fibrosis (μm^2). Acrónimos: CT – control; HP – hipoproteico; OH – alcohólico; OHHP – alcohólico hipoproteico; -Se – grupo tratado con selenio. Otros acrónimos: SNK – Test de Student-Newman-Keuls.

3. ANTIOXIDANTES.- Encontramos diferencias muy significativas al analizar nuestros grupos de estudio en cuanto a la actividad de la GPX hepática ($F=3,61$; $p=0,003$); dichas diferencias eran más marcadas entre los grupos control-selenio (que presentaba niveles más elevados) frente a la dieta hipoproteica pura. Todos los grupos tratados con la adición de selenio presentaban unos niveles de actividad de GPX hepática más elevados que aquellos sin tratar.

En el análisis de varianza de dos vías, el selenio es el único factor que justifica las diferencias de forma independiente ($F=18,11$; $p<0,001$), encontrándose una relación directa entre los niveles de selenio hepático y la actividad de GPX hepática ($\rho=0,29$; $p=0,026$) y entre los niveles de selenio sérico y la actividad de la GPX hepática ($\rho=0,36$; $p=0,007$).

En el caso de la MDA, no encontramos diferencias significativas entre los grupos.

4. OLIGOELEMENTOS.-

4.1.- Oligoelementos en hígado.- Encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos de estudio al analizar el zinc hepático ($KW=16,47$; $p=0,021$; Tabla 14; pág. 98); el grupo que presentó los niveles más altos de zinc hepático fue el grupo Control-Se, y los más bajos se encontraron en grupo alcohólico hipoproteico con aporte de selenio. También se encontraron niveles reducidos de zinc hepático en el grupo alcohólico hipoproteico (Figura 16).

En el caso del cobre, encontramos diferencias estadísticamente significativas ($KW=23,48$; $p=0,001$; Tabla 14); en general los grupos con adición de selenio presentaban niveles de cobre hepático menores que aquellos en los que no se produjo el aporte ($Z=-4,03$; $p<0,001$), siendo los del grupo alcohólico con selenio los que presentaron niveles más elevados (Figura 17).

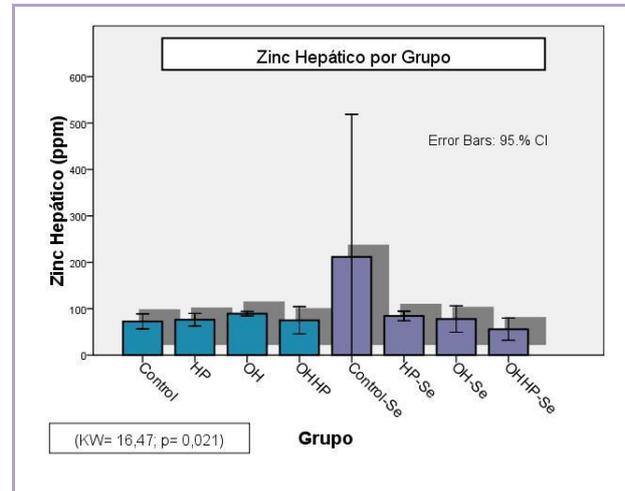


Figura 16: Zinc hepático en peso seco (ppm).

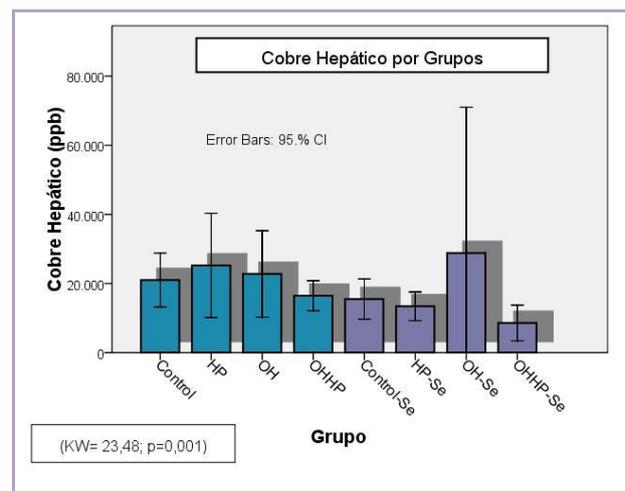


Figura 17: Cobre hepático en peso seco (ppb).

Grupo	Zn hepático (ppm)			Cu hepático (ppm)		
	$\bar{X} \pm SD$	Md	(p25 - p75)	$\bar{X} \pm SD$	Md	(p25 - p75)
1 (CT)	72,64 ± 22,67	80,94	(55,67 - 87,54)	21,00 ± 10,90	17,05	(16,05 - 20,99)
2 (HP)	76,33 ± 16,23	73,37	(69,63 - 81,63)	25,21 ± 18,06	18,42	(15,09 - 31,47)
3 (OH)	89,29 ± 5,88	88,92	(84,40 - 94,07)	22,76 ± 14,96	18,29	(15,14 - 20,67)
4 (OHHP)	75,03 ± 31,84	64,10	(52,35 - 86,04)	16,45 ± 4,68	14,56	(13,53 - 19,56)
5 (CT-Se)	211,77 ± 367,35	97,6	(61,48 - 105,71)	15,49 ± 6,94	17,96	(7,93 - 21,21)
6 (HP-Se)	84,41 ± 13,41	80,85	(74,21 - 96,53)	13,38 ± 5,41	14,10	(11,02 - 17,04)
7 (OH-Se)	77,88 ± 30,73	92,85	(72,75 - 96,55)	28,80 ± 50,45	12,54	(14,31 - 10,19)
8 (OHHP-Se)	55,79 ± 28,65	67,68	(23,75 - 73,88)	8,59 ± 5,58	10,41	(1,24 - 13,05)
K-W; p	K-W=16,47; p=0,021			K-W=23,48; p=0,001		
SNK	NS			NS		
Efec. principales:	NS			NS		

Tabla 14: Valores promedio y desviación estándar (SD); mediana (Md) y rango intercuartílico (p25-p75) de concentración en peso seco de zinc y cobre hepáticos, por grupos. Efectos principales analizados mediante análisis de varianza de dos vías. Acrónimos: Grupos: CT – control; HP – hipoproteico; OH – alcohólico; OHHP – alcohólico hipoproteico; -Se – grupo tratado con selenio. Otros acrónimos: NS – no significativo; K-W – Test de Kruskal-Wallis; SNK – Test de Student-Newman-Keuls.

No se encontraron diferencias significativas entre los ocho grupos de estudio en los niveles de hierro.

Al analizar el manganeso se apreciaron diferencias claramente significativas entre los ocho grupos (Kw=25,32; p=0,001). Se apreciaron efectos independientes de la malnutrición proteica (F= 6,00; p=0,017), siendo los grupos hipoproteico e hipoproteico con selenio los que presentaron niveles menores, al igual que el grupo alcohólico hipoproteico con adición de selenio (Tabla 15).

Grupo	Fe hepático (ppm)			Mn hepático (ppm)		
	$\bar{X} \pm SD$	Md	(p25 - p75)	$\bar{X} \pm SD$	Md	(p25 - p75)
1 (CT)	635,51 ± 312,55	583,91	(419,23 - 805,40)	12,55 ± 10,95	9,37	(6,43 - 12,95)
2 (HP)	802,14 ± 119,11	771,33	(740,14 - 857,85)	5,23 ± 1,02	4,91	(4,28 - 6,32)
3 (OH)	606,72 ± 120,34	620,10	(492,06 - 677,92)	11,73 ± 4,70	10,50	(8,45 - 13,14)
4 (OHHP)	880,10 ± 326,20	782,42	(643,06 - 1283,17)	10,40 ± 1,74	11,03	(8,82 - 11,45)
5 (CT-Se)	1006,58 ± 1750,98	336,71	(230,86 - 710,57)	7,82 ± 3,26	8,19	(4,62 - 10,26)
6 (HP-Se)	680,40 ± 204,49	698,49	(639,67 - 807,77)	6,73 ± 1,52	6,89	(5,38 - 7,75)
7 (OH-Se)	756,47 ± 336,90	738,53	(550,28 - 1046,50)	10,18 ± 4,57	10,71	(7,77 - 12,21)
8 (OHHP-Se)	625,31 ± 353,75	717,26	(229,42 - 895,70)	6,36 ± 4,08	7,84	(0,59 - 8,92)
K-W; p	NS			K-W=25,32; p=0,001		
SNK	NS			NS		
Ef. princip.:	NS			HP: F=6,00;p=0,017		

Tabla 15: Valores promedio desviación estándar (SD); mediana (Md) y rango intercuartílico (p25-p75) de concentración en peso seco de hierro y manganeso hepáticos, por grupos. Efectos principales analizados mediante análisis de varianza de dos vías. Acrónimos: Grupos: CT – control; HP – hipoproteico; OH – alcohólico; OHHP – alcohólico hipoproteico; -Se – grupo tratado con selenio. Otros acrónimos: NS – no significativo; K-W – Test de Kruskal-Wallis; SNK – Test de Student-Newman-Keuls.

Grupo	$\bar{X} \pm SD$	Se hepático (ppm)	
		Md	(p25 - p75)
1 (CT)	1,46 ± 2,45	0,43	(0,30 - 1,43)
2 (HP)	1,14 ± 1,58	0,61	(0,41 - 0,91)
3 (OH)	1,38 ± 2,01	0,54	(0,47 - 1,31)
4 (OHHP)	3,76 ± 4,70	1,59	(0,78 - 5,39)
5 (CT-Se)	20,43 ± 27,11	7,90	(4,81 - 34,49)
6 (HP-Se)	14,41 ± 15,67	9,38	(5,32 - 15,95)
7 (OH-Se)	13,32 ± 12,94	7,63	(4,06 - 28,17)
8 (OHHP-Se)	7,32 ± 3,04	7,76	(3,41 - 9,26)
K-W; p		K-W=38,92; p<0,001	
SNK		NS	
Efectos principales:		Se: F=16,99; p<0,001	

Tabla 16: Valores promedio y desviación estándar (SD); mediana (Md) y rango intercuartílico (p25-p75) de concentración en peso seco de selenio hepático, por grupos. Efectos principales analizados mediante análisis de varianza de dos vías. Acrónimos: Grupos: CT – control; HP – hipoproteico; OH – alcohólico; OHHP – alcohólico hipoproteico; -Se – grupo tratado con selenio. Otros acrónimos: NS – no significativo; K-W – Test de Kruskal-Wallis; SNK – Test de Student-Newman-Keuls.

En el caso del selenio hepático se encontraron diferencias significativas entre grupos (KW=38,92; p<0,001); como era de esperar, los animales suplementados con

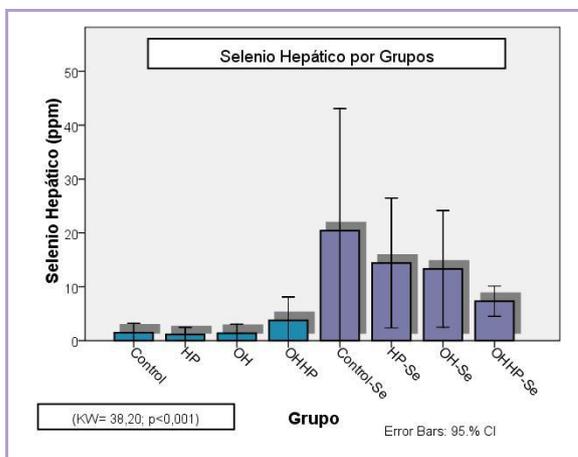


Figura 18: Concentración (ppb) de selenio hepático.

selenio presentaban los niveles mayores de selenio hepático, hecho que se comprueba mediante el análisis de varianza de dos vías, que demuestra que el único factor con efecto independiente es la adición de selenio (F=16,99; p<0,001;Tabla 16)

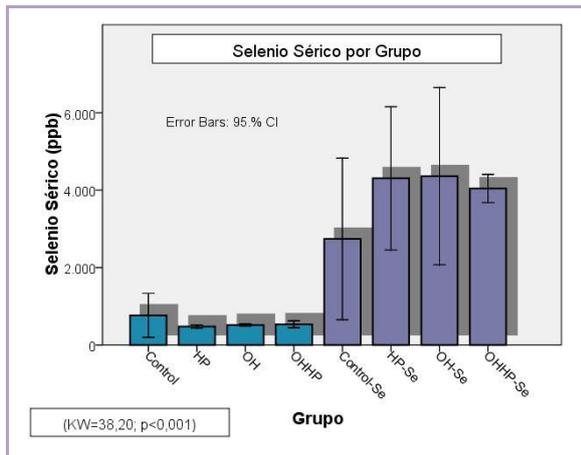


Figura 19: Concentración (ppb) de selenio sérico.

4.2.- Selenio en suero.-

Encontramos diferencias significativas entre grupos (KW=38,92; p<0,001). Son las ratas alimentadas con selenio las que presentan niveles séricos más elevados (Figura 19). Esto se confirma mediante el análisis de varianza de dos vías (F=92,40; p<0,001; (Tabla 17). No se encontraron otros factores ni interacciones en los mismos que influyeran de forma significativa.

Grupo	Se sérico (ppm)		
	$\bar{X} \pm SD$	Md	(p25 - p75)
1 (CT)	764,42 ± 740,97	497,24	(412,66 - 769,33)
2 (HP)	477,00 ± 53,52	458,02	(439,02 - 503,30)
3 (OH)	515,79 ± 37,32	504,04	(491,68 - 550,00)
4 (OHHP)	533,56 ± 106,51	567,24	(425,96 - 622,77)
5 (CT-Se)	2740,43 ± 2254,96	1962,08	(1359,72 - 3234,08)
6 (HP-Se)	4305,58 ± 1762,55	4555,24	(2440,00 - 6039,97)
7 (OH-Se)	4360,84 ± 2473,72	4492,28	(1733,60 - 6492,25)
8 (OHHP-Se)	4041,63 ± 437,61	4250,00	(3572,21 - 4416,95)
K-W; p	K-W=38,20; p<0,001		
SNK	NS		
Efectos principales:	Se: F=92,41; p<0,001		

Tabla 17: Valores promedio y desviación estándar (SD); mediana (Md) y rango intercuartílico (p25-p75) de concentración de selenio sérico, por grupos. Efectos principales analizados mediante análisis de varianza de dos vías. Acrónimos: Grupos: CT – control; HP – hipoproteico; OH – alcohólico; OHHP – alcohólico hipoproteico; -Se – grupo tratado con selenio. Otros acrónimos: NS – no significativo; K-W – Test de Kruskal-Wallis; SNK – Test de Student-Newman-Keuls.

4.3.- Oligoelementos en músculo.- No encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos de estudio al analizar el zinc muscular (Tabla 18).

Se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos al analizar el cobre muscular (KW=16,10; p=0,24; Figura 20), siendo el alcohol el único factor que ejerce efecto independiente (F=4,91; p=0,032; Tabla 18).

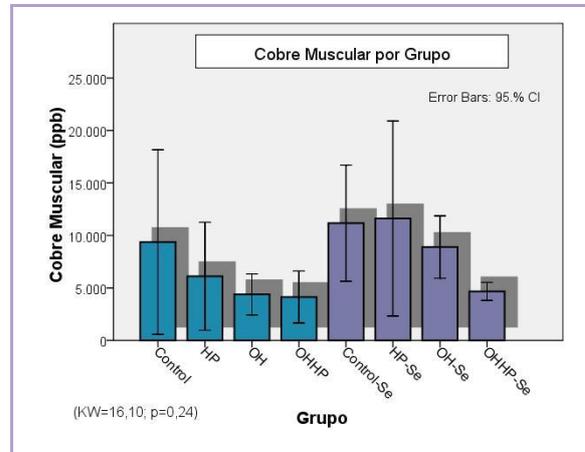


Figura 20: Concentración de cobre muscular (ppb).

Grupo	Zn muscular (ppm)	$\bar{X} \pm SD$	Cu muscular (ppm)	
	$\bar{X} \pm SD$		Md	(p25 - p75)
1 (CT)	79,92 ± 32,38	9,37 ± 9,51	5,42	(3,68 - 10,91)
2 (HP)	87,04 ± 90,35	6,11 ± 5,56	4,46	(2,58 - 6,82)
3 (OH)	46,36 ± 16,10	4,39 ± 2,33	3,83	(3,44 - 4,23)
4 (OHHP)	81,32 ± 7,44	4,14 ± 0,99	4,11	(3,16 - 5,14)
5 (CT-Se)	70,06 ± 27,04	11,17 ± 5,99	14,22	(4,56 - 16,27)
6 (HP-Se)	66,08 ± 29,48	11,61 ± 11,10	5,68	(4,61 - 20,09)
7 (OH-Se)	83,86 ± 37,38	8,90 ± 3,55	8,28	(5,34 - 12,81)
8 (OHHP-Se)	46,22 ± 12,82	4,67 ± 0,93	4,62	(4,00 - 5,57)
K-W; p	NS		K-W=16,10; p=0,24	
SNK	NS		NS	
Efectos principales:	NS		OH: F=4,91; p=0,032	

Tabla 18: Valores promedio y desviación estándar (SD) de zinc (distribución normal); y promedio, desviación estándar (SD), mediana (Md) y rango intercuartílico (p25-p75) de concentración en peso seco de cobre muscular, por grupos. Efectos principales analizados mediante análisis de varianza de dos vías. Acrónimos: Grupos: CT – control; HP – hipoproteico; OH – alcohólico; OHHP – alcohólico hipoproteico; -Se – grupo tratado con selenio. Otros acrónimos: NS – no significativo; K-W – Test de Kruskal-Wallis; SNK – Test de Student-Newman-Keuls.

No encontramos diferencias significativas entre los grupos al analizar los niveles de hierro muscular; en el caso del manganeso encontramos diferencias significativas entre los grupos (KW= 16,05; p=0,025), pero no hubo diferencias en el análisis de varianza. No encontramos que ningún factor ejerza efecto independiente sobre este parámetro ni encontramos interacciones entre ellos (Tabla 19).

Grupo	Fe muscular (ppm)			Mn muscular (ppm)		
	$\bar{X} \pm SD$	Md	(p25 - p75)	$\bar{X} \pm SD$	Md	(p25 - p75)
1 (CT)	309,15 ± 545,42	105,09	(75,96 - 178,27)	3,68 ± 6,15	9,53	(7,76 - 4,17)
2 (HP)	116,44 ± 62,43	99,51	(77,79 - 138,36)	1,58 ± 2,61	0,78	(0,18 - 0,96)
3 (OH)	93,24 ± 14,67	93,81	(85,13 - 106,90)	0,51 ± 0,32	0,49	(0,22 - 0,68)
4 (OHHP)	138,30 ± 25,90	133,01	(115,46 - 166,44)	0,66 ± 0,15	0,58	(0,56 - 0,83)
5 (CT-Se)	147,85 ± 70,20	132,22	(68,91 - 235,69)	0,69 ± 0,52	0,47	(0,27 - 1,19)
6 (HP-Se)	145,21 ± 119,00	113,04	(82,81 - 135,51)	0,80 ± 0,64	0,63	(0,25 - 1,17)
7 (OH-Se)	137,26 ± 43,04	128,23	(106,24 - 148,61)	0,88 ± 0,45	0,75	(0,49 - 1,34)
8 (OHHP-Se)	103,79 ± 25,06	96,88	(114,50 - 94,77)	0,28 ± 0,06	0,31	(0,20 - 0,33)
K-W; p	NS			K-W= 16,05; p=0,025		
SNK	NS			NS		
Efectos principales:	NS			NS		

Tabla 19: Valores promedio y desviación estándar (SD); mediana (Md) y rango intercuartílico (p25-p75) de concentración en peso seco de hierro y manganeso musculares, por grupos. Efectos principales analizados mediante análisis de varianza de dos vías. Acrónimos: Grupos: CT – control; HP – hipoproteico; OH – alcohólico; OHHP – alcohólico hipoproteico; -Se – grupo tratado con selenio. Otros acrónimos: NS – no significativo; K-W – Test de Kruskal-Wallis; SNK – Test de Student-Newman-Keuls.

Al analizar el selenio muscular encontramos diferencias significativas entre los grupos (KW= 37,92; p<0,001; Figura 21); estas diferencias obedecen sobre todo, a los grupos tratados con adición de selenio (Figura 22, página 101), como se demuestra también en el análisis univariante, en el que el único factor que ejerce un efecto independiente es el aporte de selenio (F=20,84; p<0,001; Tabla 20, pág. 103).

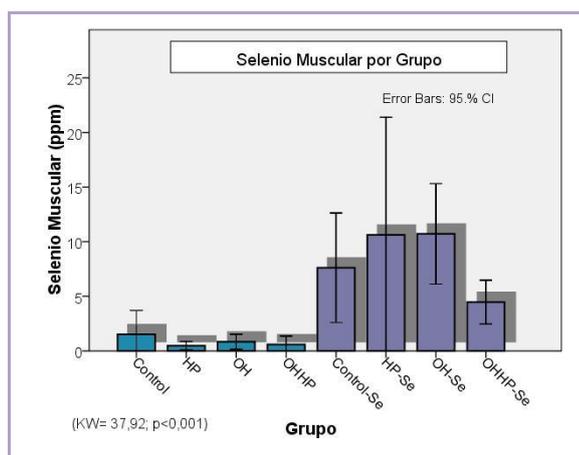


Figura 21: Concentración (ppb) de selenio muscular.

Grupo	Se muscular (ppm)		
	$\bar{X} \pm SD$	Md	(p25 - p75)
1 (CT)	1,52 ± 2,36	0,38	(0,32 - 1,82)
2 (HP)	0,48 ± 0,42	0,28	(0,22 - 0,77)
3 (OH)	0,85 ± 0,82	0,64	(0,36 - 0,87)
4 (OHHP)	0,59 ± 0,31	0,63	(0,26 - 0,88)
5 (CT-Se)	7,61 ± 5,42	4,77	(3,16 - 13,83)
6 (HP-Se)	10,62 ± 12,88	5,97	(2,94 - 12,14)
7 (OH-Se)	10,71 ± 5,50	9,40	(5,83 - 16,33)
8 (OHHP-Se)	4,47 ± 2,17	3,66	(2,51 - 6,31)
K-W; p	K-W= 37,92; p<0,001		
SNK	NS		
Efectos principales:	Se: F=11,9; p=0,001		

Tabla 20: Valores promedio y desviación estándar (SD); mediana (Md) y rango intercuartílico (p25-p75) de concentración en peso seco de selenio muscular, por grupos. Efectos principales analizados mediante análisis de varianza de dos vías. Acrónimos: Grupos: CT – control; HP – hipoproteico; OH – alcohólico; OHHP – alcohólico hipoproteico; -Se – grupo tratado con selenio. Otros acrónimos: NS – no significativo; K-W – Test de Kruskal-Wallis; SNK – Test de Student-Newman-Keuls.

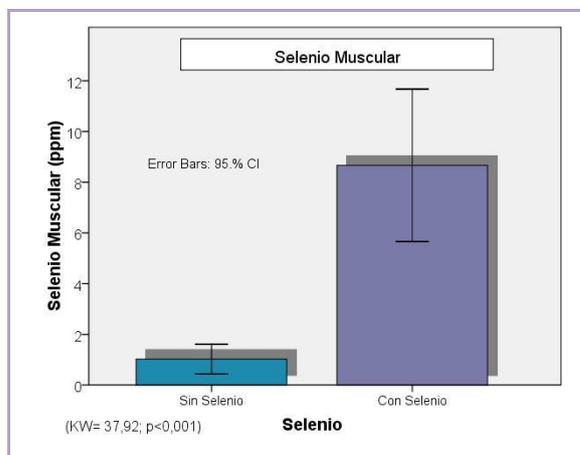


Figura 22: Concentración (ppb) de selenio muscular en animales tratados con selenio frente a los no tratados.

4.4.- Excreción urinaria de Oligoelementos.-

Hay diferencias significativas entre los grupos en la excreción urinaria de zinc ($F=4,87$; $p<0,001$); globalmente los grupos con aporte de selenio tienen tendencia a presentar una menor excreción de zinc. Ejercen un efecto independiente el selenio ($F=6,39$; $p=0,014$), la dieta hipoproteica ($F=10,55$; $p=0,002$) y

existe una interacción positiva entre el alcohol y la dieta hipoproteica ($F=7,41$; $p=0,009$; Tabla 21, pág. 104).

Encontramos diferencias significativas entre los grupos al analizar la excreción urinaria de cobre (KW= 16,96; p=0,018), sin efectos principales o interacciones (Tabla 21).

Grupo	Zn urinario (ppm)	Cu urinario (ppm)		
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	Md	(p25 - p75)
1 (CT)	173,58 ± 22,88	10,66 ± 16,88	4,22	(3,23 - 10,07)
2 (HP)	135,67 ± 13,43	4,31 ± 1,99	3,78	(2,71 - 6,49)
3 (OH)	156,05 ± 13,25	6,80 ± 4,92	5,72	(3,01 - 8,79)
4 (OHHP)	156,09 ± 20,69	3,48 ± 2,33	2,46	(1,76 - 5,83)
5 (CT-Se)	157,81 ± 23,09	6,99 ± 0,94	6,71	(6,33 - 7,08)
6 (HP-Se)	137,42 ± 21,33	7,10 ± 0,81	7,24	(6,33 - 7,58)
7 (OH-Se)	139,88 ± 13,74	7,60 ± 1,31	7,01	(6,40 - 9,03)
8 (OHHP-Se)	134,79 ± 17,78	6,56 ± 2,04	7,11	(4,36 - 8,03)
K-W; p	F=4,87; p<0,001	K-W= 16,96; p=0,018		
SNK	2, 6, 7 y 8 vs. 1	NS		
Efectos principales:	Se: F= 6,39; p= 0,014 HP: F=10,55; p= 0,002 Interacción OH-HP: F=7,41; p=0,009	NS		

Tabla 21: Valores promedio y desviación estándar (SD) de la concentración en orina de zinc (distribución normal); valores promedio, desviación estándar (SD), mediana (Md) y rango intercuartílico (p25-p75) de concentración de cobre urinario, por grupos. Efectos principales analizados mediante análisis de varianza de dos vías. Acrónimos: Grupos: CT – control; HP – hipoproteico; OH – alcohólico; OHHP – alcohólico hipoproteico; -Se – grupo tratado con selenio. Otros acrónimos: NS – no significativo; K-W – Test de Kruskal-Wallis; SNK – Test de Student-Newman-Keuls.

Encontramos diferencias significativas entre los diferentes grupos al analizar los valores de la excreción urinaria de hierro (KW= 14,19; p=0,048; Figura 23). El selenio fue el único factor con efecto independiente (F=7,86; p=0,007; Tabla 22, pág. 106).

Al realizar el análisis del manganeso en orina objetivamos que había diferencias significativas entre los grupos analizados (KW= 23,68; p= 0,001); la menor excreción de manganeso se aprecia sobre todo en el grupo control selenio, en el grupo alcohólico y en el hipoproteico. Sin embargo, no hubo efecto independiente de ninguno de los tres factores. Sí se apreció

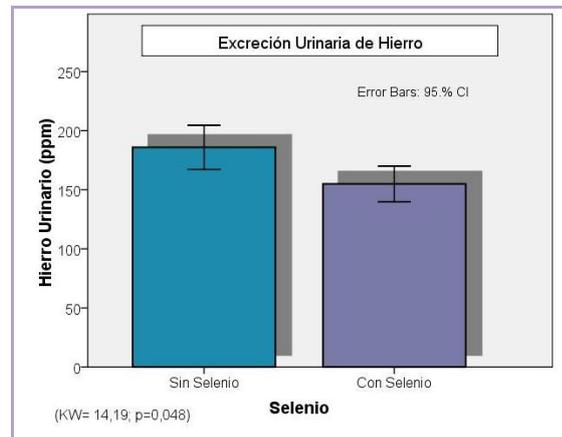


Figura 23: Excreción urinaria de hierro (ppm).

estadísticamente una interacción triple relacionando los tres factores ($F=9,17$; $p=0,004$; Tabla 22).

Al analizar el selenio en orina se apreció la existencia de diferencias significativas entre los diferentes grupos ($F= 7,96$; $p<0,001$; Figura 24). Los grupos hipoproteico con selenio y alcohólico hipoproteico con selenio presentaban diferencias significativas con el resto de grupos al realizar el análisis *post hoc*, siendo las que presentaban mayor excreción urinaria. Al realizar un análisis univariante de la excreción urinaria de selenio se encontró una influencia estadísticamente significativa del aporte de selenio ($F= 17,36$; $p<0,001$; Figura 25) y de la dieta hipoproteica ($F= 10,49$; $p=0,002$). Hay una interacción positiva entre la dieta hipoproteica y el aporte de selenio ($F= 16,16$; $p<0,001$; Tabla 22, pág. 106).

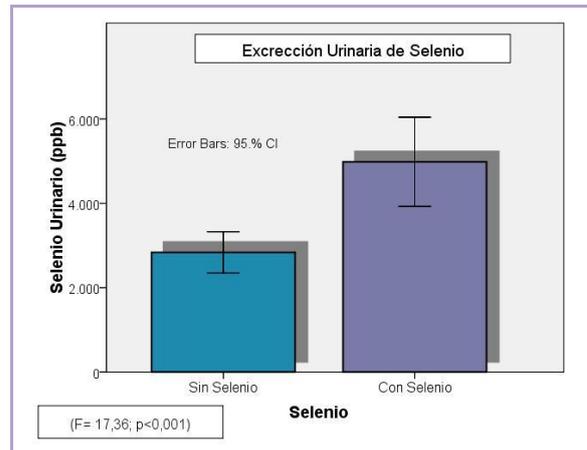


Figura 24: Excreción urinaria de selenio (ppb) en animales tratados con selenio vs. no tratados.

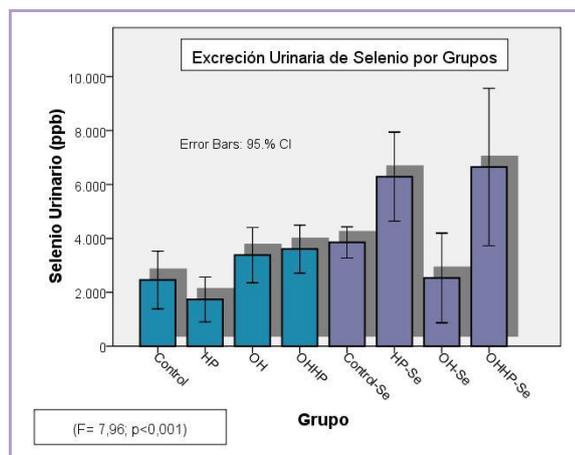


Figura 25: Excreción urinaria de selenio (ppb).

Grupo	Fe urinario (ppm)			Mn urinario (ppm)		
	$\bar{X} \pm SD$	Md	(p25 - p75)	$\bar{X} \pm SD$	Md	(p25 - p75)
1 (CT)	177,43 ± 56,52	179,67	(144,22 - 211,79)	1,72 ± 1,16	1,54	(0,99 - 2,44)
2 (HP)	186,41 ± 31,02	175,45	(163,71 - 213,34)	7,87 ± 6,81	6,33	(3,35 - 8,07)
3 (OH)	193,63 ± 68,19	197,99	(161,81 - 235,86)	0,52 ± 0,37	0,39	(0,21 - 0,92)
4 (OHHP)	203,27 ± 45,92	208,01	(157,37 - 231,48)	1,59 ± 0,80	1,37	(0,93 - 2,47)
5 (CT-Se)	140,69 ± 50,61	158,63	(77,75 - 180,24)	0,85 ± 0,11	0,85	(0,79 - 0,95)
6 (HP-Se)	158,41 ± 23,12	149,19	(141,43 - 180,71)	1,28 ± 1,45	0,77	(0,69 - 1,02)
7 (OH-Se)	126,47 ± 57,39	118,95	(67,86 - 183,05)	1,09 ± 0,22	1,12	(0,95 - 1,31)
8 (OHHP-Se)	177,66 ± 25,06	175,11	(153,16 - 201,16)	0,95 ± 0,27	0,93	(0,71 - 1,24)
K-W; p	K-W=14,19; p=0,048			K-W=23,68; p=0,001		
SNK	4 vs. 7			NS		
Efect. principales:	Se: F=7,86; p=0,007			Int. triple OH-HP-Se: F=9,17; p=0,004		

Tabla 22: Valores promedio, desviación estándar (SD), mediana (Md) y rango intercuartílico (p25-p75) de concentración de hierro y manganeso urinarios, por grupos. Efectos principales analizados mediante análisis de varianza de dos vías. Acrónimos: Grupos: CT – control; HP – hipoproteico; OH – alcohólico; OHHP – alcohólico hipoproteico; -Se – grupo tratado con selenio. Otros acrónimos: NS – no significativo; K-W – Test de Kruskal-Wallis; SNK – Test de Student-Newman-Keuls.

Grupo	Se urinario (ppb)
	$\bar{X} \pm SD$
1 (CT)	2458,64 ± 1496,77
2 (HP)	1735,31 ± 990,73
3 (OH)	3379,02 ± 1229,65
4 (OHHP)	3604,95 ± 1065,12
5 (CT-Se)	3582,58 ± 625,40
6 (HP-Se)	6288,44 ± 2150,86
7 (OH-Se)	2531,36 ± 1799,10
8 (OHHP-Se)	6647,61 ± 3494,63
ANOVA; p	F=7,96; p<0,001
SNK	6 y 8 vs. 1, 2, 3, 4, 5 y 7
Efectos principales:	Se: F=17,36; p<0,001 HP: F=10,49; p=0,002
	Interacción HP-Se: F=16,16; p<0,001

Tabla 23: Valores promedio y desviación estándar (SD) (distribución normal) de la concentración de selenio sérico, por grupos. Efectos principales analizados mediante análisis de varianza de dos vías. Acrónimos: Grupos: CT – control; HP – hipoproteico; OH – alcohólico; OHHP – alcohólico hipoproteico; -Se – grupo tratado con selenio. Otros acrónimos: ANOVA – Análisis de varianza; SNK – Test de Student-Newman-Keuls.

VI. DISCUSIÓN

1. MODELO DIETÉTICO.- El objetivo de este estudio es analizar si la adición de selenio comporta algún beneficio sobre las alteraciones hepáticas inducidas por el alcohol en un modelo experimental murino. La dosis de selenio elegida es elevada, aproximadamente 120-130 mcg/día de selenio elemento, pero se ajusta a las dosis empleadas en otros modelos experimentales en los que se analiza el efecto antioxidante (Sieber *et al.*, 2009). Además hemos elegido estas dosis a fin de garantizar el aporte a pesar de las eventuales pérdidas de este elemento que puede generar el modelo experimental que hemos utilizado.

A la hora de diseñar un estudio que analice los efectos del etanol sobre determinados órganos es imprescindible considerar el factor nutricional, ya que existe una clara interferencia entre el consumo de alcohol y la nutrición. Por una parte el etanol tiene un efecto anorexígeno; esto se ha comprobado en múltiples estudios al observarse que al aportar etanol (habitualmente disuelto en el agua de bebida) sin ajustar por la cuantía de dieta ingerida, los animales tratados con alcohol comen menos (Lieber, 1980 y Lieber, 1988). Además el etanol puede provocar malabsorción (Estruch, 1993). Es por esto que la interpretación de una alteración concreta en la distribución hepática de los oligoelementos o de la actividad antioxidante de alguna enzima dependiente de los mismos va a ser complicada, ya que en ella va a influir un componente de malnutrición.

Por todo esto hemos elegido el modelo de Lieber de Carli, en el que se incluye un grupo alcohólico y un grupo hipoproteico, así como un grupo donde ambos factores están presentes. De esta manera, si se lleva a cabo un proceso de *pair feeding* cuidadoso, podemos llegar a atribuir cualquier alteración obtenida a un efecto directo del alcohol o de la nutrición en su caso. No obstante este modelo tiene una crítica: por lo general los animales alimentados con alcohol ingieren una menor cantidad de calorías y tienden a perder más peso. En esta última consecuencia también intervienen factores relacionados con el metabolismo del etanol, como demostraron brillantemente Rubin y Lieber en 1968 y Pirola en 1970. Al alimentar a voluntarios sanos con nutrientes en cuantía isocalórica, observando que los alcohólicos presentaban una pérdida de peso mientras que los controles lo ganaban. Por eso durante la evolución temporal de un experimento, la cantidad relativa de alcohol por unidad de peso corporal que reciben aquellos

animales que pierden peso, es progresivamente mayor en un modelo estricto de *pair feeding*.

Llevar a cabo un proceso de *pair feeding* cuando se tienen varios grupos diferentes de animales de forma simultánea es complicado y rara vez se logra un ajuste perfecto de la cuantía ingerida. Así ocurrió en nuestro estudio, aunque encontramos un resultado inesperado en cierta manera: en general fueron las ratas alimentadas con selenio las que perdieron más peso, debido aparentemente a una disminución de las ingestas. No obstante en un análisis multivariante se observó que el principal factor causante de la pérdida de peso fue el alcohol, seguido del selenio y por último de la dieta hipoproteica. Al analizar por separado los cuatro grupos alimentados con selenio no observamos diferencias en lo que a la pérdida de peso y a la cuantía de ingestas se refiere. Por lo tanto lo que podemos asegurar es que las eventuales diferencias entre los cuatro grupos de ratas alimentadas con selenio obedecen exclusivamente a factores diferentes del aporte nutricional o de la cantidad de selenio que recibió cada uno de estos grupos. Así, en el análisis multivariante restringido a los cuatro grupos alimentados con selenio, ni el aporte de alcohol ni la dieta hipoproteica influyeron en la cuantía ingerida ni en el cambio de peso. Esto deja al selenio como único factor causante, lo cual contrasta con algunas observaciones en las que se le atribuye un efecto orexígeno (Bogden *et al.*, 1984; Bunk *et al.*, 1980)

El selenio es un cofactor esencial del sistema de la glutatión peroxidasa (GPX); el hígado es su principal reserva y también su diana principal en situaciones de déficit. El alcohol genera una gran cantidad de radicales libres en su metabolismo al tiempo que altera el contenido corporal de otros oligoelementos involucrados en los mecanismos antioxidantes, como el cobre, el zinc y el manganeso, aumentando paralelamente el contenido de hierro, un potente pro-oxidante. También hay que considerar que el etanol suele asociarse a un déficit de vitaminas antioxidantes, como las vitaminas E, C y A. Si bien en el caso de la vitamina C el déficit dietético puede ser importante –aunque se argumenta igualmente que el alcohol genera un aumento de excreción de ácido ascórbico a nivel renal (Faizallah *et al.*, 1989)-, en el caso de la vitamina E el factor que más influye es la malabsorción de las grasas. En el caso de la vitamina A el descenso no se explica meramente por un déficit dietético (de hecho la suplementación no corrige el

déficit), sino que obedece más bien a la transformación que sufren las células de Ito en miofibroblastos a lo largo de la evolución de la hepatopatía etílica, cierto sobre todo en fases avanzadas de la misma. Las células estrelladas o células de Ito constituyen la principal reserva de vitamina A del organismo y al transformarse en miofibroblastos productores de colágeno pierden sus gotas lipídicas y con esto se deplecionan de vitamina A. Por tanto el alcohólico se enfrenta a un déficit de antioxidantes que no sólo se debe a los factores que hemos comentado, sino que también se debe a que se produce una alteración de la capacidad antioxidante intrínseca, ya que el acetaldehído puede conjugarse con el sistema del glutatión formando complejos hemiacetal, alterando su función en el contexto de un incremento de la producción de ROS. Es decir, que la lesión oxidativa se basa en distintos mecanismos que convergen sin duda en lesionar al hígado. Por estas razones es pertinente analizar los efectos del selenio sobre la alteración histológica hepática y la actividad antioxidante de la víscera. Este planteamiento no es estrictamente original ya que otros autores han diseñado estudios parecidos, pero los resultados previos son controvertidos (Sivaram *et al.*, 2003; Bekpinar *et al.*, 1995). Además el tratamiento de pacientes alcohólicos con selenio no ha aportado el beneficio clínico esperado (Butcher *et al.*, 1993; González-Reimers *et al.*, 2008).

El hígado tiene un papel regulador central en el metabolismo del selenio. Una vez absorbido el selenio llega al hígado por la vena porta y en él se une a diversas proteínas intracelulares entre las que destacan diversas formas de la GPX (GPX 1, 3, 4) y la selenoproteína P. Las GPX participan en la actividad antioxidante y su relación con el selenio queda clara en nuestro estudio al encontrarse una relación directa entre GPX y selenio hepático. En situaciones de déficit de selenio, hay autores que demuestran que en el hígado se produce un desplazamiento de la unión del selenio con las GPX en favor de la unión a la selenoproteína P (Chanoine *et al.*, 2004; *et al.*, 2012), que es la proteína encargada de transportarlo desde el hígado a los órganos periféricos, fundamentalmente el cerebro y las gónadas. Es lógico que la actividad de la GPX aumente como se corrobora en nuestro estudio.

Al estudiar el efecto de la suplementación con selenio es pertinente también analizar qué ocurre con los otros oligoelementos con efecto antioxidante, ya que existen datos experimentales que sugieren una interacción entre selenio y otros elementos

como el zinc o el cobre (Bogden *et al.*, 1984; González-Reimers *et al.*, 2003). Además el zinc, el cobre y el manganeso son cofactores de otros sistemas enzimáticos antioxidantes, por lo que es de sumo interés analizar la relación entre la alteración de sus niveles y la intensidad de la lesión hepática. Por último, en un diseño experimental como el que hemos usado en el que perseguimos los objetivos señalados, es conveniente tener presente que la actividad enzimática antioxidante no es un compartimento estanco de cada uno de los tejidos, sino que como con en cualquier otro sistema metabólico está sujeto a un intercambio entre las diversas estructuras tisulares y órganos del organismo. Por eso y dada la importancia cuantitativa del tejido muscular, procede analizar también los efectos del selenio sobre el contenido muscular de los oligoelementos señalados y la actividad antioxidante del músculo. Así, encontramos una relación significativa entre la GPX hepática y la muscular, así como una relación directa entre el zinc, el manganeso y el cobre hepáticos. El hierro hepático muestra tendencia a correlacionarse de forma directa con el manganeso, el cobre y el selenio hepáticos y el selenio en músculo con el selenio hepático.

Como era de esperar, los niveles hepáticos de selenio, si bien mucho más elevados en los grupos suplementados que en aquellos no suplementados, disminuyen moderadamente en los grupos alimentados con dieta hipoproteica o etanol, y mucho más en el grupo alimentado con ambos factores. Esto puede interpretarse como que el selenio se desplaza del hígado a otros tejidos unido a la selenoproteína P, y además se excreta en orina en mayor cantidad, tal como se ha explicado previamente, además de aumentar el consumo en relación con las noxas que generan lesión oxidante.

2. BALONAMIENTO HEPATOCITARIO Y ESTEATOSIS.- Uno de los fenómenos más precoces en el desarrollo de la hepatopatía alcohólica es el balonamiento hepatocitario; en él influye el efecto del etanol al inhibir la oxidación de ácidos grasos y bloquear la exportación de triglicéridos (Baraona *et al.*, 1973; Choi *et al.*, 2006); por todo esto el hepatocito se va cargando de triglicéridos que no puede exportar. Además se ha visto que la síntesis de determinadas proteínas, incluyendo las apoproteínas, está incrementada por efecto directo del alcohol. Estas proteínas no pueden ser secretadas

por el hepatocito, porque uno de los efectos del acetaldehído, relacionado con su capacidad para formar “aductos”, es la alteración del sistema microtubular microfilamentoso. De este modo las proteínas quedan retenidas dentro de la célula y por su efecto oncótico atraen el agua (Baraona *et al.*, 1973). Por eso en el balonamiento hepatocitario hay tres componentes: una acumulación de grasa excesiva, una acumulación de proteínas y un exceso de agua.

El balonamiento hepatocitario ha de considerarse una manifestación precoz de la lesión inducida por el etanol, obedeciendo a los siguientes mecanismos:

- 1- El metabolismo del etanol consume O_2 mediante la vía del MEOS, fundamentalmente en los hepatocitos del área 1 de Rappaport; de este modo llega una menor cantidad de O_2 al área 3, presentando lesiones más precoces y marcadas. Esto se observa en nuestro estudio, en el que se aprecia que el balonamiento hepatocitario es más marcado en las células del área pericentral como hallazgo característico de la hepatopatía alcohólica en sus fases iniciales, aunque las diferencias son ligeras.
- 2- El alcohol altera el equilibrio redox intrahepatocitario de forma profunda y también altera la relación entre pro-oxidantes y antioxidantes. Esto obedece no sólo a los efectos directos del metabolismo del etanol con un incremento en la producción de equivalentes reducidos, sino que también influyen los hechos mencionados previamente: la unión del acetaldehído a la GPX con formación de complejos hemiacetal y alteración consecuente de la función antioxidante de la molécula, la inducción del sistema microsomal oxidante con un incremento de la producción de ROS, la alteración que el consumo crónico de etanol produce sobre ciertos oligoelementos que actúan como cofactores de las enzimas antioxidantes GPX y la superóxido dismutasa (SOD), y la alteración provocada por el etanol sobre el metabolismo del Fe, induciendo un aumento de la absorción intestinal de Fe y de la cantidad de ferritina en el alcoholismo crónico.

El exceso de radicales libres genera malonildialdehído (MDA) al actuar sobre las membranas lipídicas, dañando estructuras proteicas con o sin actividad enzimática. En el alcohólico se dañan las proteínas constitutivas del sistema microtubular microfilamentoso encargado de la secreción de proteínas, entre ellas de las apoproteínas. Por lo tanto, en la lesión de este sistema que es el principal mecanismo secretor hepatocitario, influye no sólo el efecto directo del acetaldehído sino también la lesión oxidante. Es decir, que si en el balonamiento hepatocitario interviene la lesión oxidante como parecen sugerir los fenómenos patogénicos que acabamos de comentar, los niveles de selenio hepático deberían guardar una relación inversa con dicho proceso. Así ocurre en nuestro estudio, ya que hemos observado una relación inversa entre los niveles hepáticos de selenio con el tamaño hepatocitario. No conocemos que se haya realizado un estudio similar en alcohólicos, pero es pertinente señalar que se observó un resultado similar en ratas cirróticas tras tratamiento con tetracloruro de carbono (González-Reimers *et al.*, 2003).

Una parte importante del balonamiento hepatocitario obedece a la acumulación de grasa; esto es congruente con la relación inversa que encontramos entre la cantidad de grasa y los niveles séricos de selenio. La relación inversa entre el contenido de selenio y la gravedad de la esteatosis hepática ha sido puesta de manifiesto también por otros autores: en un modelo experimental en el que se generaba esteatosis con ácido oleico se observó que la adición de selenio tendía a reducir la cantidad de grasa acumulada (Clarke *et al.*, 2010). Otros estudios recientemente publicados encuentran una relación inversa entre el contenido de selenio en el organismo (evaluado por la concentración de selenio en el pelo) y la presencia de esteatosis hepática no alcohólica, observándose un descenso aún más acusado cuando ya aparecía esteatohepatitis (Pan *et al.*, 2013).

Por otro lado otros autores han encontrado que los suplementos de selenio aumentan el contenido de grasa del hígado (Mueller *et al.*, 2008), o que hay un vínculo entre la sobreexpresión GPX-1, la obesidad y el aumento de la masa grasa (McClung *et al.*, 2004). Sin embargo, el mecanismo subyacente a estos resultados probablemente implica un aumento de la síntesis de triglicéridos de forma consecuente al aumento de la actividad antioxidante de la tirosina fosfatasa 1B, que como ya hemos explicado es dependiente del selenio. Estos resultados apuntan a un doble efecto frente a la

administración de suplementos de selenio: por un lado el aumento de triglicéridos en el hígado y de la síntesis de ácidos grasos con el consecuente desarrollo de una situación que se relaciona con aumento de la peroxidación de forma potencial, y por otro lado un aumento en los mecanismos de defensa antioxidante. Por otra parte, en el kwashiorkor y en situaciones de desnutrición marasmática, como es la anorexia nerviosa, se ha descrito un aumento de la grasa en el hígado y de la peroxidación lipídica (Gan *et al.*, 2008), aunque en nuestro estudio las ratas alimentadas con la dieta hipoproteica no mostraron diferencias en comparación con el grupo control.

En otro estudio el tratamiento con antioxidantes (que incluye entre otros antioxidantes 55 mg de selenio en forma de selenato de sodio) durante 20 semanas en niños de 1-4 años con alto riesgo de desarrollar kwashiorkor, no impidió su aparición (Ciliberto *et al.*, 2005). Otros autores no reportan valores de selenio en la sangre significativamente más altos al comparar pacientes con esteatosis y sin esteatosis aunque Kim y su grupo, (Kim *et al.*, 2012) encontraron que el tratamiento con selenito de sodio durante dos semanas condujo a la disminución de la formación de hígado graso en un modelo experimental murino.

Por lo tanto, existen discrepancias documentadas en cuanto a la función del selenio sobre la esteatosis hepática. Es posible que los diferentes resultados se deban a los diferentes enfoques metodológicos y la heterogeneidad de los estudios analizados.

En concordancia con todo lo comentado y de forma paralela a lo que ocurre con la superficie hepatocitaria, en nuestro estudio se observa un efecto similar del selenio al compararlo con la cantidad de grasa: hay una relación inversa entre el selenio y la superficie grasa, que disminuye claramente con el tratamiento con selenio. Como era de esperar los animales tratados con dieta hipoproteica, alcohol o con ambos elementos tenían algo más de grasa, tanto pericentral, periportal como total, que el grupo control. Sin embargo es destacable que de los grupos sometidos a tratamiento, el grupo alcohólico hipoproteico acumulaba menos grasa que el grupo alcohólico con dieta normal. Este resultado, discordante con lo encontrado en otras ocasiones utilizando el mismo modelo experimental (Conde-Martel *et al.*, 1990), puede entenderse partiendo de la base de que la mayor parte de la grasa que se acumula en el hígado en la esteatosis hepática deriva de las reservas corporales de grasa y de que estas reservas tienen que

ver con la ingesta dietética global. Las ratas alimentadas con dieta alcohólica hipoproteica fueron las que más peso perdieron a lo largo del estudio, lo que explica que sus reservas grasas fueran menores y por lo tanto la esteatosis no fuera tan marcada. En nuestro estudio las ratas tratadas con selenio presentaron una tendencia a comer menos que las no suplementadas; esto también se refleja en el peso, ya que las ratas tratadas con este elemento muestran una pérdida de peso superior a las no tratadas, a excepción de las alcohólicas hipoproteicas. Esta reducción de peso podría explicar, al igual que antes, que tuvieran una menor cantidad de grasa hepática, pero existe una marcada desproporción entre la cantidad de grasa que presentan (muy inferior a la del resto de animales, como por ejemplo las ratas alcohólicas y las ratas hipoproteicas) y la pérdida de peso en comparación con estos dos mismos grupos no suplementados con selenio. Sin embargo, al hacer un análisis multivariante, observamos que el único factor implicado en la acumulación de grasa hepática al final del estudio es el peso, y que éste depende de la ingesta y del consumo de una dieta hipoproteica.

La esteatosis hepática es una lesión inicial de primordial importancia en el curso evolutivo de la hepatopatía alcohólica. En ella influye el incremento de la movilización de ácidos grasos desde los tejidos periféricos hacia el hígado, condicionada en gran medida por cambios del perfil hormonal. Determinadas adipoquinas entre las que destacan el TNF- α ejercen un efecto que incrementa la insulinresistencia, haciendo más sensible al tejido adiposo ante la acción de la lipasa hormonosensible.

Aunque no se haya determinado en este estudio, incluso en las fases más tempranas de la exposición crónica al alcohol se observa un incremento de la permeabilidad intestinal que condiciona una llegada masiva de bacterias intestinales al hígado. Estas bacterias estimulan a las células de Kupffer a través de su receptor TLR4 generando la síntesis de citoquinas, sobre todo de TNF- α . Cada vez se da mayor importancia a este fenómeno inicial, ya que parece que sus consecuencias no quedan restringidas al hígado, sino que se manifiestan en órganos distantes. Lo cierto es que el TNF- α favorece la lipólisis (no en vano se llamaba caquectina) además de la génesis de ROS y citoquinas inflamatorias por parte de las células vecinas, como linfocitos, células hepáticas, monocitos o células endoteliales. Es decir que indirectamente debe existir una relación entre el exceso de ROS y la esteatosis hepática. Hemos encontrado que los

niveles de GPX guardan una relación inversa con la cantidad de grasa, lo que es perfectamente congruente con la hipótesis que acabamos de esbozar. Nuestros resultados concuerdan con los de otros estudios experimentales en los que la adición de un pro-oxidante genera esteatosis hepática que se atenúa con la adición de glutatión (Jiang *et al.*, 2010). Recordemos que la actividad del sistema del glutatión guarda una relación directa con los niveles de selenio hepático, lo que explica que otros autores también hayan encontrado que la manipulación del selenio dietético modifica la cantidad de grasa presente en el hígado (Mueller *et al.*, 2008). De hecho la actividad de la GPX es dependiente de la cantidad de selenio, por lo que este resultado era esperable (Garberg y Thullberg, 1996).

3. SUPERFICIE NUCLEAR.- En los estudios relacionados con la hepatopatía alcohólica se le ha prestado menor atención a la superficie nuclear del hepatocito, aunque por lo general en los hepatocitos balonizados se ha encontrado un aumento del tamaño del núcleo (Baraona *et al.*, 1975). Es difícil explicar los mecanismos que subyacen a este incremento de tamaño nuclear aunque en principio podría atribuirse a un incremento de la actividad sintética del DNA o del RNA.

Es cierto que en la hepatopatía alcohólica aparecen hepatocitos binucleados con cierta frecuencia, aunque ocurre en fases más avanzadas que la alcanzada por las ratas de nuestro modelo experimental. Es igualmente cierto que gran parte del incremento de las proteínas que se acumulan en el citoplasma obedece a un aumento de síntesis de las mismas por un incremento de la cantidad de RNA transcrito (Baraona *et al.*, 1975). En nuestro estudio no hubo diferencias en el tamaño del núcleo entre los distintos grupos de animales, pero se observó una relación directa entre actividad antioxidante de la GPX y la superficie nuclear, así como entre el zinc hepático y la superficie nuclear. Esto permite especular que una adecuada actividad antioxidante podría estar favoreciendo la función replicativa del hepatocito. El resultado relativo al zinc apoya esta hipótesis, ya que éste es cofactor de diversas enzimas cuya principal actividad es promover la síntesis de DNA y de RNA, es decir, de enzimas involucradas en la replicación celular y la síntesis proteica. Un incremento de la síntesis proteica podría explicar un aumento del tamaño del núcleo y un incremento en la actividad replicativa podría justificar la

presencia de hepatocitos binucleados. También hay que resaltar que las relaciones señaladas tienen lugar de forma predominante en el área periportal, donde el aporte de O₂ es mayor. Esto tiene lógica, ya que el aporte de oxígeno es siempre necesario para el funcionamiento de las vías sintéticas celulares de forma directa o indirecta.

4. FIBROSIS.- La última fase de la hepatopatía alcohólica viene definida por el depósito de tejido fibroso, que al igual que las otras alteraciones descritas es más marcado en la región pericentral (área 3 de Rapaport). El depósito de tejido fibroso es un proceso complejo que exige una exposición al alcohol que rara vez se consigue en las ratas con el modelo de Lieber-de Carli, al menos de una forma tan importante como la que se observa en la cirrosis hepática o en otros modelos experimentales. No obstante en nuestro estudio sí encontramos una cierta cantidad de depósito de tejido fibrótico, aunque se aprecia un resultado paradójico ya que las ratas control son las que mayor cantidad de fibrosis presentan. Subrayamos aquí que la medición se hizo “a ciegas”, es decir que desconocíamos a qué grupo pertenecía cada muestra que analizábamos. La fibrosis se midió en muestras teñidas con Tricrómico de Masson, que confiere un color rojo al tejido fibrótico; en esta tinción muchas veces aparecen artefactos que pueden modificar la medición del valor real de la cantidad de fibrosis observada. Esto puede explicar este resultado discordante, pero parece claro que en nuestro modelo el selenio no mejora el depósito de tejido fibroso, salvo quizás en el grupo más vulnerable, es decir, en el alcohólico hipoproteico.

Esto contrasta con los resultados de otros autores, para quienes el beneficio del selenio no quedaría restringido únicamente a reducir la esteatosis hepática sino que también aminoraría la cantidad de tejido fibroso que se deposita en las formas más evolucionadas de hepatopatía (Clarke *et al.*, 2010). Es interesante señalar que en este estudio que hemos citado la intensidad de la esteatosis parece condicionar una mayor fibrogénesis. Recordemos que pese a que el selenio hepático guardaba relación inversa con la esteatosis, el tratamiento con selenio no se asoció a una reducción de la fibrosis. Por lo tanto el efecto beneficioso del selenio en relación con la fibrogénesis no se confirma en nuestro estudio ya que la adición de selenio apenas alteraba la cuantía de la

fibrosis, que por otra parte fue más alta que en otros trabajos en la población control. No obstante en otros estudios, las ratas que habitualmente más fibrosis desarrollan son las alimentadas con dieta alcohólica hipoproteica, y en ese subgrupo la adición de selenio sí generaba una reducción más de un 20% en la cantidad de fibrosis depositada (Conde-Martel *et al.*, 1990).

Aun cuando en nuestro estudio no hayamos encontrado relación alguna entre la cantidad de fibrosis y ninguno de los parámetros relacionados con el daño pro-oxidante o la defensa antioxidante, la lesión oxidante interviene también en la fibrogénesis hepática, siendo bien conocido el papel del déficit de zinc en su progresión. En nuestro estudio lo único que se observó es una débil relación –no significativa– entre el contenido hepático de zinc y la cantidad de fibrosis, sin que por lo tanto podamos afirmar que juegue ningún papel en esa alteración.

5. INTERACCIONES.- En este estudio hemos analizado también otros oligoelementos relacionados de forma fundamental con la actividad antioxidante. Las interacciones que se observan en el comportamiento de distintos oligoelementos cuando se suplementa la dieta con otros oligoelementos son complejas, conocidas sólo parcialmente y habitualmente están sujetas a resultados contradictorios dependiendo del modelo experimental seguido. En general la adición de selenio en la dieta suele provocar una disminución de los niveles de cobre, tanto a nivel sérico como a nivel tisular. Este resultado en cierta manera se ha reproducido en nuestro estudio: las ratas tratadas con selenio presentaban globalmente niveles más bajos de cobre hepático ($Z=4,03$; $p<0,001$) y de cobre muscular ($Z= 2,46$ $p=0,014$). Estos resultados pueden tener importancia sobre todo en fases más avanzadas de la hepatopatía ya que el exceso de cobre puede inducir la aparición de fibrosis hepática (Aburto *et al.*, 2001) al ser un cofactor de la lisil oxidasa (Vasdasz *et al.*, 2005) que forma parte de uno de los primeros pasos metabólicos necesarios para la síntesis de colágeno. El hecho de que el selenio induzca una depleción de los niveles hepáticos de cobre subraya el posible efecto beneficioso de este elemento en el desarrollo de hepatopatía.

Otros autores han encontrado también que o bien la adición de selenio provoca un descenso de los niveles séricos o tisulares de cobre o bien existe una relación inversa entre el selenio sérico o tisular y el cobre (Yur *et al.*, 2008; Ghazi *et al.*, 2012) en concordancia con los resultados encontrados en los niveles tisulares. La excreción de cobre urinaria está disminuida en los animales tratados con selenio, lo que apoya una menor absorción intestinal de este elemento y/o una mayor excreción biliar, como se ha descrito.

Existe mayor disparidad en lo que respecta al efecto del selenio sobre el zinc. Algunos autores han encontrado que el exceso de selenio en la dieta inhibe la absorción de zinc, a pesar de que al parecer los lugares prioritarios de absorción en el intestino difieren. Así el selenio se absorbe fundamentalmente en el duodeno, mientras que la absorción de zinc es más difusa, abarcando todo el tracto digestivo (Gregus *et al.*, 1986). Otros encuentran que la adición de selenio se asocia también a un incremento de zinc tisular y sérico. Finalmente, los menos encuentran que el exceso de selenio provoca un déficit de zinc. En nuestro estudio no hemos encontrado diferencias significativas en lo que respecta a los niveles tisulares de zinc en las ratas tratadas o no con selenio. Sin embargo hay una relación estrecha entre los niveles de selenio y zinc hepático ($R=0,69$, $p<0,001$); hay una tendencia a la disminución de la excreción de zinc en orina en las ratas tratadas con selenio, así como también un descenso de los niveles de zinc en el músculo, aunque no significativo. Podría especularse que el déficit de zinc obedece en parte a una defectuosa absorción, lo que explicaría la tendencia a presentar menores niveles en la que es la mayor reserva cuantitativa que es el músculo; este déficit puede condicionar una menor excreción urinaria, en concordancia con los autores citados en primer lugar.

El efecto neutro que tiene el selenio sobre el zinc hepático le resta relevancia a esta eventual interferencia con la absorción de zinc. Lo cierto es que estos dos elementos son los principales agentes capaces de ejercer un efecto antioxidante, por lo que es lógico que exista un equilibrio entre ambos. Así se ha visto que la demanda de selenio tisular se incrementa en situaciones de déficit de zinc, provocando un descenso de los niveles séricos del mismo (Fatmi *et al.*, 2013).

También hay disparidad en las interacciones entre selenio y hierro. Algunos autores observan que la adición de selenio incrementa los niveles hepáticos de hierro, mientras que otros encuentran que, o bien no los modifica, o bien los disminuye (Chareopong-Kawamoto, 1995; Khan *et al.*, 1993). En nuestro estudio no detectamos que el selenio influyera en el contenido hepático de hierro, sino que más bien tiende a provocar un descenso en los niveles musculares de forma paralela a como ocurría con el zinc. De nuevo este efecto puede tener consecuencias positivas para el animal tratado con selenio, ya que el hierro es un potente pro-oxidante involucrado en la lesión hepática, en la peroxidación lipídica y eventualmente en el desarrollo de la cirrosis hepática y del hepatocarcinoma.

Más escasas son las referencias relativas a la interacción entre selenio y el manganeso. El manganeso es un cofactor de la forma de la superóxido dismutasa manganeso dependiente, cuya actividad se acopla con la de la superóxido dismutasa zinc-cobre dependiente (Zn-Cu-SOD). En situaciones de déficit de manganeso se observa que la actividad de esta última aumenta hasta seis veces, pese a lo cual no se logra evitar totalmente la peroxidación lipídica (Khan *et al.*, 1993; Zidenberg-Cheer *et al.*, 1983). Existe por lo tanto aquí también un equilibrio y una compensación entre distintos sistemas antioxidantes; podría esperarse algo parecido en relación con el selenio. En algunos estudios el selenio aumenta aparentemente los niveles de manganeso tisulares (o al menos los normaliza) en situaciones de déficit de manganeso (Farrag EK, 1999; Ong *et al.*, 2004). Este resultado no se corrobora en absoluto en nuestro estudio, ya que no encontramos que el selenio modifique los niveles tisulares de manganeso ni urinarios.

VII. CONCLUSIONES

1.- En el modelo experimental seguido, el tratamiento con etanol y/o dieta hipoproteica provoca esteatosis hepática y balonamiento hepatocitario.

2.- El tratamiento con selenio reduce la acumulación de grasa y el balonamiento hepatocitario, observándose una relación inversa entre el tamaño de los hepatocitos y el selenio hepático, y entre la intensidad de la esteatosis hepática y el selenio sérico. En cambio no hemos encontrado que la adición de selenio reduzca el depósito de tejido fibroso (aunque éste es escaso en el modelo experimental utilizado)

3.- La alteración descrita se acompaña de cambios paralelos en la actividad de la Glutación Peroxidasa. El selenio hepático guarda una relación directa con la actividad de la glutación peroxidasa e inversa con la peroxidación lipídica, en concordancia con su acción antioxidante.

4.- El selenio tiende a disminuir los niveles hepáticos de cobre y ejerce sobre el mismo un efecto independiente en el análisis multivariante. Dado el papel del cobre como oxidante y cofactor de lesión oxidativa (necrosis y aumento de la síntesis de colágeno), este efecto del selenio converge con las acciones descritas sobre la peroxidación lipídica, la actividad antioxidante, el balonamiento hepatocitario y la intensidad de la esteatosis.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Aburto EM, Cribb AE, Fuentealba C. Effect of chronic exposure to excess dietary copper and dietary selenium supplementation on liver specimens from rats. *Am J Vet Res.* 2001 Sep;62(9):1423-7.

Adachi M, Ishii H. Role of mitochondria in alcoholic liver injury. *Free Radic Biol Med.* 2002 Mar 15;32(6):487-91.

Adachi Y, Bradford BU, Gao W, Bojes HK, Thurman RG. Inactivation of Kupffer cells prevents early alcohol-induced liver injury. *Hepatology.* 1994 Aug;20(2):453-60.

Addolorato G., Capristo E., Greco A.V., Stefanini G.F. y Gasbarrini G. Energy expenditure, substrate oxidation, and body composition in subjects with chronic alcoholism: new findings from metabolic assessment. *Alcohol Clin Exp Res.* 1997 Sep;21(6):962-7.

Albano E, Tomasi A, Gorla-Gatti L, Poli G, Vannini A, Dianzani MU. Free radical metabolism of alcohols in rat liver microsomes. *Free Radic Res Commun.* 1987;3(1-5):243-9.

Albano E. Free radical mechanism in immune reactions associated with alcoholic liver disease. *Free Radic Biol Med* 2002 Jan 15;32(2):110-4.

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

Alissa EM, Bahijri SM, Ferns GA. The controversy surrounding selenium and cardiovascular disease: a review of the evidence. *Med Sci Monit* 2003 Jan;9(1):RA9-18.

Álvarez-González, F.J. 7 del Río Gracia, C. *Farmacología del Alcohol. Manual SET de Alcoholismo* (2003) (1ª ed). [pp 109-129]. Buenos Aires: Editorial Panamericana.

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

Auld D.S. y Bergman T. Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families : The role of zinc for alcohol dehydrogenase structure and function. *Cell Mol.Life Sci.*, 65, 3961-3970.

Avila MA, Berasain C, Torres L, Martín-Duce A, Corrales FJ, Yang H, Prieto J, Lu SC, Caballeria J, Rodes J, Mato JM. Reduced mRNA abundance of the main enzymes involved in Methionine metabolism in human liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2000 33:907-914.

Badger TM, Korourian S, Hakkak R, Ronnis MJJ, Ingelman-Sundberg M, Shelnutt SR, Waldron J. Diet and risk of ethanol-induced hepatotoxicity: carbohydrate-fat relationships in rats. *Toxicol Sci* 1999 Jan;47(1):110-7.

Bailey SM, Mantena SK, Millender-Swain T, Cakir Y, Jhala NC, Chhieng D, Pinkerton KE, Ballinger SW. Ethanol and tobacco smoke increase hepatic steatosis and hypoxia in the hypercholesterolemic apoE (-/-) mouse: implications for a "multihit" hypothesis of fatty liver disease. *Free Radic Biol Med*. 2009 Apr 1;46(7):928-38.

Bailey SM, Cunningham CC. Contribution of mitochondria to oxidative stress associated with alcoholic liver disease. *Free Radic Biol Med* 2002 32:11–16.

Bailey SM, Robinson G, Pinner A, Chamlee L, Ulasova E, Pompilius M, Page GP, Ch Hieng D, Jhala N, Landar A, Kharbanda KK, Ballinger S, Darley-Usmar V. S-Adenosylmethionine prevents chronic alcohol-induced mitochondrial dysfunction in the rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006 Nov;291(5):G857-67. Epub 2006 Jul 6.

Baraona E, Pirola RC, Lieber CS. Pathogenesis of postprandial hyperlipemia in rats fed ethanol-containing diets. *J Clin Invest*. 1973 Feb;52(2):296-303.

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

Bekpinar S, Tugrul Y. Influence of selenium supplementation in non-toxic doses on testis lipid peroxide and antioxidant levels in chronic alcohol-fed rats. *Alcohol Alcohol*. 1995 Sep;30(5):645-50.

Blank SE, Duncan DA, Meadows GG. Suppression of natural killer cell activity by ethanol consumption and food restriction. *Alcohol Clin Exp Res*. 1991 Feb;15(1):16-22.

Bogden JD, Al-Rabiai 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.

Boveris A, Fraga CG, Varsavsky AI, Koch OR. Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats. *Arch Biochem Biophys* 1983 227:534–541.

Brauer M., Lu W. y Ling M. The effects of hypoxia on the bioenergetics of liver in situ in chronic ethanol-treated rats: a noninvasive in vivo ³¹P magnetic resonance spectroscopy study. *J.Stud.Alcohol*, 58, 119-129.

Brown SS., Forrest JA, Roscoe P. A controlled trial of fructose in the treatment of acute alcoholic intoxication. *Lancet* 1972 Oct 28;2(7783):898-9

- Bunk MJ, Combs GF Jr. Effect of selenium on appetite in the selenium-deficient chick. *J Nutr.* 1980 Apr;110(4):743-9.
- Casals-Mercadal G, Torra-Santamaría M, Deulofeu-Piquet R, Ballesta-Gimeno AM. Importancia del selenio en la práctica clínica. *Química Clínica* 2005; 24(3) 141-148.
- 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.
- Cederbaum AI. Iron and CYP2E1-dependent oxidative stress and toxicity. *Alcohol* 2003 Jun;30(2):115–120.
- Cederbaum AI, Lu Y, Wu D. Role of oxidative stress in alcohol-induced liver injury. *Arch Toxicol.* 2009 Jun;83(6):519-48.
- Chance B, Schoener B, Oshino R, Itshak F, Nakase Y. Oxidation-reduction ratio studies of mitochondria in freeze-trapped samples. NADH and flavoprotein fluorescence signals. *J Biol Chem.* 1979 Jun 10;254(11):4764-71.
- Chanoine JP, Wong AC, Lavoie JC. Selenium deficiency impairs corticosterone and leptin responses to adrenocorticotropin in the rat. *Biofactors.* 2004;20(2):109-18.
- Chapman RW, Morgan MY, Bell R, Sherlock S. Hepatic iron uptake in alcoholic liver disease. *Gastroenterology* 1983 84:143–147.
- Chareonpong-Kawamoto N, Higasa T, Yasumoto K. Histological study of iron deposits in selenium-deficient rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1995 Oct;59(10):1913-20.
- Chawla RK, Watson WH, Eastin CE, Lee EY, Schmidt J, McClain CJ. S-Adenosylmethionine deficiency and TNF- α in lipopolysaccharide- induced hepatic injury. *Am J Physiol* 1998 275:G125–G129.
- Choi MJ, Kim MJ, Chang KJ. The effect of dietary taurine supplementation on plasma and liver lipid concentrations and mineral metabolism in rats fed alcohol. *Adv Exp Med Biol.* 2006;583:243-50.
- Ciliberto H, Ciliberto M, Briend A, Ashorn P, Bier D, Manary M. Antioxidant supplementation for the prevention of kwashiorkor in Malawian children: randomised, double blind, placebo controlled trial. *BMJ.* 2005 May 14;330(7500):1109.
- Clarke C, Baghdadi H, Howie AF, Mason JI, Walker SW, Beckett GJ. Selenium supplementation attenuates procollagen-1 and interleukin-8 production in fat-loaded

human C3A hepatoblastoma cells treated with TGFbeta1. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Jun;1800(6):611-8.

Cohen G, Sinet PM, Heikkila R. Ethanol oxidation by rat brain in vivo. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 1980 Oct;4(4):366-70.

Colell A, Garcia-Ruiz C, Miranda M, Ardite E, Martín M, Morales A, Corrales F, Kaplowitz N, Fernández-Checa JC. Selective glutathione depletion of mitochondria by ethanol sensitizes hepatocytes to tumor necrosis factor. *Gastroenterology* 1998 115:1541–1551.

Conde Martel A., Gonzalez Reimers E., Santolaria Fernández F., Castro Aleman V., Marchena Gomez J., Martiez Riera A. Liver changes in protein malnutrition. An experimental study in rats. *Nutr Hosp.* 1993 Jul-Aug;8(6):358-63.

Cooper RG, Magwere T (2008). Nitric oxide-mediated pathogenesis during nicotine and alcohol consumption. *Indian J Physiol Pharmacol.* 2008 Jan-Mar;52(1):11-8.

Cunningham CC, Coleman WB, Spach PI. The effects of chronic ethanol consumption on hepatic mitochondrial energy metabolism. *Alcohol* 1990 25:127–136.

De Groot H. Reactive oxygen species in tissue injury. *Hepatogastroenterology.* 1994 Aug;41(4):328-32.

DeMaster EG, Redfern B, Nagasawa HT. Differential inhibition of rat tissue catalase by cyanamide. *Biochem Pharmacol* 1986 Jul 1;35(13):2081-5

Demeilliers C, Maisonneuve C, Grodet A, Mansouri A, Nguyen R, Tinel M, Lettéron P, Degott C, Feldmann G, Pessayre D, Fromenty B. Impaired adaptive resynthesis and prolonged depletion of hepatic mitochondrial DNA after repeated alcohol binges in mice. *Gastroenterology* 2002 123:1278–1290

Denke M., Wilson JD. Malnutrición de proteínas y energía. *Harrison Principios de Medicina Interna.* 1998. Cap 74:513-15.

Doffoel M, Tongio MM, Gut JP, Charrault A, Vetter D, Ledig M, North ML, Mayer S, Bockel R. Relationships between 34 HLA-A, HLA-B and HLA-DR antigens and three serological markers of viral infections in alcoholic cirrhosis. *Hepatology.* 1986 May-Jun;6(3):457-63.

Donohue TM, Osna NA, Clemens DL. Recombinant Hep G2 cells that express alcohol dehydrogenase and cytochrome P450 2E1 as a model of ethanol-elicited cytotoxicity. *Int J Biochem Cell Biol* 2006 38:92–101.

Drewniak T, Wajdowicz A, Kwiatek W, Juszcak K, Maciukiewicz P. Selected markers of oxidative stress and carcinogenic trace elements concentrations in the renal cell carcinoma tissue. *Pol Merkur Lekarski*. 2012 Jun;32(192):378-81.

Duane P., Raja K.B., Simpson R.J. y Peters T.J. Intestinal iron absorption in chronic alcoholics. *Alcohol Alcohol* 1992, 27, 539-544

Duryee MJ, Willis MS, Freeman TL, Kuszynski CA, Tuma DJ, Klassen LW, Thiele GM. Mechanisms of alcohol liver damage: aldehydes, scavenger receptors, and autoimmunity. *Front Biosci* 2004 9:3145–3155.

Dworkin B.M., Rosenthal W.S., Stahl R.E. y Panesar N.K. Decreased hepatic selenium content in alcoholic cirrhosis. *Dig.Dis.Sci.* 1988, 33, 1213-1217.

Edenberg HJ, Brown CJ. Regulation of human alcohol deshydrogenase genes. *Pharmacogenetics*. 1992 Oct;2(5):185-96

Enomoto N, Ikejima K, Bradford BU, Rivera CA, Kono H, Goto M, Yamashina S, Schemmer P, Kitamura T, Oide H, Takei Y, Hirose M, Shimizu H, Miyazaki A, Brenner DA, Sato N, Thurman RG. Role of Kupffer cells and gut-derived endotoxins in alcoholic liver injury. *J Gastroenterol Hepatol*. 2000 Mar;15 Suppl:D20-5.

Eriksson CJ. The role of acetaldehyde in the actions of alcohol (update 2000). *Alcohol Clin Exp Res*. 2001 May;25(5 Suppl ISBRA):15S-32S.

Estruch R, Nicolás JM, Villegas E, Junqué 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.

Farrag EK. Interaction between supplemented selenium and/or vitamin E and Mn, Zn, Fe, and Cu in *Schistosoma* infected mice. *J Egypt Soc Parasitol*. 1999 Aug;29(2):517-29.

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 29:14–20.

Fatmi W, Kechrid Z, Nazırođlu M, Flores-Arce M. Selenium supplementation modulates zinc levels and antioxidant values in blood and tissues of diabetic rats fed zinc-deficient diet. *Biol Trace Elem Res*. 2013 May;152(2):243-50.

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 83:1247–1252.

Fernández-Checa JC, Kaplowitz N, Colell A, García-Ruiz C. Oxidative stress and alcoholic liver disease. *Alcohol Health Res World* 1997 21:321–324.

Finley JW, Penland JG. Adequacy or deprivation of dietary selenium in healthy men: clinical and psychological findings. *J Trace Elem Exp Med* 1998; 11: 11-27.

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.

Fridovich I. Superoxide anion radical, superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem* 1997 272:18515–18517.

Ganz T. Hcpidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood*. 2003 Aug 1;102(3):783-8.

Garberg P, Thullberg M. Decreased glutathione peroxidase activity in mice in response to nafenopin is caused by changes in selenium metabolism. *Chem Biol Interact*. 1996 Jan 5;99(1-3):165-77.

Garcia-Ruiz C, Morales A, Colell A, Ballesta A, Rodés J, Kaplowitz N, Fernández-Checa JC. Feeding S-adenosyl-L-methionine attenuates both ethanol-induced depletion of mitochondrial glutathione and mitochondrial dysfunction in periportal and perivenous rat hepatocytes. *Hepatology* 1995 21:207–214.

Ghazi Harsini S, Habibiyan M, Moeini MM, Abdolmohammadi AR. Effects of dietary selenium, vitamin E, and their combination on growth, serum metabolites, and antioxidant defense system in skeletal muscle of broilers under heat stress. *Biol Trace Elem Res*. 2012 Sep;148(3):322-30.

Gonzalez-Reimers E, Martinez-Riera A, Santolaria-Fernandez F, Mas-Pascual A, Rodriguez-Moreno F, Galindo-Martin 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-Reimers E, Santolaria-Fernández F, Garrido-Benedicto P, Durán-Castellón MC, Galindo-Martín L, Martínez-Riera A, Viña-Rodríguez J, de la Vega-Prieto MJ. Combined effects of steroids, ethanol and protein deficiency on tissue content and urinary and faecal excretion of zinc, copper and iron. *Alcohol Alcohol*. 2002 Mar-Apr;37(2):132-7.

- González-Reimers E, López-Lirola A, Olivera RM, Santolaria-Fernández F, Galindo-Martín L, Abreu-González P, Sánchez-Sánchez JJ, Martínez-Riera A. Effects of protein deficiency on liver trace elements and antioxidant activity in carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis. *Biol Trace Elem Res*. 2003 Summer;93(1-3):127-40.
- González-Reimers E, Galindo-Martín L, Santolaria-Fernández F, Sánchez-Pérez MJ, Alvisa-Negrín J, García-Valdecasas-Campelo E, González-Pérez JM, Martín-González MC. Prognostic value of serum selenium levels in alcoholics. *Biol Trace Elem Res*. 2008 Oct;125(1):22-9.
- Goodman DS, Deykin D. Fatty acid ethyl ester formation during ethanol metabolism in vivo. *Proc.Soc.Exp. Biol. Med*. 1963 May;113:65-7
- Góth L, Páy A. Genetic heterogeneity in acatalasemia. *Electrophoresis*. 1996 Aug;17(8):1302-3.
- 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.
- Gregus Z, Klaassen CD. Disposition of metals in rats: a comparative study of fecal, urinary, and biliary excretion and tissue distribution of eighteen metals. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1986 Aug;85(1):24-38.
- Gropper, S. S., Smith, J. L., & Groff, J. L. Lipids. In *Advanced Nutrition and Human Metabolism 2008* (5 ed., pp. 131-177). Belmont, USA: Wadsworth, Gengage Learning.
- Grove J, Daly AK, Bassendine MF, Day CP (1997). Association of a tumor necrosis factor promoter polymorphism with susceptibility to alcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 1997 Jul;26(1):143-6.
- Guengerich FP. *Mammalian cytochrome P450*. CRC Press 1987, Boca Raton
- Guengerich FP. Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem Res Toxicol* 2001 Jun;14(6):611-50.
- Guo P, Zhao P, Liu J, Ma H, Bai J, Cao Y, Liu Y, He H, Qi C. Preparation of a novel organoselenium compound and its anticancer effects on cervical cancer cell line HeLa. *Biol Trace Elem Res*. 2013 Feb;151(2):301-6.
- Haber PS, Apte MV, Moran C, Applegate TL, Pirola RC, Korsten MA, McCaughan GW, Wilson JS. Non-oxidative metabolism of ethanol by rat pancreatic acini. *Pancreatology* 2004;4(2):82-9. Epub 2004 Mar 30.
- Halliwell B. Antioxidant defense mechanisms: from the beginning to the end. *Free Radic Res* 1999 31:261–272.

Harrison-Findik DD, Schafer D, Klein E, Timchenko NA, Kulaksiz H, Clemens D, Fein E, Andriopoulos B, Pantopoulos K, Gollan J. Alcohol metabolism-mediated oxidative stress down-regulates hepcidin transcription and leads to increased duodenal iron transporter expression. *J.Biol.Chem.* 2006, 281, 22974-22982.

Haseba T. A new sight on alcohol metabolism and alcoholism--role of high Km alcohol dehydrogenase ADH3 (Class III). *Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi*, 44, 78-93.

Hautekeete ML., Degott C., Benhamou JP. Microvesicular steatosis of the liver. *Acta Clínica Bélgica* 1990;45(5):311-26.

Herrman JL. The properties of a rat serum protein labelled by the injection of sodium selenite. *Biochim Biophys Acta.* 1977 Nov 7;500(1):61-70.

Holford NH. Clinical pharmacokinetics of ethanol. *Clinicall Pharmacokinetics.* Nov:13(5):273-92.

Hon WM, Lee KH, Khoo HE. Nitric oxide in liver diseases: friend, foe, or just passerby? *Ann N Y Acad Sci* 2002 962:275-295

Hu Y, Ingelman-Sundberg M, Lindros KO. Induction mechanisms of cytochrome P450 2E1 in liver: interplay between ethanol treatment and starvation. *Biochem Pharmacol.* 1995 Jul 17;50(2):155-61.

Huang Y.L., Sheu J.Y. y Lin T.H. Association between oxidative stress and changes of trace elements in patients with breast cancer. *Clin.Biochem* 1999 Mar;32(2):131-6.

Huang YS, Wu JC, Chang FY, Lee SD. Interleukin-8 and alcoholic liver disease. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei).* 1999 Jul;62(7):395-401.

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.

Hwang KM, Scott KM, Brierley GP. Ion transport by heart mitochondria. The effects of Cu 2+ on membrane permeability. *Arch Biochem Biophys.* 1972 Jun;150(2):746-56.

limuro Y, Bradford BU, Yamashina S, Rusyn I, Nakagami M, Enomoto N, Kono H, Frey W, Forman D, Brenner D, Thurman RG. The glutathione precursor L-2-oxothiazolidine-4- carboxylic acid protects against liver injury due to chronic enteral ethanol exposure in the rat. *Hepatology* 2000 31:391-398.

limuro Y, Gallucci RM, Luster MI, Kono H, Thurman RG. Antibodies to tumor necrosis factor alpha attenuate hepatic necrosis and inflammation caused by chronic exposure to ethanol in the rat. *Hepatology* 1997 26:1530-1537.

Ingelman-Sundberg M, Johansson I, Penttilä KE, Glaumann H, Lindros KO. Centrilobular expression of ethanol-inducible cytochrome P-450 (IIE1) in rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1988 157:55–60.

Ishmael J, Gopinath C, Treeby PJ. Blood copper and serum enzyme changes following copper calcium E.D.T.A. administration to hill sheep of low copper status. *J Comp Pathol*. 1971 Oct;81(4):455-61.

Jackson AA. Severe undernutrition in Jamaica. Kwashiorkor and marasmus: the disease of weanling. *Acta Paediatr Scand Suppl*. 1986;323:43-51.

Jiang X, Dong J, Wang B, Yin X, Qin L. Effects of organic selenium supplement on glutathione peroxidase activities: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Wei Sheng Yan Jiu*. 2012 Jan;41(1):120-3.

Johnson CD, Hosking S. National statistics for diet, alcohol consumption, and chronic pancreatitis in England and Wales, 1960-88. *Gut*. 1991 Nov;32(11): 1401-5.

Jones MK, Jones BM. Ethanol metabolism in women taking oral contraceptives. *Alcohol Clin. Exp. Res*. 1984 Jan-Feb;8(1):24-8.

Kang LL, Zhao FC, Yang FY, Zhang YG, Guo X. Changes of the content of Se and the levels of several cytokines in the serum of patients with Kaschin-Beck disease. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*. 2007 Jun;23(6):531-2.

Khan MZ, Szarek J, Markiewicz K. Concurrent oral administration of monensin and selenium to broiler chickens: effects on concentration of different elements in the liver. *Acta Vet Hung*. 1993;41(3-4):365-79.

Kim JE, Choi SI, Lee HR, Hwang IS, Lee YJ, An BS, Lee SH, Kim HJ, Kang BC, Hwang DY. Selenium significantly inhibits adipocyte hypertrophy and abdominal fat accumulation in OLETF rats via induction of fatty acid β -oxidation. *Biol Trace Elem Res*. 2012 Dec;150(1-3):360-70.

Kitson KE. Ethanol and acetaldehyde metabolism: past, present, and future. *Alcohol Clin Exp Res*. 1996 Nov;20(8 Suppl):82A-92A.

Klein EA, Thompson IM Jr, Tangen CM, Crowley JJ, Lucia MS, Goodman PJ, Minasian LM, Ford LG, Parnes HL, Gaziano JM, Karp DD, Lieber MM, Walther PJ, Klotz L, Parsons JK, Chin JL, Darke AK, Lippman SM, Goodman GE, Meyskens FL Jr, Baker LH. Vitamin E and the risk of prostate cancer: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *JAMA*. 2011 Oct 12;306(14):1549-56.

Knight JA. Free radicals: their history and current status in aging and disease. *Ann Clin Lab Sci* 1998 28:331–346.

Kohgo Y, Ohtake T, Ikuta K, Suzuki Y, Hosoki Y, Saito H, Kato J. Iron accumulation in alcoholic liver diseases. *Alcohol Clin Exp Res.* 2005 Nov;29(11 Suppl):189S-93S.

Kukielka E, Dicker E, Cederbaum AI. Increased production of reactive oxygen species by rat liver mitochondria after chronic ethanol treatment. *Arch Biochem Biophys* 1994 309:377–386.

Kunitoh S., Tanaka T., Imaoka S., Funae Y. y Monna Y. Contribution of cytochrome P450s to MEOS (microsomal ethanol-oxidizing system): a specific and sensitive assay of MEOS activity by HPLC with fluorescence labeling. *Alcohol Alcohol Suppl*, 1B, 63-68.

Kwo, P. Y. & Crabb, D. W. Genetics of ethanol metabolism and alcoholic liver disease. In D.I.N.Sherman, V. R. Preedy, & R. R. Watson (Eds.), *Ethanol and the Liver: mechanisms and management* (pp. 95-129). NY, USA: Taylor & Francis, Inc.

Lander HM, Tauras JM, Ogiste JS, Hori O, Moss RA, Schmidt AM. Activation of the receptor for advanced glycation end products triggers a p21(ras)-dependent mitogen-activated protein kinase pathway regulated by oxidant stress. *J Biol Chem.* 1997 Jul 11;272(28):17810-4.

Laposata E.A. y Lange L.G. Presence of nonoxidative ethanol metabolism in human organs commonly damaged by ethanol abuse. *Science* Jan 31;231(4737):497-9.

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.* *Alcohol Alcohol.* 1989;24(3):197-211.

Lieber C.S. Aetiology and pathogenesis of alcoholic liver disease. *Baillieres Clin.Gastroenterol.* 1993, 7, 581-608.

Lieber C.S. Role of oxidative stress and antioxidant therapy in alcoholic and nonalcoholic liver diseases. *Adv Pharmacol.* 1997;38:601-28.

Lieber C.S., Gentry R.T. y Baraona E. First pass metabolism of ethanol. *Alcohol Alcohol Suppl.* 1994;2:163-9.

Lieber CS (2002). S-Adenosyl-L-methionine: its role in the treatment of liver disorders. *Am J Clin Nutr* 2002 Nov;76(5):1183S-7S.

- Lieber CS, Casini A, DeCarli LM, Kim C, Lowe N, Sasaki R, Leo MA. S-Adenosyl-L-methionine attenuates alcohol-induced liver injury in the baboon. *Hepatology* 1990 Feb;11(2):165-72.
- Lieber CS, DeCarli LM. Ethanol oxidation by hepatic microsomes: adaptive increase after ethanol feeding. *Science*. 1968 Nov 22;162(3856):917-8.
- Lieber CS. Alcohol, protein metabolism, and liver injury. *Gastroenterology*. 1980 Aug;79(2):373-90.
- Lieber CS. Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. *Clin Chim Acta*. 1997 Jan 3;257(1):59-84.
- Look MP, Rockstroh JK, Rao GS, Kreuzer KA, Spengler U, Sauerbruch T. Serum selenium versus lymphocyte subsets and markers of disease progression and inflammatory response in human immunodeficiency virus-infection. *Biol Trace Elem Res* 1997; 56: 31-41.
- Lumeng L, Crabb DW. Alcoholic liver disease. *Curr Opin Gastroenterol*. 2000 May;16(3):208-18.
- Lytton SD, Helander A, Zhang-Gouillon ZQ, Stokkeland K, Bordone R, Arico S, Albano E, French SW, Ingelman-Sundberg M. Autoantibodies against cytochromes P-450E1 and P-450A in alcoholics. *Mol Pharmacol* 1999 55:223–233.
- 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;18(5):1247-53.
- MacFarquhar JK, Broussard DL, Melstrom P, Hutchinson R, Wolkin A, Martin C, Burk RF, Dunn JR, Green AL, Hammond R, Schaffner W, Jones TF. Acute selenium toxicity associated with a dietary supplement. *Arch Intern Med*. 2010 Feb 8;170(3):256-61.
- Maher JJ, Tzagarakis C, Giménez A. Malondialdehyde stimulates collagen production by hepatic lipocytes only upon activation in primary culture. *Alcohol Alcohol*. 1994 Sep;29(5):605-10.
- Manautou J.E. y Carlson G.P. Ethanol-induced fatty acid ethyl ester formation in vivo and in vitro in rat lung. *Toxicology*. 1991;70(3):303-12.
- Mansouri A, Gaou I, De Kerguenec C, Amsellem S, Haouzi D, Berson A, Moreau A, Feldmann G, Lette´ron P, Pessayre D, Fromenty B. An alcoholic binge causes massive degradation of hepatic mitochondrial DNA in mice. *Gastroenterology* 1999 117:181–190.

McClung JP, Roneker CA, Mu W, Lisk DJ, Langlais P, Liu F, Lei XG. Development of insulin resistance and obesity in mice overexpressing cellular glutathione peroxidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jun 15;101(24):8852-7.

McCord J. Iron, free radicals and oxidative injury. *Semin Hematol* 1998 Jan;35(1):5-12.

McKim SE, Gabele E, Isayama F, Lambert JC, Tucker LM, Wheeler MD, Connor HD, Mason RP, Doll MA, Hein DW, Arteel GE (2003). Inducible nitric oxide synthase is required in alcohol-induced liver injury: studies with knockout mice. *Gastroenterology* 2003 Dec;125(6):1834-44.

Mogelson S, Pieper SJ, Lange LG. Thermodynamic bases for fatty acid ethyl ester synthase catalyzed esterification of free fatty acid with ethanol and accumulation of fatty acid ethyl esters. *Biochemistry*. 1984 Aug 28;23(18):4082-7.

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 May;33(5):488-92.

Mueller AS, Klomann SD, Wolf NM, Schneider S, Schmidt R, Spielmann J, Stangl G, Eder K, Pallauf J. Redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1B by manipulation of dietary selenium affects the triglyceride concentration in rat liver. *J Nutr*. 2008 Dec;138(12):2328-36.

Nakazawa J, Genka C, Fujishima M. Pathological aspects of active oxygens/free radicals. *Jpn J Physiol* 1996 46:15-32.

Nanji AA, Hiller-Sturmhöfel S. Apoptosis and necrosis : two types of cell death in alcoholic liver disease. *Alcohol Health Res World* 1997 21:325-330.

Nanji AA, Zhao S, Sadrzadeh SMH, Dannenberg AJ, Tahan SR, Waxman DJ. Markedly enhanced cytochrome P450E1 induction and lipid peroxidation is associated with severe liver injury in fish oil-ethanol-fed rats. *Alcohol Clin Exp Res* 1994 18:1280-1285.

Nedergaard J., Ricquier D. y Kozak L.P. Uncoupling proteins: current status and therapeutic prospects. *EMBO Rep*. 2005, 6, 917-921.

Nicolas JM., Estruch R., Antunez E., Sacanella E., Urbano Marquez A. (1993). 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.

Niemela O. Distribution of ethanol-induced protein adducts in vivo: relationship to tissue injury. *Free Radic Biol Med* 2001 31:1533–1538.

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.

Nordman R, Riviere C, Rouach H. Implication of free radical mechanisms in ethanol-induced cellular injury. *Free Radic Biol Med* 1992 12:219–240.

Odabasi E, Turan M, Aydin A, Akay C, Kutlu M. Magnesium, zinc, copper, manganese, and selenium levels in postmenopausal women with osteoporosis. Can magnesium play a key role in osteoporosis? *Ann Acad Med Singapore*. 2008 Jul;37(7):564-7.

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.

Oh SI, Kim CI, Chun HJ, Park SC. Chronic ethanol consumption affects glutathione status in rat liver. *J Nutr* 1998 128:758–763.

Ong JH, Chejlava M, Fried B, Koehnlein KM, Bosavage GL, Sherma J. Effects of *Schistosoma mansoni* infection on inorganic elements in the snail *Biomphalaria glabrata*. *J Helminthol*. 2004 Dec;78(4):343-6.

Pan D, Huang H. Hair selenium levels in hepatic steatosis patients. *Biol Trace Elem Res*. 2013 Jun;152(3):305-9.

Pastorino JG, Marcineviciute A, Cahill A, Hoek JB. Potentiation by chronic ethanol treatment of the mitochondrial permeability transition. *Biochem Biophys Res Commun* 1999 265:405–409.

Petersen DR. Pharmacogenetic approaches to the neuropharmacology of ethanol. *Recent Dev Alcohol*. 1983;1:49-69.

Polavarapu R., Spitz DR., Sim JE., Follansbee MH., Oberley LW., Rahemtulla A., Nanji AA. Increased lipid peroxidation and impaired antioxidant enzyme 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.

Purohit V, Rapaka R, Kwon OS, Song BJ. Roles of alcohol and tobacco exposure in the development of hepatocellular carcinoma. *Life Sci*. 2013 Jan 17;92(1):3-9.

Purohit V, Russo D, Salin M. Role of iron in alcoholic liver disease: introduction and summary of the symposium. *Alcohol*. 2003 Jun;30(2):93-7.

Purohit V. y Brenner D.A. Mechanisms of alcohol-induced hepatic fibrosis: a summary of the Ron Thurman Symposium. *Hepatology*. 2006 Apr;43(4):872-8.

Raucy JL, Lasker JM, Kramer JC, Salazer DE, Lieber CS, Corcoran GB. Induction of P-450IIE1 in the obese rat. *Mol Pharmacol* 1991 39:275–280

Rayman, M. The importance of selenium to human health. *Lancet*. 2000 Jul 15;356(9225):233-41.

Reid MB., Li YP. Tumor necrosis factor-alpha and muscle wasting: a cellular perspective. *Respir Res*. 2001;2(5):269-72.

Reinke LA. Spin trapping evidence for alcohol-associated oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2002 32:953–957.

Ren Y., Deng F., Zhu H., Wan W., Ye J. y Luo B. Effect of epigallocatechin-3-gallate on iron overload in mice with alcoholic liver disease. *Mol Biol Rep*. 2011 Feb;38(2):879-86.

Roberts BJ, Shoaf SE, Jeong KS, Song BJ. Induction of CYP2E1 in liver, kidney, brain and intestine during chronic ethanol administration and withdrawal: evidence that CYP2E1 possesses a rapid phase half-life of 6 hours or less. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994 Dec 15;205(2):1064-71.

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.

Rosen GM, Pou S, Ramos CL, Cohen MS, Britigan BE. Free radicals and phagocytic cells. *FASEB J*. 1995 Feb;9(2):200-9.

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 30;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.

Rubin E. y Lieber C.S. Alcohol-induced hepatic injury in nonalcoholic volunteers. *N.Engl.J.Med* 1968, 278, 869-876.

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.

Salaspuro V, Nyfors S, Heine R, Siitonen A, Salaspuro M, Jousimies-Somer H. Ethanol oxidation and acetaldehyde production in vitro by human intestinal strains of *Escherichia coli* under aerobic, microaerobic, and anaerobic conditions. *Scand J Gastroenterol.* 1999 Oct;34(10):967-73.

Salmela KS, Kaihovaara P, Salaspuro M, Roine RP (1996). Role of catalase in rat gastric mucosal ethanol metabolism in vitro. *Alcohol Clin.Exp.Res.* 1996 Sep;20(6):1011-5.

Santolaria F., González-Reimers E., Pérez Manzano JL., Milena A., Gómez-Rodríguez MA., González Díaz A., De la Vega MJ., Martínez Riera A. (2000b). Osteopenia assessed by body composition analysis is related to malnutrition in alcoholic patients. *Alcohol.* 2000 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. (2000a). Nutritional assesment in alcoholic patients. Its relationship with alcoholic intake, feeding habits, organic complications and social problems. *Drug Alcohol Depend.* 2000aJun;59(3):295-304.

Seale LA, Hashimoto AC, Kurokawa S, Gilman CL, Seyedali A, Bellinger FP, Raman AV, Berry MJ. Disruption of the selenocysteine lyase-mediated selenium recycling pathway leads to metabolic syndrome in mice. *Mol Cell Biol.* 2012 Oct;32(20):4141-54.

Sempértegui F, Estrella B, Vallejo W, Tapia L, Herrera D, Moscoso F, Cerón G, Griffiths JK, Hamer DH. Selenium serum concentrations in malnourished Ecuadorian children: a case-control study. *Int.J.Vitam.Nutr.Res.* 2003, 73, 181-186.

Sieber F, Muir SA, Cohen EP, North PE, Fish BL, Irving AA, Mäder M, Moulder JE. High-dose selenium for the mitigation of radiation injury: a pilot study in a rat model. *Radiat Res.* 2009 Mar;171(3):368-73.

Sivaram AG, Suresh MV, Indira M. Combined effect of ascorbic acid and selenium supplementation on alcohol-induced oxidative stress in guinea pigs. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2003 Mar;134(3):397-401.

Solomons, N. W. Zinc and Copper in Human Nutrition. In C.C.Thomas (Ed.) 1980, Zinc and Copper in Medicine (pp. 224-275). Springfield, Illi., USA.

Song Z, McClain CJ, Chen T. S-adenosylmethionine protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Pharmacology* 2004 Aug;71(4):199-208.

Song Z, Zhou Z, Chen T, Hill D, Kang J, Barve S, McClain C. S-Adenosylmethionine (SAME) protects against acute-alcohol induced hepatotoxicity in mice. *J Nutr Biochem* 2003 14:591–597.

Stal P, Johansson I, Ingelman-Sundberg M, Hagen K, Hultcrantz R. Hepatotoxicity induced by iron overload and alcohol: studies on the role of chelatable iron, cytochrome P450 2E1 and lipid peroxidation. *J Hepatol* 1996 Oct;25(4):538-46.

Stål P., Hultcrantz R. Iron increase ethanol toxicity in rat liver. *J Hepatology*. 1993 Jan;17 (1):108-15.

Sternlieb I. Copper and the liver. *Gastroenterology*. 1980 Jun;78(6):1615-28.

Stickel F, Buch S, Lau K, Meyer zu Schwabedissen H, Berg T, Ridinger M, Rietschel M, Schafmayer C, Braun F, Hinrichsen H, Günther R, Arlt A, Seeger M, Müller S, Seitz HK, Soyka M, Lerch M, Lammert F, Sarrazin C, Kubitz R, Häussinger D, Hellerbrand C, Bröring D, Schreiber S, Kiefer F, Spanagel R, Mann K, Datz C, Krawczak M, Wodarz N, Völzke H, Hampe J. Genetic variation in the PNPLA3 gene is associated with alcoholic liver injury in caucasians. *Hepatology*. 2011 Jan;53(1):86-95.

Sullivan JF, Heaney RP. Zinc metabolism in alcoholic liver disease. *Am J Clin Nutr*. 1970 Feb;23(2):170-7.

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;33(5):1130-40.

Teli MR., Day CP., Burt AD., Bennett MK., James OF. (1995a). Determinants of progression to cirrhosis or fibrosis in pure alcoholic fatty liver. *Lancet*. 1995 Oct 14;346 (8981):987-90.

Teli MR., James OF., Burt AD., Bennett MK., Day CP. (1995b). The natural history of non-alcoholic fatty liver: a follow-up study. *Hepatology*. 1995 Dec;22(6):1714-9.

Terelius Y, Norsten-Hoog C, Cronholm T, Ingelman-Sundberg M. Acetaldehyde as a substrate for ethanol-inducible cytochrome P-450 (CYP2E1). *Biochem Biophys Res Commun* 1991 179:689–694

Thuluvath PJ, Triger DR. Selenium in chronic liver disease. *J Hepatol*. 1992 Mar;14(2-3):176-82

- Thurman RG. Mechanisms of hepatic toxicity. II. Alcoholic liver injury involves activation of Kupffer cells by endotoxin. *Am J Physiol* 1998 Oct;275(4 Pt 1):G605-11.
- Toyokuni S. Reactive oxygen species-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathol Int.* 1999 Feb;49(2):91-102.
- Trépo E, Gustot T, Degré D, Lemmers A, Verset L, Demetter P, Ouziel R, Quertinmont E, Vercruysse V, Amininejad L, Deltenre P, Le Moine O, Devière J, Franchimont D, Moreno C. Common polymorphism in the PNPLA3/adiponutrin gene confers higher risk of cirrhosis and liver damage in alcoholic liver disease. *J Hepatol.* 2011 Oct;55(4):906-12.
- Tsukamoto H, Horne W, Kamimura S, Niemela O, Parkkila S, Yla-Herttuala S, Brittenham GM. Experimental liver cirrhosis induced by alcohol and iron. *J Clin Invest* 1995 96:620–630.
- Tsukamoto H., Gaal K. y French S.W. Insights into the pathogenesis of alcoholic liver necrosis and fibrosis: status report. *Hepatology.* 1990 Sep;12(3 Pt 1):599-608.
- Tsukamoto H., Lin M., Ohata M., Giulivi C., French SW., Brittenham G. Iron primes hepatic macrophages for NF- κ B activation in alcoholic liver injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 1999 Dec;277:G1240-G1250.
- Tuma DJ. Role of malondialdehyde-acetaldehyde adducts in liver injury. *Free radical Biol Med* 2002 Feb 15;32(4):303-8.
- Underwood EJ. Trace elements in Human and Animal Nutrition. New York: Academic Press 1977; pp56-108
- Upadhy SC, Tirumalai PS, Boyd MR, Mori T, Ravindranath V. Cytochrome P4502E (CYP2E) in brain: constitutive expression, induction by ethanol and localization by fluorescence in situ hybridization. *Arch Biochem Biophys.* 2000 Jan 1;373(1):23-34.
- Vadasz Z, Kessler O, Akiri G, Gengrinovitch S, Kagan HM, Baruch Y, Izhak OB, Neufeld G. Abnormal deposition of collagen around hepatocytes in Wilson's disease is associated with hepatocyte specific expression of lysyl oxidase and lysyl oxidase like protein-2. *J Hepatol.* 2005 Sep;43(3):499-507.
- Valerio LG Jr, Parks T, Petersen DR. Alcohol mediates increases in hepatic and serum nonheme iron stores in a rat model for alcohol-induced liver injury. *Alcohol Clin Exp Res* 1996 Nov;20(8):1352-61.
- Venkatraman A, Shiva S, Davis AJ, Bailey SM, Brookes PS, Darley- Usmar VM (2003). Chronic alcohol consumption increases the sensitivity of rat liver mitochondrial respiration to inhibition by nitric oxide. *Hepatology* 2003 Jul;38(1):141-7

- Vinceti M, Crespi CM, Malagoli C, Bottecchi I, Ferrari A, Sieri S, Krogh V, Alber D, Bergomi M, Seidenari S, Pellacani G. A case-control study of the risk of cutaneous melanoma associated with three selenium exposure indicators. *Tumori*. 2012 May-Jun;98(3):287-95
- Wang JF, Greenberg SS, Spitzer JJ. Chronic alcohol administration stimulates nitric oxide formation in the rat liver with or without pretreatment by lipopolysaccharide. *Alcohol Clin Exp* 1995 Apr;19(2):387-93.
- Werner J., Saghir M., Fernández-Del C.C., Warshaw A.L. y Laposata M. Linkage of oxidative and nonoxidative ethanol metabolism in the pancreas and toxicity of nonoxidative ethanol metabolites for pancreatic acinar cells. *Surgery* 2001 Jun;129(6):736-44.
- Werner J, Saghir M, Warshaw AL, Lewandrowski KB, Laposata M, Iozzo RV, Carter EA, Schatz RJ, Fernández-Del Castillo C. Alcoholic pancreatitis in rats: injury from nonoxidative metabolites of ethanol. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 2002 Jul;283(1):G65-73.
- Wheeler MD, Thurman RG. The role of Kupffer cell oxidant production in early ethanol-induced liver disease. *Free Rad Biol Med* 2001 Dec 15;31(12):1544-9.
- White TB, Hammond DK, Vásquez H, Strobel HW. Expression of two cytochromes P450 involved in carcinogen activation in a human colon cell line. *Mol Cell Biochem*. 1991 Mar 27;102(1):61-9.
- 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.
- Wu D. y Cederbaum A.I. Oxidative stress and alcoholic liver disease. *Semin.Liver Dis*. 2009 May;29(2):141-54.
- Xiao Q, Weiner H, Crabb DW. The mutation in the mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH2) gene responsible for alcohol-induced flushing increases turnover of the enzyme tetramers in a dominant fashion. *J Clin Invest*. 1996 Nov 1;98(9):2027-32.
- Yang C, Zeisberg M, Mosterman B, Sudhakar A, Yerramalla U, Holthaus 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 Q, DePierre JW. Rapid one-step isolation of mouse liver catalase by immobilized metal ion affinity chromatography. *Protein Expr Purif*. 1998 Mar;12(2):277-83.

Yin S.J., Chou C.F., Lai C.L., Lee S.L. y Han C.L. Human class IV alcohol dehydrogenase: kinetic mechanism, functional roles and medical relevance. *Chem.Biol.Interact.* 2003 Feb 1;143-144:219-27.

Yoo J, Ning SM, Pantuck CB, Pantuck EJ, Yang CS. Regulation of hepatic microsomal cytochrome P-450 2E1 level by dietary lipids and carbohydrates in rats. *J Nutr* 1991 Jul;121(7):959-65.

Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 1994 Jan;74(1):139-62.

Yur F, Dede S, Deger Y, Kilicalp D. Effects of vitamin E and selenium on serum trace and major elements in horses. *Biol Trace Elem Res.* 2008 Dec;125(3):223-8.

Zidenberg-Cherr S, Keen CL, Lönnerdal B, Hurley LS. Superoxide dismutase activity and lipid peroxidation in the rat: developmental correlations affected by manganese deficiency. *J Nutr.* 1983 Dec;113(12):2498-504.

Zima T., Fialova L., Mestek O., Janebova M., Crkovska J., Malbohan I., Stipek S., Mikulikova L., Popov P. (2001). Oxidative stress, metabolism of ethanol and alcohol-related diseases. *J Biomed Sci.* 2001 Jan-Feb;8(1):59-70.