

Curso 2009/10
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/40
I.S.B.N.: 978-84-7756-988-6

JOSÉ MARÍA GONZÁLEZ PÉREZ

**Alcohol y malnutrición sobre el metabolismo óseo.
Efecto de la suplementación dietética con selenio**

Directores

**EMILIO GONZÁLEZ REIMERS
LUIS RAFAEL GALINDO MARTÍN
CARMEN DURÁN CASTELLÓN**



SOPORTES AUDIOVISUALES E INFORMÁTICOS
Serie Tesis Doctorales

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, al Dr. Emilio González Reimers, por su inagotable paciencia y dedicación, por brindarme generosamente su tiempo y por ser fuente de inspiración desde mis primeros pasos en la Medicina. También a su familia, por hacerme sentir como en casa durante tantas tardes de trabajo en las que invadí su hogar.

Al Dr. Luis Galindo Martín, por su abnegada dedicación y su ayuda, incluso fuera de cualquier horario laboral razonable, por su consejo, correcciones y por cederme durante este periodo su valioso tiempo.

A la Dra. María del Carmen Durán Castellón, por su apoyo durante la realización de esta tesis, su consejo, dirección y sus elaboradas correcciones.

A Pepe, María José y Cande, compañeros de fatigas, que hicieron muchos momentos más amenos y compartieron muchas cargas que de otra forma, hubieran resultado difíciles de llevar.

A Patri, por estar siempre a mi lado, aún en la distancia, por sus consejos, sus ánimos y por ser siempre un pilar donde apoyarse.

A mi familia, por su ayuda y apoyo en esta empresa, y a mis padres, gracias a la inspiración de *uno*, y la dedicación y esfuerzo de *otra*, hoy me encuentro escribiendo los comentarios de mi Tesis Doctoral.

Al Dr. Tomás González Hernández y a su equipo, especialmente a Nacho y a Domingo, y al Departamento de Anatomía, por soportar la invasión de sus instalaciones y el pillaje de su material, las preguntas, llamadas de auxilio y tantas otras cosas.

A los compañeros del Servicio de Urgencias del Hospital General de La Palma, que en estos últimos meses que he compartido con ellos me han soportado, cambiado guardias y cubierto horas de trabajo, con la mejor de las voluntades, para que pudiese volcarme en finalizar esta empresa, demostrando un compañerismo “más allá del deber”.

A la Dra. Remedios Alemán y el Dr. Ricardo Gutiérrez por su preocupación y ayuda para que este trabajo llegue a buen fin, y dentro del plazo previsto.

Al Dr. Antonio Milena y la Dra. María José de la Vega, por su ayuda con la determinación de parámetros bioquímicos.

Al personal de la Unidad de Investigación y del Animalario, por su ayuda y su trabajo, indispensable para la realización de este proyecto.

A los encargados de la impresión y encuadernación, por su buen hacer profesional y su paciencia.

A mis amigos y a todos los que me han apoyado y ayudado a lo largo de estos años, y que por extensión no pueden ser citados uno a uno.

“Cuando la gratitud es tan absoluta las palabras sobran”.

ÁLVARO MUTIS

“Mientras el río corra, los montes hagan sombra y en el cielo haya estrellas, debe durar la memoria del beneficio recibido en la mente del hombre agradecido”.

VIRGILIO

“Agradece a la llama su luz, pero no olvides el pie del candil que, constante y paciente, la sostiene en la sombra”.

RABINDRANATH TAGORE

ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

ACTH	=	<i>adrenocorticotropic hormone</i>
ADH	=	alcohol deshidrogenasa
ADN	=	ácido desoxirribonucleico
AG	=	aparato de Golgi
AL	=	grupo <i>ad libitum</i>
ALDH	=	aldehído deshidrogenasa
ALP	=	<i>alkaline phosphatase</i>
AO	=	área de osteoide
ARN	=	ácido ribonucleico
ATP	=	adenosina tri-fosfato
BMP	=	<i>bone morphogenetic protein</i>
BSP	=	<i>bone sialoprotein</i>
Ca	=	calcio
CFU-GM	=	<i>granulocyte-macrophage colony forming units</i>
CoA	=	coenzima A
CT	=	grupo control
D4	=	4ª vértebra dorsal
DMO	=	densidad mineral ósea
DMT	=	<i>divalent metal transporter</i>
DXA	=	<i>dual energy x-ray absorptiometry</i>
EIA	=	<i>enzyme immuno assay</i>
ELISA	=	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FAEE	=	<i>fatty acid ethyl ester</i>
GH	=	<i>growth hormone</i>
GPX	=	glutación peroxidasa
HP	=	grupo alimentado con dieta hipoproteica
HUC	=	Hospital Universitario de Canarias
IGF-1	=	<i>insulin-like growth factor-1</i>
IL	=	interleucina
IMC	=	índice de masa corporal
ISCD	=	<i>International Society for Clinical Densitometry</i>
KC	=	<i>Kupffer cells</i>
K-W	=	<i>Kruskall-Wallis</i>
L5	=	5ª vértebra lumbar
LDL	=	<i>low density lipoprotein</i>
M-CSF	=	<i>macrophage colony stimulating factor</i>
MEOS	=	<i>microsomal ethanol oxidizing system</i>
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>
NIH	= <i>National Institutes of Health</i>
NS	= no significativo
OCN	= osteocalcina
OH	= grupo tratado con alcohol
OHHP	= grupo tratado con alcohol y alimentado con dieta hipoproteica
OMS	= Organización Mundial de la Salud
OPG	= osteoprotegerina
OPN	= osteopontina
P	= fósforo
PDGF	= <i>platelet-derived growth factor</i>
ppb	= partes por billón (10 ⁹)
ppm	= partes por millón
PTH	= <i>parathormone</i>
QTC	= tomografía computadorizada cualitativa
RANK	= <i>receptor activator for nuclear factor kappa B</i>
RANKL	= <i>receptor activator for nuclear factor kappa B ligand</i>
REL	= retículo endoplásmico liso
RER	= retículo endoplásmico rugoso
RIA	= <i>radio immuno assay</i>
ROS	= <i>reactive oxygen species</i>
SD	= <i>standard deviation</i>
Se	= grupo tratado con selenio (al final del acrónimo de grupo)
SMF	= sistema mononuclear fagocítico
SNK	= <i>test de Student-Newmann-Keuls</i>
SOD	= superóxido dismutasa
TGF-β	= <i>transforming growth factor beta</i>
TLR	= <i>toll-like receptor</i>
TNF-α	= <i>tumor necrosis factor alpha</i>
TP	= telopéptido
TRAP	= <i>tartrate-resistant acid phosphatase</i>
UCP	= <i>uncoupling proteins</i>
VOT	= volumen óseo trabecular
vs.	= <i>versus</i>
WHO	= <i>World Health Organization</i>

[ÍNDICE]

Índice

I. ÍNDICE.....	1
II. INTRODUCCIÓN.....	6
1. Conceptos generales. Estructura y metabolismo óseo.....	7
1.1 Desarrollo óseo.....	7
1.2 Estructura y remodelado óseo.....	9
1.3 Metabolismo óseo.....	20
1.3.1 Hormona Paratiroidea.....	20
1.3.2 Vitamina D.....	21
1.3.3 Hormona de crecimiento-Somatomedina C.....	22
1.3.4 Calcitonina.....	23
1.3.5 Hormonas sexuales.....	24
1.3.6 Otras hormonas.....	25
1.3.7 RANK-RANKL-OPG.....	25
1.3.8 Factores mecánicos.....	26
2. Osteopatía del alcohólico.....	27
2.1 Epidemiología y conceptos generales.....	27
2.2 Fisiopatología de la osteopatía del alcohólico.....	33
2.2.1 Desequilibrio en el recambio óseo.....	33
2.2.2 Alteración del metabolismo calcio-fosfórico.....	36
2.2.3 Alteración de otros ejes hormonales.....	38
2.2.4 Citocinas.....	38
2.3 Metabolismo del alcohol.....	40
2.3.1 Vía de la alcohol deshidrogenasa.....	41
2.3.2 Vía del Sistema Microsómico Oxidante del Etanol.....	44
2.3.3 Vía de la Catalasa.....	45
2.3.4 Oxidación del acetaldehído.....	46
2.3.5 Otras reacciones en el metabolismo del alcohol.....	48
2.4 Cirrosis hepática.....	49

2.5 Malnutrición del paciente alcohólico.	52
2.6 Estrés oxidativo.	56
3. Oligoelementos involucrados en mecanismos antioxidantes y peroxidación.....	58
3.1 Hierro.	58
3.2 Cobre.	64
3.3 Manganeso.	72
3.4 Zinc.	76
3.5 Selenio.	84
III. OBJETIVOS.....	91
IV. MATERIAL Y MÉTODO.	93
1. Población a estudio.	94
1.1 Animales y alimentación.....	94
1.2 Sacrificio y recogida de muestras.	97
1.2.1 Hueso.	97
1.2.2 Sangre.	98
2. Estudio del hueso.	98
2.1 Análisis histológico.	98
2.2 Determinación de oligoelementos.	100
3. Determinaciones serológicas.	103
3.1 Determinación de selenio.....	103
3.2 Otras determinaciones.	103
4. Determinaciones en orina.....	104

5. Análisis estadístico.	105
V. RESULTADOS.	106
1. Parámetros nutricionales.	107
1.1 Ingesta y peso.	107
1.2 Albúmina sérica.	109
2. Remodelado óseo.	110
2.1 Volumen óseo trabecular.	110
2.1.1 Relaciones con parámetros nutricionales.....	112
2.1.2 Relación con hormonas involucradas en el recambio óseo.	112
2.1.2 Relación con parámetros de remodelado óseo.	112
2.2 Área de osteoide.....	113
2.2.1 Relaciones con parámetros nutricionales.....	113
2.2.2 Relación con hormonas involucradas en el recambio óseo.	114
2.3 Osteocalcina.	114
2.3.1 Relaciones con factores nutricionales.	115
2.3.2 Relaciones con factores involucrados en el remodelado óseo.	115
2.4 Telopéptido.....	116
3. Principales hormonas del metabolismo óseo.	117
3.1 Factor de crecimiento insulínico tipo 1.	117
3.1.1 Relaciones con parámetros nutricionales.....	119
3.1.2 Relaciones con parámetros de formación de hueso.	119
3.2 Hormona paratiroidea.	119
3.2.1 Relaciones con parámetros nutricionales.....	120

4. Oligoelementos.	121
4.1 Selenio sérico.....	121
4.1.1 Relación con selenio óseo.....	121
4.2 Selenio óseo.....	122
4.2.1 Relaciones con parámetros de destrucción de hueso.....	123
4.2.2 Otras relaciones.	123
4.3 Zinc óseo.	124
4.3.1 Relación con albúmina.....	125
4.3.2 Relación con IGF-1.	126
4.3.3 Otras relaciones.	126
4.4 Hierro óseo.	126
4.4.1 Relaciones.	127
4.5 Cobre óseo.....	127
4.5.1 Relaciones.	129
4.6 Manganeso óseo.	129
4.6.1 Relaciones.	130
5. Resumen de relaciones halladas.	131
VI. DISCUSIÓN.	132
VII. CONCLUSIONES.	147
VIII. BIBLIOGRAFÍA.	149

INTRODUCCIÓN

[INTRODUCCIÓN]

Conceptos Generales. Estructura y metabolismo óseo

Osteopatía del alcohólico

Oligoelementos involucrados en mecanismos antioxidantes y peroxidación

1. CONCEPTOS GENERALES. ESTRUCTURA Y METABOLISMO ÓSEO

1.1 DESARROLLO ÓSEO

El hueso humano es una estructura de sostén por una parte, pero también un importante regulador del metabolismo calcio-fosfórico y del equilibrio ácido-base. Adquiere su configuración característica como consecuencia de los procesos de crecimiento y modelado. Mediante el primero, el hueso alcanza el tamaño propio del adulto, y es por causa del modelado que adquiere sus caracteres morfológicos, que hacen que una tibia humana difiera de la de otras especies. A estos dos procesos dominantes durante el periodo de crecimiento se añade un tercero, de importancia capital para la adaptación del hueso al esfuerzo mecánico y para su función metabólica, que es el remodelado. En efecto, el hueso sufre un proceso de remodelación continuo a lo largo de la vida consistente en la síntesis del mismo en determinadas zonas, función llevada a cabo por los osteoblastos; mientras en otras zonas es destruido por los osteoclastos en un proceso denominado reabsorción. Ambos procesos se encuentran en equilibrio variable a lo largo de la vida adulta no senil. Desde la adolescencia hasta aproximadamente los treinta años, se produce un progresivo aumento de la síntesis en relación a la reabsorción, lo que facilita por una parte el crecimiento y por otra parte la adquisición de un “pico” de masa ósea. No hay un consenso claro en cuanto a la edad en la que este pico de masa es alcanzado, ya que depende del tipo de medida utilizado, el hueso medido y el sexo. En cualquier caso, se acepta de forma general que la mayor parte de este pico se alcanza en la adolescencia tardía, consolidándose finalmente en torno a los veintidós y los veintinueve años, tanto en hombres como en mujeres (Henry et al., 2004). A partir de este momento, comienza un lento proceso de pérdida de masa ósea, que supone aproximadamente entre 0,61 y 0,74% anual (Cheng *et al.*, 2007). El pico de masa ósea desciende gradualmente tanto en hombres como en mujeres (Firooznia *et al.*, 1984). Esta tasa de pérdida se mantiene en el varón a lo largo de toda la vida; en cambio en la

mujer esta pérdida se acelera tras la menopausia, alcanzando tasas de pérdida de masa ósea entre el 2 –pérdida normal– y el 5,6% –“perdedoras rápidas de hueso” o *rapid bone losers*– (Firooznia *et al.*, 1986). Esta tasa aumentada de pérdida ósea en la mujer menopáusica se mantiene de cinco a diez años (Kato *et al.*, 2005) y posteriormente continua nuevamente de forma paralela a la

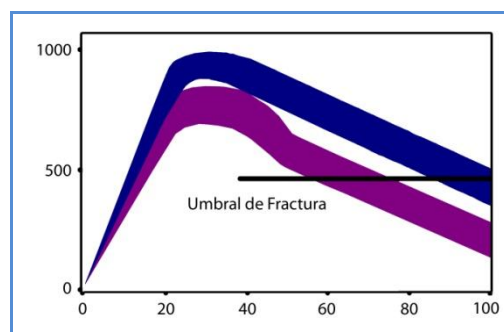


Figura 1: Masa esquelética (gramos de calcio) según la edad en hombres (azul) y mujeres (violeta). Imagen extraída y modificada de Massardo (2002).

del varón, eso sí, un escalón más bajo (Figura 1). A los 50 años, la mujer puede haber perdido hasta un 37% de hueso esponjoso y un 6% de hueso cortical y el hombre un 42% y un 15%, respectivamente (Riggs *et al.*, 2008).

La densidad mineral ósea (DMO) se ve influenciada por diversos factores. Algunos estudios han concluido que el componente genético o familiar podría determinar entre un 22 y un 58% de la variación de la DMO (Krall y Dawson-Hughes, 1993). Otros autores han encontrado que los factores genéticos podrían ser responsables de hasta el 84% de la variabilidad de este valor (Gueguen *et al.*, 1995). Sin embargo, este resultado es considerado excesivo por otros autores que sostienen que ha sido sobrestimado en modelos monogénicos y estudios realizados sobre gemelos (Slemenda *et al.*, 1991; Peacock *et al.*, 2002) y que el factor hereditario es de carácter multigénico (Hopwood *et al.*, 2009; Gueguen *et al.*, 1995; Peacock *et al.*, 2002; Ralston, 2007). El resto de la variabilidad de la DMO correspondería a factores ambientales. Se ha descrito una relación negativa entre la DMO y distintos factores como el tabaquismo, la baja ingesta de calcio, escasa actividad física y bajo peso corporal (Valimaki *et al.*, 1994); el sexo femenino, la edad avanzada, la deficiencia de estrógenos, la raza blanca y un bajo índice de masa corporal (IMC), así como la malnutrición, y el alcoholismo, son también factores consistentemente asociados con valores bajos de masa ósea. Por otra parte, el consumo –no abusivo– de alcohol, así como de bebidas que contienen cafeína, también ha sido relacionado, aunque de forma más laxa, con disminución de DMO (NIH, 2000).

Tal como se ha comentado, y como puede deducirse por el comportamiento fisiológico de la DMO, todo fenómeno que disminuya el pico de masa ósea, adelante su adquisición, adelante la menopausia o aumente la tasa de desmineralización, es susceptible de producir osteopenia y aumenta el riesgo de osteoporosis.

Acorde con lo que se acaba de comentar, algunos autores observan como variaciones en la ingesta de calcio durante las etapas precoces de la vida pueden suponer una diferencia de hasta el 10% (1 SD) en el pico de masa ósea (Lloyd *et al.*, 1993). Esta pequeña diferencia, sin embargo, puede potencialmente contribuir en más del 50% a las tasas de fracturas de cadera en etapas más tardías (Bonjour *et al.*, 2009; Rizzoli *et al.*, 2010), tal como puede observarse en la Figura 2.

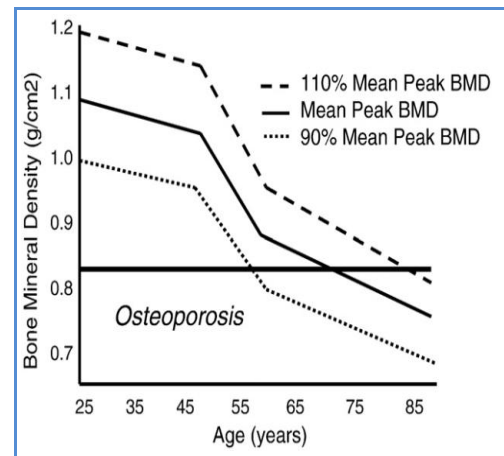


Figura 2: Simulación de la influencia del pico de masa ósea sobre la edad en que la DMO alcanza el umbral diagnóstico para la osteoporosis (Rizzoli *et al.*, 2010).

Otra medida de la consistencia del hueso es el volumen óseo trabecular (VOT), que podemos determinar de forma directa por histomorfometría. Antes de los cincuenta años el valor aceptado como normal es aproximadamente del 22-23% (Ellis y Peart, 1972), y se reduce progresivamente hasta un 15,8% desde los 50 a los 70 años (Wakamatsu y Sissons, 1969).

1.2 ESTRUCTURA Y REMODELADO ÓSEO

El tejido óseo es un tejido conjuntivo mineralizado y se encuentra además muy vascularizado e innervado. La unidad funcional e histológica del hueso es la *osteona*, que consiste en un conducto central, denominado *conducto de Havers*, en torno al cual se disponen de 4 a 20 laminillas óseas. Por el interior de estos conductos pasan venas, arterias y nervios que se encuentran además interconectados por conductos

transversales, denominados *conductos de Volkmann*. Las laminillas que forman este tejido se constituyen de tejido osteoide mineralizado, en cuyo interior se encuentran los osteocitos (Ilustración 1). El hueso compacto se compone de osteonas, mientras que el esponjoso está formado por laminillas óseas dispuestas formando un entramado, dejando entre ellas cavidades delimitadas que albergan la médula ósea (Wheater *et al.*, 1987).

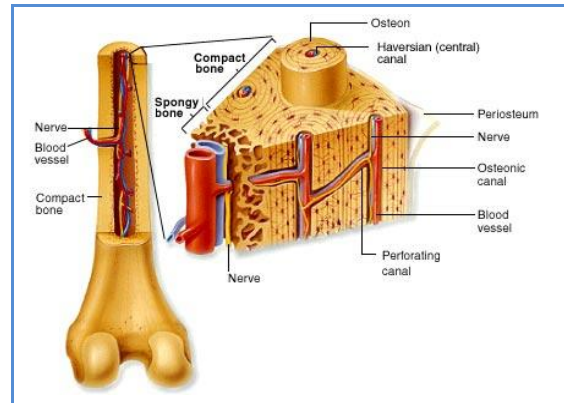


Ilustración 1: Estructura del hueso (PUCV, 2010).

El remodelado óseo cuenta entre sus funciones con la de reparar las microlesiones producidas en el hueso bien por el uso normal, o de origen traumático, así como en respuesta a factores mecánicos, no solo el efecto del ejercicio y la tracción muscular sobre los que se hablará más adelante, sino también otros factores mecánicos menos conocidos, por ejemplo, que ante una escoliosis se produce aumento de la densidad ósea en el lugar de la concavidad y pérdida de la misma en la convexidad, más marcado cuanto más cerca del ápex de la curvatura (Adam y Askin, 2009). De esta manera, el hueso también adapta su resistencia al grado de tensión al que se ve sometido.

Al reabsorberse el hueso se liberan en sangre Ca y P y sales alcalinas, lo que confiere al hueso un papel predominante en la homeostasis calcio-fosfórica y del equilibrio ácido-base.

La síntesis ósea es llevada a cabo por los osteoblastos, células mononucleadas derivadas de los preosteoblastos. Este proceso, conlleva la producción en primer lugar de una matriz proteica formada por fibras colágenas, que suponen del 90 al 95% de la misma. Las fibras de colágeno se disponen siguiendo las líneas de fuerza, confiriendo al hueso gran resistencia. De este alto porcentaje de fibras colágenas, el 95% es colágeno tipo I, encontrándose también colágeno III, V y XII. Algunos estudios demuestran la existencia de una anomalía estructural del procolágeno tipo I que

podría justificar casos de osteoporosis grave (Spotila *et al.*, 1994). Estas fibras colágenas se encuentran embebidas en una estructura de mucopolisacáridos, gelatinosa y homogénea, compuesta fundamentalmente por proteoglicanos, sobre todo ácido hialurónico y condroitín sulfato; glicoproteínas (osteocalcina, osteonectina, sialoproteínas y osteopontina, entre otras) y fosfoproteínas, así como factores de crecimiento,

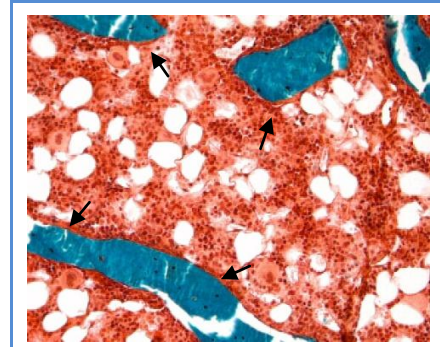
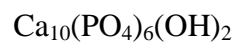


Ilustración 2: Imagen de hueso trabecular de rata obtenida en este estudio en la que puede apreciarse tejido osteoide (flechas).

componiendo todo ello el 5 a 10% restante. Este tejido óseo no calcificado recibe el nombre de *osteoide* (Ilustración 2) y constituye en condiciones normales el 1% del total de área de hueso trabecular. Es obvio que para su síntesis son necesarios aminoácidos para fabricar las estructuras proteicas complejas anteriormente citadas. Finalmente es necesario que esta matriz ósea se mineralice, completándose así la formación de hueso. Una vez mineralizada, el 70% del peso del hueso compacto estará constituido por sales. De estas sales, la principal es la hidroxapatita:



Las fibras de colágeno proporcionan al hueso gran resistencia a la tensión, mientras que las sales lo hacen a la compresión. Esto, añadido al grado de entrecruzamiento existente entre ambos, proporciona una estructura ósea con gran resistencia (Guyton y Hall, 2006a).

El proceso de reabsorción ósea es llevado a cabo por el osteoclasto, célula de origen mesenquimal, emparentada con el macrófago, que alberga una dotación enzimática que le permite destruir por una parte el osteoide, y por otro disolver las sales de fosfato cálcico depositadas.

Mediante estos dos procesos, se renueva cada año un 26% del hueso trabecular y un 3% del cortical. Aunque el hueso cortical constituye un 75% del volumen total, la actividad metabólica es 10 veces mayor en el trabecular, ya que su superficie

representa un 60% del total. Teniendo en cuenta esto, la renovación es de un 5-10% del hueso total al año (Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil *et al.*, 2006b).

Este sencillo esquema comentado nos permite definir la osteopenia, entidad en la que la cantidad de hueso mineralizado por unidad de volumen disminuye, y la osteomalacia, entidad en la cual hay osteoide en exceso sin mineralizar. Lo característico de esta última entidad es precisamente que veamos una proporción de osteoide mayor que la habitual. El equivalente de la osteomalacia en el individuo en desarrollo es el raquitismo, en el cual el proceso de defectuosa mineralización afecta también y sobre todo al cartílago de crecimiento, lo que genera deformaciones óseas importantes.

Es evidente que un descenso de la masa ósea predispone a fracturas por aumento de la fragilidad ósea. Las típicas fracturas de un paciente osteoporótico incluyen la fractura vertebral, la fractura de cadera y la fractura radio distal, hecho que está ampliamente documentado en la literatura. Como es obvio, estas fracturas tienen distinta gravedad.

Si nos referimos a las fracturas de cadera (Ilustración 3), la osteoporosis aumenta el riesgo de sufrirla hasta 1,9 veces por cada desviación estándar, algo menos en mujeres mayores de 79 años (Schott *et al.*, 1998), y un 28% de los pacientes que sufren este tipo de fracturas muere en los seis meses siguientes y hasta un 33% en el primer año (Keene *et al.*, 1993). Esta mortalidad es mayor en hombres que en mujeres y condiciona una reducción en la expectativa de vida de ambos de aproximadamente 6 años (Trombetti *et al.*, 2002). El exceso de mortalidad del paciente con fractura de cadera se observa fundamentalmente como consecuencia de las complicaciones agudas del proceso que incluyen tromboembolismo pulmonar y hemorragia, aparte de las complicaciones propias del paciente añoso hospitalizado o encamado. De los supervivientes, del 15 al 25% va a requerir una institucionalización prolongada y menos del 30% recuperará el



Ilustración 3: Fractura petrocantérica en una paciente osteoporótica.

nivel de funcionalidad que presentaba previo a la fractura (Brunader y Shelton, 2002), con una evidente reducción de la calidad de vida (Lips y van Schoor, 2005).

Muy diferente es la biología de la fractura vertebral, que aunque a veces es clínicamente muy llamativa por el dolor que genera, otras veces se descubre casualmente en una radiografía convencional lateral de tórax indicada por otros motivos. Se afecta inicialmente la estructura trabecular de las vértebras, provocando la deformación y hundimiento del cuerpo vertebral que adquiere una morfología característica, bien en diábolo (vértebra de pez), o bien en cuña anterior (Ilustración 4) o posterior, o bien produciéndose un aplastamiento global de la misma. Por eso en una radiografía lateral de columna se puede definir una escala, denominada *Semicuantitativa de Genant*, que permite el diagnóstico radiológico de estas fracturas y su calificación en leves (grado I), moderadas (grado II) o severas (grado III), mediante medición de las vértebras D4 a L5 y teniendo en cuenta la pérdida de altura global, anterior, media o posterior de la vértebra, en comparación con las adyacentes, o bien consigo misma en estudios anteriores. Cada intervalo de hasta el 20% de reducción de altura supondría un grado en la escala (Hermoso de Mendoza, 2003).

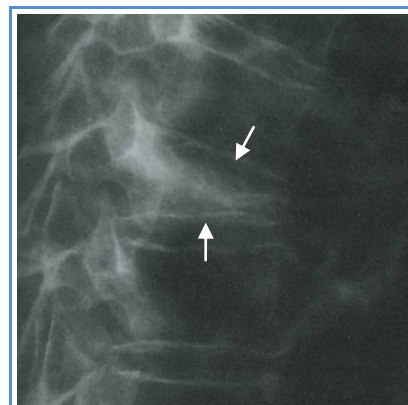


Ilustración 4: Acuñaamiento (flechas) en Fractura Vertebral.

La fractura distal del radio con angulación dorsal (fractura de Colles) ocurre en un 15% de mujeres caucásicas de más de 50 años. Aumenta su incidencia rápidamente a partir de los primeros 5 años tras la menopausia y alcanza su pico



Ilustración 5: Fractura de Colles.

máximo entre los 60 y 70 años. Estas fracturas son dolorosas y requieren inmovilización. La fractura de Colles (Ilustración 5) no tiene una gran repercusión desde el punto de vista socio-sanitario, en comparación con otras fracturas osteoporóticas. No existe un incremento de la mortalidad asociado a este tipo de

fractura; incluso en la mayor parte de los casos el paciente afecto no requiere hospitalización (Maravic *et al.*, 2005).

Dado que la osteopenia predispone a fractura se restringió en un tiempo el concepto de osteoporosis a las situaciones en las cuales aparecía fractura por fragilidad. El hecho de que no todos los individuos osteopénicos sufran fracturas y a la inversa ha hecho que se reconsidere el concepto de osteoporosis tanto desde un punto de vista conceptual como desde un punto de vista de salud pública.

Así, conceptualmente, la osteoporosis se define como una “enfermedad del esqueleto, caracterizada por debilidad ósea y que produce aumento del riesgo de fractura. La resistencia del hueso refleja la integración de dos características fundamentales: la densidad del hueso y la calidad del mismo. La primera es expresada en gramos de mineral por área o volumen y en todo individuo es determinada por el pico de masa ósea y por la pérdida de dicha masa. La calidad del hueso se refiere a su arquitectura, recambio, acumulación de daño (por ejemplo microfracturas) y mineralización” (NIH, 2000). Se introduce por tanto el concepto de *calidad ósea*, según algunos, el parámetro más importante predisponente a fractura. De hecho, algunos índices derivados del estudio ultrasonográfico del hueso se basan más en conceptos cualitativos del hueso que en su cantidad absoluta (Hughes *et al.*, 1999; Strelitzki *et al.*, 1998). Sin embargo, desde un punto de vista de salud pública, el método que actualmente se emplea para definir osteoporosis se basa principalmente en la DMO determinada por *absorción de rayos X de doble energía* (DEXA).

El diagnóstico de osteoporosis y osteopenia se basa en dos índices, el *T-Score* y el *Z-Score*. Para mujeres postmenopáusicas y hombres mayores de 50 años la OMS recomienda el uso del *T-Score*. Para el cálculo de este índice se utiliza la medición por DEXA del cuello femoral –si bien otras localizaciones centrales pudieran ser igualmente válidas–, comparándola con la media de un grupo de adultos jóvenes sanos. Este grupo estaba constituido originalmente por mujeres caucásicas de 20 a 29 años en la publicación de la OMS (WHO, 2004). Más recientemente se han incluido bases de datos de grupos poblacionales de distinto sexo y etnia y edades en torno a los 30 años,

en la que recordemos que se alcanza el máximo pico de masa ósea. Un ejemplo de esto puede verse en revisiones como la de Brunader y Shelton (2002). No obstante, es evidente que el uso de datos obtenidos de poblaciones no estándar puede dar mediciones discordantes de T-score (ISCD, 2006).

Por tanto, en resumen, el T-Score es una puntuación, medida en SD respecto de una población de adultos jóvenes sanos y se corresponde con el riesgo relativo de fractura (WHO, 2004), como puede apreciarse en la Figura 3.

Se considera osteoporótico a un individuo cuando presenta un *T-score* inferior a -2,5 SD; osteopénico, cuando presenta -1 SD sin alcanzar valores de osteoporosis; y normal, cuando presenta menos de -1 SD o incluso un T-Score positivo. Además, existe el concepto de *osteoporosis establecida* cuando presenta un T-score inferior a -2,5 SD y una o varias fracturas por fragilidad (WHO, 2004).

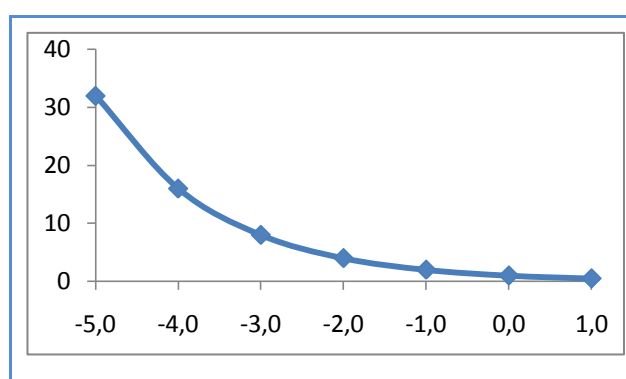


Figura 3: La gráfica muestra el incremento exponencial del riesgo relativo de fractura (ordenadas) y el descenso del T-score (abscisas) (ISCD, 2006).

En mujeres premenopáusicas y poblaciones en general más jóvenes que las mencionadas anteriormente, así como en mediciones de otras regiones anatómicas y en el uso de métodos distintos a la DEXA, la OMS recomienda el uso del *Z-score*, similar al *T-score* pero en comparación con una población que además se encuentra dentro del mismo grupo de edad (WHO, 2004).

Otro método utilizado ampliamente en la actualidad para la medición de la DMO es la *tomografía computerizada cuantitativa* (QTC). Recientemente se ha comenzado a utilizar la ultrasonografía cuantitativa como método de cribado, dada su inocuidad, bajo coste y precisión adecuada para T-scores en torno a -1,5 SD o superiores, perdiendo precisión más allá de estos límites (Brunader y Shelton, 2002; Collinge *et al.*, 2010; Frost *et al.*, 2000).

Como se comentó brevemente antes, en el hueso coexisten dos fenómenos aparentemente opuestos, uno de síntesis y otro de destrucción, de cuyo equilibrio depende que el hueso mantenga sus propiedades físicas, así como su labor en la homeostasis calcio-fosfórica y del equilibrio ácido-base.

La síntesis ósea depende de los *osteoblastos*, células poliédricas grandes, mononucleares, de citoplasma basófilo y aparato de Golgi (AG) y retículo endoplasmático rugoso (RER) muy desarrollados. Estas células provienen de células mesenquimales pluripotenciales procedentes de la médula ósea, endostio, periostio y pericitos perivasculares, que debido a la acción de factores de crecimiento se diferencian en preosteoblastos y finalmente osteoblastos. Ya en etapas tempranas de esta diferenciación el preosteoblasto expresa colágeno tipo I, osteopontina (OPN) y fosfatasa alcalina (ALP), siendo la sialoproteína ósea (BSP) y la osteocalcina (OCN) marcadores de diferenciación a osteoblasto que se expresan al iniciarse la mineralización, lo que las hace útiles como marcadores de osteogénesis y maduración de los preosteoblastos. Los osteoblastos emiten prolongaciones citoplasmáticas hacia la matriz, comunicándose mediante integrinas con la red de osteocitos y con osteoblastos vecinos, (Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil *et al.*, 2006a).

Los osteoblastos sintetizan la matriz osteoide además de todas las proteínas de la matriz, y dirigen la disposición de las fibrillas. La matriz de osteoide se forma a un ritmo de 2-3 μm por día. La membrana plasmática del osteoblasto es muy rica en ALP, que permite la mineralización a un ritmo de 1-2 μm . Esta no es la única contribución que los osteoblastos hacen al remodelado óseo, ya que además de participar en la síntesis de osteoide y su mineralización, secretan factores de crecimiento y también intervienen en la reabsorción llevada a cabo por los osteoclastos mediante la síntesis de citocinas específicas (Simonet *et al.*, 1997).

A medida que los osteoblastos van fabricando la matriz osteoide y propiciando su calcificación, parte de los mismos quedan rodeados y enclaustrados por la matriz ya calcificada, adquiriendo forma estrellada y convirtiéndose en *osteocitos*. Otros, sin embargo, se destruyen por apoptosis o se transforman en células de revestimiento o

lining cells. Tanto los osteocitos como las células de revestimiento representan estadios más avanzados de maduración.

Las células de revestimiento son células elongadas y planas, con núcleo fusiforme y escasas organelas y presentan receptor de hormona paratiroidea (PTH). Se localizan a lo largo de la superficie del endostio, constituyendo con este una capa protectora y jugando un papel importante en la activación del remodelado óseo (Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil *et al.*, 2006a).

Los osteocitos son las células más abundantes del hueso, se encuentran en el interior de las lagunas óseas u *osteoplasmas* y poseen forma estrellada, emitiendo procesos citoplasmáticos que se comunican entre sí a través de conductos denominados calcóforos, que están llenos de fluido óseo extracelular. Tal como se ha comentado, mediante estas prolongaciones los osteocitos se comunican entre sí, formando un sincitio de células interconectadas en una única estructura (Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil *et al.*, 2006a), dicha estructura se denomina *sistema de membranas osteocíticas* y se cree que representa una membrana que separa al propio hueso del líquido extracelular (Guyton y Hall, 2006a).

Los osteocitos también participan en la síntesis y mineralización del tejido óseo pero más como elementos reguladores que como efectores finales. Se postula que su función es la de controlar el remodelado óseo, detectando las variaciones mecánicas de las cargas, fenómeno denominado *mecanotransducción* (Lanyon, 1993).

Las células encargadas de la reabsorción ósea son los *osteoclastos*, células grandes, multinucleadas, ricas en mitocondrias y vacuolas. Contienen fosfatasa ácida tartrato-resistente (TRAP) que permite la defosforilación de proteínas. Presentan además receptores para calcitonina. Estas células provienen de células madre hematopoyéticas medulares formadoras de colonias de granulocitos y macrófagos (CFU-GM) (Mundy, 1993).

Los osteoclastos presentan un borde *en cepillo*, que es donde tiene lugar la reabsorción primero de la matriz proteica y posteriormente de la mineral. También

presentan una zona clara, rica en microfilamentos e integrinas que le sirven de anclaje a la matriz, sellando los bordes del área de contacto con el ribete en cepillo. En el interior de esta zona de sellado (*tight junction*) el osteoclasto secreta protones y enzimas proteolíticas, disolviendo el hueso para que sea reabsorbido (Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil *et al.*, 2006a).

La diferenciación de los osteoclastos está estimulada por una amplia variedad de hormonas y citocinas, entre ellas: factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), calcitriol, PTH, prostaglandinas, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y las Interleucinas 1, 6 y 11 (IL-1, IL-6 e IL-11, respectivamente) (Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil *et al.*, 2006a). Es conocido además que el osteoclasto se diferencia y se activa en respuesta a estímulos procedentes del osteoblasto, por ejemplo, la diferenciación que se produce desde sus precursores, por efecto del M-CSF secretado por osteoblastos, que ya ha sido comentada. Otro ejemplo de la acción del osteoblasto como regulador del osteoclasto es el eje RANK-RANKL-OPG. RANKL (*receptor activator of NF κ B ligand*) es una citocina transmembrana que pertenece a la familia del TNF- α (Lacey *et al.*, 1998) y que se encuentra en la membrana de osteoblastos y preosteoblastos. La interacción de este receptor con su ligando, RANK, que se encuentra en la membrana de osteoclastos y preosteoclastos, produce la diferenciación y activación de los osteoclastos, aumentando por tanto la reabsorción. Por otro lado, la osteoprotegerina (OPG) inhibe los efectos del RANKL. Esto sucede porque la OPG se une a RANKL impidiendo que lo haga RANK. La OPG Es una proteína circulante producida por osteoblastos y preosteoblastos que pertenece a la superfamilia de receptores de TNF (Simonet *et al.*, 1997).

En efecto, osteoblastos y osteoclastos actúan de forma coordinada en las llamadas

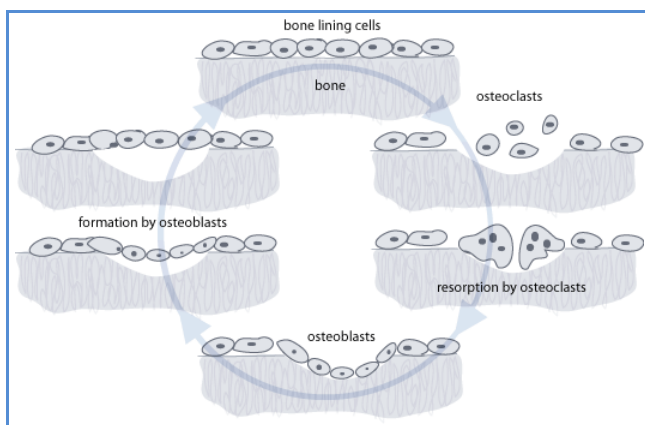


Ilustración 6: Ciclo de remodelado óseo (Philpott, 2006).

unidades de remodelado o unidades básicas multicelulares (BMU). El ciclo de remodelado (Ilustración 6, en la página anterior) se inicia en las células de revestimiento de la superficie ósea, que favorecen la activación de los precursores de los osteoclastos. Los osteoclastos se fijan a la superficie a remodelar por la zona de sellado y mediante la acción de proteasas y protones labran una pequeña cavidad de forma característica conocida con el nombre de *Laguna de Howship*, si se localiza en el hueso trabecular y como *Cono Penetrante*, si lo hace en el cortical. Esta fase dura entre dos y tres semanas. Una vez completada la fase de *reabsorción* los osteoclastos sufren un proceso de apoptosis. Durante la reabsorción se liberan factores de crecimiento contenidos en la matriz, tales como factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), factor de crecimiento insulínico tipo I y tipo II (IGF-1 e IGF-2) y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Estas sustancias, atraen y activan a los preosteoblastos, induciendo además su proliferación. Durante la etapa de formación, los preosteoblastos producen una sustancia cementante sobre la que se adhiere el nuevo tejido y además expresan proteínas morfogenéticas óseas (BMP), responsables de la diferenciación a osteoblastos. Estos sintetizan la matriz osteoide rellenando la cavidad, depositándose en forma de laminillas concéntricas o paralelas, según se trate de hueso cortical o esponjoso, respectivamente. A continuación se produce la fase de *mineralización*, aproximadamente 30 días después del depósito de osteoide y que se prolongará durante 90 días en hueso trabecular y hasta 130 en el cortical. Este proceso comienza a producirse en la interfase entre el hueso preexistente y el osteoide y avanza en un plano de barrido que se denomina *frente de mineralización*. Finalmente, durante un periodo de unas dos semanas, algunos osteoblastos se transforman en células fusiformes (*lining cells*) y tapizan la cavidad; es la llamada fase *inversa*. Tras esta, se inicia de nuevo la fase *quiescente* (Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil *et al.*, 2006a).

1.3 METABOLISMO ÓSEO

1.3.1 Hormona Paratiroidea

El que se active la reabsorción o la síntesis ósea en un momento determinado depende de un fino control hormonal. El aumento de calcemia inhibe esta hormona. Por otra parte, si los niveles de calcemia disminuyen, se produce una estimulación de la hormona paratiroidea (PTH), que activa al osteoclasto en primer lugar, y aumenta su proliferación, condicionando la disolución de las sales de fosfato cálcico y promoviendo de este modo la elevación del calcio sérico, reequilibrándose así el sistema. Se postula que además de este efecto, la PTH activaría al osteocito, provocando que el sistema de membranas osteocíticas bombee calcio desde el *líquido óseo* hasta el líquido extracelular. Esto produciría desmineralización del hueso de inicio más precoz que la producida por efecto de la activación osteoclastica (Guyton y Hall, 2006a).

Algunos autores han hallado un efecto paradójico de esta hormona cuando es administrada en pulsos, produciendo formación de hueso, en lugar de su reabsorción (Pettway *et al.*, 2008; Frolik *et al.*, 2003).

La PTH en el riñón aumenta la reabsorción de calcio en el túbulo distal y disminuye la de fósforo en el túbulo proximal (Ilustración 7). Este aumento de la pérdida de fosfatos hace que el balance final de la fosfatemia sea negativo.

Entre los efectos de esta hormona encontramos que produce un aumento de la producción renal de Calcitriol mediante la hidroxilación renal de la 25-hidroxi-vitamina D

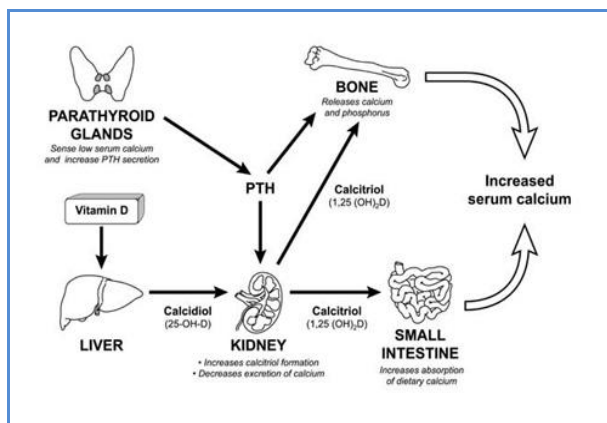


Ilustración 7: Acción de la PTH y de la vitamina D sobre el metabolismo calcio-fosfórico (OSU, 2010).

(Calcidiol). El Calcitriol es la forma más activa de la vitamina D. De esta manera, induce indirectamente un aumento de la absorción intestinal de calcio y fósforo (Guyton y Hall, 2006a).

1.3.2 Vitamina D

La vitamina D₃ o *colecalfiferol* procedente de la dieta y de la síntesis endógena en la piel alcanza el hígado, donde mediante la acción de la *25-hidroxilasa*, se convierte en *25-hidroxicolecalciferol* o *calcidiol* (Ilustración 7, pág. 20), este a su vez inhibe su propia síntesis. Posteriormente el calcidiol es captado por el riñón, donde experimenta una nueva hidroxilación transformándose en *1,25-dihidroxicolecalciferol* o *calcitriol*. Si bien es el calcitriol la forma activa de la vitamina D, se admite actualmente que las reservas de vitamina D del organismo se estiman de forma adecuada midiendo el calcidiol. Recientemente se ha visto que el alcohol, debido a su capacidad para generar mayor cantidad de *especies reactivas de oxígeno* (ROS), inhibe la producción renal de calcitriol (Shankar *et al.*, 2008).

La regulación de la secreción de calcitriol depende de las concentraciones séricas de calcio y fósforo. Cuando disminuye la calcemia, aumenta la secreción de PTH, que a su vez estimula la producción renal de calcitriol; esta a su vez inhibe la formación de PTH, con lo que se cierra el mecanismo de autorregulación. También el propio calcio ejerce un efecto negativo en la producción renal de calcitriol, aunque este es muy discreto. (Guyton y Hall, 2006a). El descenso de la fosfatemia aumenta igualmente la producción de calcitriol, pero esta vez no mediada por la acción de la PTH sino de forma directa.

Sobre el riñón, el calcitriol produce un aumento de la reabsorción tubular de calcio y fósforo. En el intestino promueve el transporte de calcio y de fósforo a través de la mucosa, facilitando su absorción. Sobre el hueso, el calcitriol tiene un efecto dual, y en cierta manera, contrapuesto, ya que por una parte estimula la reabsorción y

por la otra, posibilita la mineralización. Podríamos decir por tanto que es principalmente un agente “remodelador”. Este efecto prorreabsortivo lo ejerce a través de la diferenciación de los preosteoclastos, e indirectamente, a través de los osteoblastos, que activan los osteoclastos maduros. La vitamina D no afecta la expresión de osteoprotegerina (OPG) en el osteoblasto, sin embargo aumenta la de RANKL, aumentando el cociente OPG/RANKL (Tang *et al.*, 2008). En contraste con este efecto, el déficit de vitamina D provoca que la matriz osteoide no se mineralice de forma adecuada, generando osteomalacia. Parece ser que el efecto de la vitamina D sobre la mineralización ósea se ejerce de forma directa sobre el osteoblasto mediante mecanismos genómicos (van Driel *et al.*, 2006). Otros autores sugieren una acción combinada de mecanismos genómicos y no genómicos (Mesbah *et al.*, 2002).

1.3.3 Hormona de crecimiento-Somatomedina C

Existe una acción anabólica mediada en parte por un aumento en la síntesis del *Factor de Crecimiento Insulínico*, también conocido por sus siglas en inglés, IGF-1 (o como *Somatomedina C*). La IGF-1 es la principal hormona involucrada en el crecimiento óseo, tanto que su déficit genera los denominados enanismos “hipofisarios”. Este polipéptido dependiente de la hormona de crecimiento (GH), que es el principal factor inductor de su síntesis en el hígado, produce un aumento en el reclutamiento y la diferenciación de osteoblastos con aumento de la formación de hueso trabecular y disminución de la pérdida de hueso (Marie, 1997), sin embargo este efecto sobre la DMO no es igual para hombres y mujeres en edad avanzada, siendo el efecto positivo mayor sobre las últimas (Karasik *et al.*, 2002; Langlois *et al.*, 1998).

La acción de la IGF-1 se expresa tanto sobre el cartílago de crecimiento (Tirapegui *et al.*, 1993), como sobre el remodelado, asociándose a un aumento de masa ósea, tal como se ha comentado. Este efecto, lo ejerce probablemente mediante acción directa sobre los osteoblastos. También favorece el aumento de calcitriol,

aparentemente mediante un aumento de la actividad de la α -1-hidroxilasa (Bianda *et al.*, 1998).

1.3.4 Calcitonina

Se trata de un polipéptido secretado por las *células parafoliculares* o *células C* del tiroides en respuesta a la elevación de la concentración sérica del calcio. Tiene un efecto opuesto al de la PTH en la regulación del calcio sérico, aunque cuantitativamente menos importante. Esta regulación sucede al menos por dos mecanismos: en primer lugar, produce un bloqueo de la actividad de los osteoclastos y posiblemente también del efecto osteolítico de la membrana osteocítica, favoreciendo el depósito de sales de calcio; en segundo lugar, inhibe la reabsorción ósea mediante una disminución de la proliferación de los preosteoclastos. Este efecto es transitorio, ya que la inhibición y disminución del número de osteoclastos termina por producir también disminución del número de osteoblastos y de su actividad, disminuyendo la capacidad para fijar el calcio. Esto sucede tras unas horas o como mucho, algunos días (Guyton y Hall, 2006a).

La calcitonina aumenta la excreción urinaria de calcio y fósforo, si bien este efecto es cuantitativamente poco importante y transitorio (Pocock y Richards, 2005). Esta hormona también ejerce un efecto opuesto a la PTH y de escasa relevancia en la absorción intestinal de calcio.

Existen estudios que señalan un efecto positivo de la ingestión de alcohol sobre la secreción de calcitonina (Keiver y Weinberg, 2003; Wells, Jr. *et al.*, 1975), aunque otros autores no encuentran relación entre los mismos (Sripanyakorn *et al.*, 2009; Sampson *et al.*, 1998). Sin embargo, existe un efecto directo hipocalcemiante del alcohol (Krishnamra y Limlomwongse, 1983), que podría justificar un incremento inicial en los niveles de esta hormona.

1.3.5 Hormonas sexuales

Tanto los andrógenos como los estrógenos desempeñan un papel fundamental en la maduración del esqueleto y en la prevención de la pérdida de hueso (Chen *et al.*, 2010b). Los estrógenos actúan de manera directa sobre las células óseas mediante antagonización de RANK, disminuyendo el número y actividad de los osteoclastos (Yamaguchi y Weitzmann, 2009) y también, mediante receptores estrogénicos en los osteoblastos (Maru *et al.*, 2009), en los cuales incrementan la liberación de IGF-1, TGF- β (Joo *et al.*, 2004) y PGE₂ (Bakker *et al.*, 2005; Tsai *et al.*, 2004). El primero tiene un conocido efecto positivo sobre la formación ósea (Marie, 1997), sin embargo, los otros dos presentan resultados controvertidos, ya que hay estudios que señalan que presentan también efectos proreabsortivo (Suh *et al.*, 2003; Horowitz y Lorenzo, 1996). El papel protector de los estrógenos podría ser también consecuencia de su capacidad para disminuir la liberación por parte de las células mononucleares de citocinas como la IL-1, IL-6 y TNF- α (Horowitz, 1993), inductores de la diferenciación osteoclástica, lo que inhibiría la reabsorción del hueso. La IL-1 y la IL-6 poseen capacidad de activar la maduración de osteoclastos, además, la IL-1 favorece la producción de IL-6 por los osteoblastos (Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil *et al.*, 2006b; Manolagas y Jilka, 1995), y el TNF- α , que además de inducir la diferenciación de los osteoclastos por acción directa sobre sus precursores (Ragab *et al.*, 2002), también produce un aumento en la reabsorción al estimular la producción de IL-1 e IL-6 (Feldmann y Maini, 2001). El aumento de la reabsorción ósea producido por un déficit de estrógenos conduce a un aumento de la calcemia que da lugar a una serie de adaptaciones sistémicas como la disminución de la PTH, de la síntesis renal de vitamina D y de la absorción intestinal de calcio, que contribuye a aumentar todavía más la pérdida de masa ósea.

Por otro lado la administración de andrógenos produce un incremento de la secreción de calcitonina y de la síntesis de calcitriol; la respuesta

Estimuladores de la reabsorción	IL-1 TNF- α IL-6	IL-11 IL-15 IL-17
Inhibidores de la reabsorción	IL-4 IL-10 IL-13	IL-18 IFN- γ
Ambos efectos	TGF- β PG	

Tabla 1: Citocinas y factores de crecimiento y su papel en la reabsorción (Lorenzo, 2000).

de la calcitonina a la hipercalcemia está claramente descendida en pacientes con hipogonadismo (Isaia *et al.*, 1992).

1.3.6 Otras hormonas

Otras hormonas que no van a ser analizadas en el presente estudio juegan también un papel sobre el remodelado óseo. Destacan en este sentido los glucocorticoides, que actúan como moduladores de este proceso. Sin embargo a dosis suprafisiológicas inducen pérdida ósea. Inhiben directamente a los osteoblastos, células con receptores específicos para ellos. Este efecto es mediado en gran parte por el sistema RANKL-RANK-OPG (Swanson *et al.*, 2006).

La insulina estimula la síntesis de la matriz ósea directa e indirectamente a través de la síntesis hepática de IGF-1 (Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil *et al.*, 2006b), esta última ejerce una acción no solo sobre la síntesis ósea sino también sobre RANKL, activando los osteoclastos (Rubin *et al.*, 2002). Las hormonas tiroideas ejercen un papel fundamental sobre la formación de la matriz osteoide, mediante la acción de osteoblastos, ya que favorecen la síntesis hepática de IGF-1. Por otra parte, sobre el hueso estimulan la actividad osteoclástica y aceleran la velocidad del recambio óseo (Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil *et al.*, 2006b).

1.3.7 RANK-RANKL-OPG

Parece ser que el mediador final común de la función osteoclástica pasa por la activación del RANK, expresado en células precursoras de los osteoclastos. El activador fisiológico del RANK es el RANKL, expresado por el osteoblasto y células del estroma de la médula ósea (Nakagawa *et al.*, 1998). La síntesis de RANKL por parte del osteoblasto está modulada por una serie de factores hormonales como los corticoides y el calcitriol, 17- β -Estradiol (Yamaguchi y Weitzmann, 2009) e interleucinas como TGF- β

(Hase *et al.*, 2008), IL-6, IL-1 β , TNF- α y prostaglandinas (Vega *et al.*, 2007). Pero al mismo tiempo que RANKL, los osteoblastos producen OPG, que es un receptor trampa para RANKL, ya que uniéndose a él, impide la unión del mismo al RANK, con lo que el osteoclasto no se activa y por lo tanto el hueso queda “protegido”. Parece incluso que el equilibrio RANK-RANKL-OPG es el auténtico modulador del remodelado óseo. De hecho, hormonas que activan el RANKL, como por ejemplo el calcitriol inhiben al mismo tiempo a la OPG (Vega *et al.*, 2007). En la Figura 4 podemos observar en un sencillo esquema el funcionamiento de este complejo sistema.

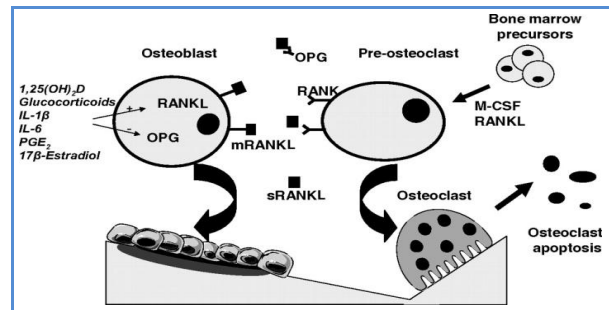


Figura 4: Eje RANK-RANKL-OPG y factores que intervienen en su regulación (Vega *et al.*, 2007).

1.3.8 Factores mecánicos

Los osteocitos juegan un papel fundamental en los procesos de remodelado secundarios a variaciones en la carga mecánica. El osteocito, como antes comentamos, queda embebido en la matriz ósea sintetizada por el osteoblasto, configurándose como una célula con grandes prolongaciones alojadas en los conductos calcíforos. Estas prolongaciones forman una especie de red de receptores sensibles a las variaciones de carga, que al ser estimulados enviarían señales a osteoblastos y osteoclastos (Adachi *et al.*, 2009), convirtiendo el estímulo mecánico en una cascada de señales que en última instancia promueven la osteogénesis o la reabsorción del hueso. Es preciso tener en cuenta que estos mecanismos constituyen la base de la cirugía de elongación de huesos largos (osteotaxis), utilizada en pacientes acondroplásicos, y también explican que el IMC sea un factor determinante de primer orden de la masa ósea. La delgadez y la pérdida de peso tienen un efecto negativo sobre la misma. De hecho, el peso en la mujer es probablemente el mayor determinante de la masa ósea, por delante incluso la situación hormonal en la que se encuentre (pre, peri o postmenopausia) (Rico *et al.*, 2002). El peso y el índice de masa

corporal pueden explicar una proporción sustancial de la variabilidad en la densidad mineral ósea a lo largo de la vida tanto en hombres como en mujeres, pero este efecto es mucho menor en los primeros (Felson *et al.*, 1993).

Otros factores de tipo mecánico como la inmovilización, la debilidad muscular o la ingravidez ejercen un efecto negativo sobre la masa ósea. Valimaki (1994) y su grupo apreciaron, en un estudio realizado en 264 sujetos entre 9 y 18 años a los que siguieron durante 10 años, que el ejercicio por sí solo condicionaba un aumento significativo de la DMO en cuello femoral, tanto en hombres como en mujeres, y en columna lumbar en hombres. En este estudio el peso, el ejercicio, el tabaquismo y la edad poseían un efecto independiente sobre la densidad mineral ósea y explicaban una variabilidad en la DMO del 38% en mujeres y del 46% en hombres. Bendavid *et al.* (1996) encuentran un efecto positivo del ejercicio físico –y la ingesta adecuada de calcio– al disminuir la pérdida ósea relacionada con la edad en individuos entre 50 y 64 años. La DMO se ha correlacionado de forma positiva con la fuerza muscular a diferentes niveles: tríceps, bíceps, rectos abdominales (Huuskonen *et al.*, 2000) y con la masa muscular (Visser *et al.*, 1998). Pero el ejercicio no ha mostrado efectos beneficiosos o protectores sobre los cambios histomorfométricos inducidos por el alcohol sobre el hueso (Reed *et al.*, 2002).

2. OSTEOPATÍA DEL ALCOHÓLICO

2.1 EPIDEMIOLOGÍA Y CONCEPTOS GENERALES

El consumo de alcohol constituye un problema para la salud pública, existiendo una relación entre el consumo de esta sustancia y el daño para la salud, con importantes consecuencias. Estas consecuencias alcanzan más allá de la esfera sanitaria, ya que no solo se produce un aumento de la morbilidad y la mortalidad debido a numerosas enfermedades, sino también a accidentes de tráfico, laborales y

episodios de violencia. Los datos oficiales arrojan una cifra de 12.032 muertes atribuibles al alcohol en España en 1997 (Sánchez-Pardo *et al.*, 2003).

En las Islas Canarias, el promedio de muertes por causas relacionadas con el alcohol entre 1980 y 1998 fue del 6,4%, oscilando entre el 7,3% en 1980 y el 5,5% en 1998. La relación entre hombres y mujeres fue de aproximadamente 2:1 todos los años, coincidiendo con los resultados de estudios americanos, europeos o nacionales. Con similar metodología se observó en España en el periodo 1981-1998 un promedio de 6,3% fallecimientos por año y en EE.UU. de un 5% en 1988 (Bello *et al.*, 2003).

El consumo de alcohol en España siempre ha tenido una presencia importante. No obstante, esta se ha visto incrementada en las últimas décadas como consecuencia de la incorporación de nuevos grupos de consumidores: adolescentes, jóvenes y mujeres. Este incremento en la ingesta de alcohol de la población española se debe en gran medida a la alta tolerancia social existente en España hacia estas sustancias (Sánchez-Pardo *et al.*, 2003).

Según los datos obtenidos por la Encuesta Domiciliaria sobre Drogas 1999, realizada por la Delegación de Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas, el 87,1% de los ciudadanos españoles entre 15 y 65 años de edad ha consumido alcohol a lo largo de su vida, el 46,7% lo hicieron durante la última semana y el 13,7% consume diariamente. En España, un 6% de la población mayor de 15 años abusa del alcohol (*high drinkers*, excesivos y de gran riesgo). Según la Sociedad Española de Medicina de Familia y Comunitaria un 12-19% de la población mayor de 14 años consume cantidades de alcohol elevadas. Según datos oficiales, entre el 15-20% de las consultas de Atención Primaria se relacionan con el alcohol. Un 4% de los ingresos en hospitales españoles y un 20% de las consultas en los mismos se atribuyen también al consumo de alcohol (Sánchez-Pardo *et al.*, 2003).

A pesar existir cada vez menos diferencia de consumo de alcohol entre hombres y mujeres, en especial en edades tempranas, el consumo diario de alcohol sigue siendo predominantemente en varones, entre los cuales el 21% consume diariamente, frente

a las mujeres, que lo hacen en solo el 6,2% de los casos. El consumo diario de alcohol alcanza su máxima prevalencia en ambos sexos entre los 40 y 60 años, edad en la que recordemos, la masa ósea ha comenzado su descenso hasta la senectud. No obstante, el consumo diario de alcohol entre los jóvenes no es despreciable, y progresivamente va rompiendo la barrera del fin de semana (Sánchez-Pardo *et al.*, 2003).

La edad de inicio para el consumo experimental de alcohol se sitúa en 13,4 años en chicos y 13,6 años en las chicas, estableciéndose el consumo semanal de alcohol a una edad promedio de 14,8 años sin que existan diferencias entre ambos sexos. Además es de destacar la gran prevalencia de este consumo entre los adolescentes españoles, ya que el 76% de los estudiantes de secundaria entre 14 y 18 años ha consumido alcohol alguna vez a lo largo de su vida y el 58% lo hizo en los 30 días previos a la entrevista. Un 39,7% de los jóvenes ha llegado a niveles de intoxicación etílica, más frecuente conforme aumenta el grupo de edad, llegando al 65,5% de los individuos de 18 años y hasta el 20,6% reconocen haberse emborrachado en el último mes, un promedio de 1,3 veces (1,5 los chicos y 1,2 veces las chicas).

Como podemos ver, el consumo de esta sustancia no es en absoluto despreciable en nuestro país –ni tampoco a nivel global–. Además, tal como se ha comentado, el alcohol es un factor de disminución de la masa ósea. Si a esto añadimos la elevada frecuencia de consumo en una población cuyo esqueleto se encuentra aún en desarrollo y que no ha alcanzado el pico de masa ósea (Turner *et al.*, 2001), nos encontramos con un problema sanitario de primer orden.

El consumo excesivo de alcohol constituye una causa importante de osteoporosis y de fracturas óseas en el adulto (Feitelberg *et al.*, 1987). El alcohólico crónico padece osteoporosis y existen suficientes datos que permiten afirmar que se debe a un efecto tóxico directo del alcohol, potenciado por el déficit de micro o macronutrientes que acompaña a estos pacientes (Santolaria *et al.*, 2000a). Algunos estudios apoyan que la ingesta moderada de alcohol tiene un efecto beneficioso sobre el hueso, en especial en mujeres ancianas (Feskanich *et al.*, 1999; Baron *et al.*, 2001). Este efecto beneficioso podría deberse a una inhibición de la iniciación del remodelado óseo, que

está acelerado en la menopausia (Turner *et al.*, 2001), o a los efectos de polifenoles antioxidantes presentes en ciertas bebidas como el vino (Scalbert *et al.*, 2005b), hecho que incide en el papel de los ROS sobre la actividad osteoblástica, aunque no todo el efecto beneficioso de los polifenoles se deba a su efecto antioxidante (Scalbert *et al.*, 2005a). No obstante no debe pasarse por alto que estos estudios son observacionales y por tanto puede haber gran cantidad de factores de confusión. Así, al revés de lo que ocurre en nuestro medio (o al menos ocurría hasta hace poco) el consumo moderado de alcohol por parte de la población femenina de edad madura se relaciona más bien con un nivel socioeconómico medio-alto, asociándose con frecuencia a mayor atención hacia la propia salud, más ejercicio y el consumo de una dieta más equilibrada. Tal vez estos hechos justifiquen las asociaciones comentadas antes, ya que existen datos clínicos y experimentales que vinculan de forma indudable al alcohol con la lesión ósea.

El alcohólico crónico padece múltiples fracturas y sin duda en ellas influyen también otros factores, como malnutrición calórico-proteica, propensión a los traumatismos, vida pendenciera, consumo de tabaco, etc. El tabaco parece que ejerce su efecto tóxico directamente sobre las células óseas, pero además provoca un aumento del metabolismo hepático de los estrógenos y se asocia a una menopausia precoz. El tabaquismo, y concretamente los años de consumo más que la cantidad consumida, aumenta el número de fracturas de cadera en mujeres postmenopáusicas (Baron *et al.*, 2001). Igualmente el consumo de tabaco en hombres de mediana edad se asocia a disminución de la masa ósea (Bendavid *et al.*, 1996) y en la adolescencia y en los primeros años de la vida adulta es un predictor independiente del pico de masa ósea para hombres, no así para mujeres (Valimaki *et al.*, 1994). En un estudio llevado a cabo en 30.000 personas, el tabaco se mostró como factor de riesgo independiente de fracturas de cadera, siendo el responsable del 19% de las fracturas observadas, sin apreciarse diferencias en cuanto a género. Sin embargo, el cese del consumo de tabaco redujo el riesgo de fractura en los hombres a los 5 años mientras que el efecto negativo fue más duradero en el sexo femenino (Hoidrup *et al.*, 2000). Un meta-análisis reciente demuestra que el tabaquismo provoca un aumento del riesgo de

fracturas que es sustancialmente mayor que el explicado por la disminución de la DMO (Kanis *et al.*, 2005b).

No solo el tabaco juega un papel importante en la osteopatía del alcohólico crónico. La pérdida de masa ósea durante la vida de estos pacientes guarda relación también con la escasa ingesta de calcio y el descenso de vitamina D (Huuskonen *et al.*, 2000) y el tipo de vida del alcohólico (Santolaria *et al.*, 2000a).

Como veremos a continuación, son tantos los factores involucrados, que actualmente debe considerarse la osteopatía alcohólica como una entidad en sí misma, multifactorial y de gran trascendencia social y sanitaria.

El primer hecho a tener en cuenta es que en el alcohólico coexisten varios factores, dependientes en última instancia del consumo de etanol pero aparentemente no relacionados. Así a medida que el alcohólico se hace dependiente del etanol, tiende a marginarse socialmente, rompe vínculos familiares y deja de alimentarse de forma adecuada. En un estudio llevado a cabo en el HUC se comprueba claramente como a mayor intensidad de alcoholismo, mayor grado de marginalidad, y cómo el consumo de grandes cantidades de alcohol hace que el paciente literalmente “olvide” comer, o lo haga en bares o tabernas, habitualmente en forma de tapas o bocadillos y en muchas ocasiones una única vez al día. Por lo tanto, la malnutrición calórico-proteica va a contribuir en gran medida a la enfermedad ósea de estos pacientes (Santolaria *et al.*, 2000b). Estas observaciones permitieron que ya Oppenheim (1977), acuñara el término *Battered Alcoholic Syndrome*, que podríamos traducir como “síndrome del alcohólico vapuleado”, término que empleó para designar a aquellos alcohólicos con tres o más fracturas en distinto estadio evolutivo y que traducían por un lado la “mala calidad” del hueso del alcohólico y su propensión a pendencias y traumatismos. Además hay que añadir el posible efecto de enfermedades asociadas al consumo crónico de alcohol, como pancreatitis crónica y cirrosis hepática, que van a contribuir, produciendo alteración hormonal y malabsorción secundaria, a la desnutrición de estos pacientes. A todo esto se suma la alteración de micronutrientes, alguno de los cuales se estudian en el presente trabajo

y cuyo efecto sobre metabolismo óseo es mucho peor conocido. Analizaremos por separado los efectos de cada uno de los factores reseñados.

El etanol no solo induce cambios sobre el metabolismo y la histomorfometría ósea cuando es ingerido de forma continua y mantenida sino incluso tras intoxicaciones agudas (Diez *et al.*, 1997). La duración del consumo abusivo de alcohol se asocia de manera directa con la gravedad de la osteopenia (Pumarino *et al.*, 1996) e independientemente de si este consumo se inicia o no antes de finalizar el desarrollo esquelético (Hogan *et al.*, 2001). Tradicionalmente la presencia de fracturas múltiples se ha asociado a alcoholismo. Tras las observaciones pioneras de Saville y Lieber (Saville, 1965), quienes ya encuentran que el hueso del alcohólico tiene características similares al hueso del anciano, y el ya citado trabajo de Oppenheim, quien observó que el 62% de los pacientes que eran atendidos en un hospital con tres o más fracturas en distinto estadio evolutivo eran alcohólicos, se despierta un interés creciente por el estudio en profundidad de la osteopatía de estos pacientes. Lindsell *et al.* (1982) compararon la frecuencia de fracturas costales en pacientes con enfermedad hepática alcohólica y no alcohólica frente a controles. Los alcohólicos presentaron fracturas costales en un 28% de los casos, fracturas que además eran bilaterales y múltiples y se diferenciaban de manera significativa del resto de los grupos. La presencia de fracturas costales en pacientes con enfermedad hepática era un marcador de alcoholismo con un 95% de especificidad y un 28% de sensibilidad. Un resultado parecido ha sido referido por nuestro grupo recientemente (González-Reimers *et al.*, 2005b). En efecto, estudios amplios han identificado al consumo de alcohol como factor de riesgo significativo de fracturas en hombres (Kanis *et al.*, 1999). Un estudio llevado a cabo sobre una población de más de 16.000 personas ha puesto de manifiesto que la ingesta de alcohol mayor de 2 unidades/día se asocian tanto en hombres como en mujeres a un aumento significativo del riesgo de cualquier tipo de fracturas, osteoporóticas o no, y de fracturas de cadera, y que este riesgo es ligeramente mayor en los hombres, aunque no significativo (Kanis *et al.*, 2005a).

2.2 FISIOPATOLOGÍA DE LA OSTEOPATÍA DEL ALCOHÓLICO

En la década de los 80 se publican varios estudios en los que se analiza histológicamente la lesión ósea en alcohólicos. Se llega así a la conclusión de que la lesión predominante en el alcohólico es osteoporosis y no osteomalacia (Diamond *et al.*, 1989b; Jorge-Hernández *et al.*, 1988; Peris *et al.*, 1992; González-Calvín *et al.*, 1993; Schnitzler *et al.*, 2010), aunque esta forma de osteopatía metabólica es encontrada también por algunos en una pequeña proporción de sus series (Lalor *et al.*, 1986).

2.2.1 Desequilibrio del recambio óseo

La osteoporosis refleja un desequilibrio entre síntesis y reabsorción de hueso. Existe evidencia de que el alcohol induce osteoporosis mediante alteraciones tanto de la producción como de la reabsorción ósea, todo lo cual provoca una disminución del volumen óseo, del grosor y número de las trabéculas del hueso esponjoso y de la densidad ósea (Bikle *et al.*, 1985; Sampson *et al.*, 1998; Diamond *et al.*, 1989a; Diamond *et al.*, 1989b; Dyer *et al.*, 1998).

El deterioro de la formación ósea mediado por el alcohol es dosis dependiente (Turner *et al.*, 2001). El efecto tóxico del alcohol sobre el tejido óseo se debe entre otras causas a cambios en la fluidez de las membranas celulares de las células óseas (Farley *et al.*, 1985), pero sobre todo a un efecto inhibitorio sobre el remodelado no mediado por hormonas calciotropas (Bikle *et al.*, 1993) y sobre la proliferación de osteoblastos (Klein y Carlos, 1995), y a una defectuosa mineralización (Turner *et al.*, 1987). El deterioro de la proliferación osteoblástica del que hablamos podría obedecer a una alteración en el metabolismo de las poliaminas inducido por el alcohol (Klein y Carlos, 1995). Wang *et al.* (2003) sostienen que el consumo abusivo y prolongado de alcohol *per se* produce adipogénesis y disminuye la osteogénesis en el estroma de la medula ósea. Otros estudios han demostrado reducción en la síntesis de ADN y proteínas en los osteoblastos expuestos a etanol (Friday y Howard, 1991). Es posible

que el estrés oxidativo pueda jugar también un papel (Chen *et al.*, 2010a). Como comentaremos al hablar del hierro, así como de otros oligoelementos, el efecto prooxidante no tiene porqué ser necesariamente un efecto directo del etanol *per se*, sino que puede ser ejercido por los cambios inducidos por el alcohol sobre el contenido de distintos oligoelementos, asociados con la lesión oxidante. Un exceso de ROS puede alterar estructuras lipídicas (peroxidación lipídica), proteínas de cualquier clase, incluyendo enzimas, o ADN (Cederbaum *et al.*, 2009; Wu y Cederbaum, 2009; Sergent *et al.*, 2001). Por lo tanto es posible que la lesión oxidante altere el ADN (Mansouri *et al.*, 1999) y reduzca los procesos de síntesis. En este sentido, Kim *et al.* (2006) encuentran en ratas que el alcohol aumenta la lesión del ADN por mecanismo oxidativo en varios órganos, producida por un oxidante como el isofluorano.

El descenso de la síntesis ósea se refleja en los niveles séricos de marcadores bioquímicos, derivados de la actividad osteoblástica. Diamond *et al.* (1989b) mostraron cómo la ingesta crónica de alcohol provocaba una disminución en la síntesis de osteoide, que se reflejaba en unos niveles bajos de la proteína GLA (posteriormente identificada como osteocalcina). Muchos autores, más tarde, han encontrado disminución de los niveles de osteocalcina en alcohólicos –no cirróticos– en activo (Lindholm *et al.*, 1991; Laitinen *et al.*, 1993; González-Calvín *et al.*, 1993; Díez *et al.*, 1994). Las alteraciones de la osteocalcina son al parecer muy sensibles al efecto del etanol, incluso si se administra de forma aguda. Así, García Sánchez *et al.* (1995) encuentran niveles séricos de osteocalcina disminuidos en individuos sanos sometidos a una única dosis de alcohol. De la misma manera, la abstinencia de alcohol por un corto periodo ya tiende a normalizar los niveles de osteocalcina. Peris *et al.* (1992) demuestran que los niveles de osteocalcina aumentan de forma paralela a los días de abstinencia, resultado concordante con lo de González-Calvín *et al.* (1993), quienes demuestran una recuperación de los niveles de osteocalcina tras siete días de abstinencia. En un estudio reciente, en el que citábamos a los pacientes seis meses después de una primera evaluación, observamos cómo aquellos que habían dejado de beber presentaban recuperación marcada de los niveles de osteocalcina en comparación con aquellos que seguían bebiendo (Alvisa-Negrín *et al.*, 2009). Este

resultado es paralelo al descrito por Peris *et al.* (1994) en alcohólicos tras dos años de abstinencia. Por tanto, parece claro que el alcohol inhibe la síntesis ósea.

El efecto del alcohol sobre la destrucción ósea es más controvertido. Por una parte, hay autores cuyos hallazgos sostienen que existe en estos pacientes un aumento de la reabsorción ósea (Schnitzler y Solomon, 1984; Dai *et al.*, 2000; Turner *et al.*, 1987). Los ya citados Schnitzler y Solomon encontraron niveles elevados de telopéptido en sus pacientes, y Dai *et al.* que el alcohol, por medio de la IL-6, induce la activación del RANKL, provocando un incremento de la actividad osteoclástica. Por otro lado, hay indicios de que el alcohol induce una osteoporosis de bajo recambio, asociándose la defectuosa síntesis a una disminución –a dosis bajas– de la reabsorción de hueso (Turner *et al.*, 2001). Algunos autores encuentran también bajo recambio óseo, especialmente si actúa de forma concomitante la malnutrición calórico-proteica (Molina-Pérez *et al.*, 2000; Bourrin *et al.*, 2000b).

Tal vez la disparidad de criterios con respecto a la reabsorción ósea, incrementada o no, en pacientes alcohólicos, obedezca al parámetro utilizado para determinarla. Por ejemplo se sabe que los niveles de telopéptido reflejan también el metabolismo de la colágena hepática, al igual que la excreción urinaria de hidroxiprolina (Guañabens *et al.*, 1998). Aunque otros autores, como VanderJagt *et al.* (2007) no encuentran correlación entre enfermedad hepática y metabolismo óseo en pacientes cirróticos –alcohólicos o no–, y encuentran aumento de telopéptido en hombres pero no en mujeres. En cualquier caso, la deoxipiridinolina es un marcador más fiable de la reabsorción ósea (Lenora *et al.*, 2007), aunque los resultados continúan siendo dispares, como demuestran los hallazgos de George *et al.* (2009) y Crawford *et al.* (2003), que encuentran un aumento de la destrucción ósea (evaluada mediante deoxipiridinolina) en pacientes afectados de cirrosis hepática; o los resultados de Kim *et al.* (2003), que no encuentran diferencias significativas en la excreción de deoxipiridinolina entre alcohólicos no cirróticos y controles.

En resumen, aunque una mayoría de autores encuentra que la reabsorción ósea está aumentada en alcohólicos, hay menor consenso que en lo que respecta a la síntesis, que desde luego está disminuida.

2.2.2 Alteración del metabolismo calcio-fosfórico

La homeostasis mineral en los alcohólicos también está afectada: el alcohol aumenta la excreción urinaria de calcio, magnesio y zinc (Rico, 1990). Hay algunos hechos que conviene comentar brevemente antes de desarrollar este punto. Primero, es bien sabido que el alcohol es capaz de producir malabsorción de vitamina D, ya sea asociada a esteatorrea y/o a déficit intraluminal de sales biliares (Pitts y Van Thiel, 1986). Por otro lado, hay que comentar que no existe un consenso claro de resultados en lo que respecta a la PTH, que en muchos estudios no varía (García-Valdecasas-Campelo *et al.*, 2006), en otros desciende (García-Sánchez *et al.*, 1995; Diez *et al.*, 1994) y en otros aumenta (Feitelberg *et al.*, 1987).

En términos generales, encontramos que la administración aguda de alcohol produce hipocalcemia (Keiver *et al.*, 2005; García-Sánchez *et al.*, 1995) por mecanismos poco conocidos, si bien se ha sugerido que pueda deberse a un efecto antagónico sobre la PTH (Thomas *et al.*, 1990; Peng y Gitelman, 1974); también se produce hipercalciuria y descenso de la PTH (Laitinen y Valimaki, 1991; García-Sánchez *et al.*, 1995). Sin embargo, en el consumo crónico de alcohol la PTH puede encontrarse elevada (Laitinen y Valimaki, 1991), si bien no todos los autores coinciden (Rico, 1990). Por otra parte, en estos pacientes encontramos niveles bajos de calcitriol (Laitinen y Valimaki, 1991), producidos probablemente por la conjunción de distintos factores, como son: déficit de ingesta (Santolaria *et al.*, 2000a; Manari *et al.*, 2003), malabsorción, escasa exposición solar (Sampson, 1997) –particularmente en países con escasa insolación–, ya que el estilo de vida del alcohólico no favorece la síntesis cutánea de esta vitamina; hipoalbuminemia (Pitts y Van Thiel, 1986), o como

consecuencia de un déficit en su metabolismo hepático (Rico, 1990) o renal, ya que el alcohol inactiva la 1-hidroxilasa renal e induce la 24-hidroxilasa (Shankar *et al.*, 2008), un metabolito inactivo. Aparte del déficit de vitamina D y el aumento de PTH, debemos añadir también malabsorción y descenso de la ingesta de calcio (Manari *et al.*, 2003) como factores que tienden a disminuir el ingreso de calcio en el organismo y a aumentar su eliminación. Es decir, por un lado se ingiere menos calcio, que además se absorbe peor por la propia malabsorción y por el déficit de vitamina D. La PTH extrae calcio del hueso, tal como se ha comentado con anterioridad, no solo a través de la vitamina D —que en este caso está descendida—, sino mediante acción directa sobre el osteocito (Guyton y Hall, 2006a). El déficit de vitamina D produce aumento de la excreción renal de calcio. Todos estos factores contribuyen al desequilibrio del metabolismo calcio-fosfórico.

También en alcohólicos es frecuente observar déficit de magnesio (Abbott *et al.*, 1994), incluso con niveles normales de magnesemia, que representa tan solo un 1% del total de magnesio corporal, constituyendo un mal indicador. Este déficit de magnesio del paciente alcohólico es de origen multifactorial, y entre sus causas encontramos: malnutrición, malabsorción, diarrea crónica, déficit de vitamina D (Pitts y Van Thiel, 1986) y, principalmente, por aumento de las pérdidas renales por efecto directo del etanol (Pitts y Van Thiel, 1986; Abbott *et al.*, 1994). Este descenso de magnesemia inducido por etanol, si es leve, puede actuar estimulando la PTH y favoreciendo por tanto la desmineralización del hueso (Escalante *et al.*, 2003). Si el descenso es marcado se produce una resistencia periférica a la acción de la PTH (Escalante *et al.*, 2003; Abbott *et al.*, 1994; Quitterer *et al.*, 2001), que contribuye a la hipocalcemia. Podemos observar que las alteraciones de este ion divalente son prácticamente un espejo de las del calcio, ya comentadas con anterioridad.

2.2.3 Alteración de otros ejes hormonales

El alcohol no solo provoca cambios en las hormonas calciotropas sino también afecta a otros ejes hormonales los cuales a su vez pueden verse implicados en el metabolismo óseo. Por ejemplo, estimula al eje adreno-hipófiso-hipotalámico, actuando sobre la hipófisis y el hipotálamo e incrementando la secreción de ACTH (Sommer *et al.*, 1996), o desacoplando su circuito de retroalimentación, llegando a producir síndrome de Cushing, si bien esto es infrecuente (Kirkman y Nelson, 1988), con la consiguiente elevación de las concentraciones de corticoides, cuyo efecto negativo sobre el hueso es conocido (Hodgson, 1990). Por otra parte, el hipogonadismo masculino está bien documentado como efecto del alcoholismo crónico (Noth y Walter, Jr., 1984). El efecto de las hormonas sexuales sobre el metabolismo óseo, alteradas bien por cambios en su metabolismo hepático, bien por atrofia testicular debida a un efecto tóxico directo del etanol sobre los testículos (Bacon, 2008), ya ha sido comentado con anterioridad; aunque algunos estudios, como el de Sampson (1998), sugieren que no son las alteraciones producidas en las hormonas sexuales los principales agentes causales de los cambios óseos observados en el alcohólico, ni tampoco lo son las alteraciones producidas sobre hormonas calciotropas.

Parece ser que el tiroides es relativamente resistente a los efectos del etanol, si bien pueden encontrarse anormalidades moderadas con cierta frecuencia en presencia de hepatopatía alcohólica (Noth y Walter, Jr., 1984)

2.2.4 Citocinas

Es importante considerar que el alcohólico presenta un aumento de permeabilidad intestinal, que es mayor en presencia de hipertensión portal (Llamas *et al.*, 2009). Este hecho condiciona un incremento de la llegada de endotoxinas bacterianas a las células de *Kupffer* (KC) en el hígado, activando los receptores *Toll-like*

de estas células, especialmente el 4 (TLR-4), y promoviendo su activación, multiplicación y la secreción autocrina y paracrina de citocinas proinflamatorias –entre otras sustancias– por parte de estas células. La respuesta inflamatoria producida provoca parte del daño tisular característico de la hepatopatía alcohólica (Lumeng y Crabb, 2000). El estrés oxidativo, producido en el hígado a causa del metabolismo del alcohol, intensifica aún más el daño sufrido por este órgano. Actualmente se considera a la hepatitis alcohólica como una enfermedad mediada por citocinas. El mecanismo de la lesión tisular en la hepatopatía hepática queda resumido en la Figura 5.

Aunque parcialmente en el terreno de la hipótesis, es probable que este incremento de citocinas circulantes ejerza efectos deletéreos sobre órganos distantes como el cerebro (Crews *et al.*, 2006) y posiblemente el hueso. Este nuevo campo abre nuevas interpretaciones sobre la patogenia de la osteopatía del alcohólico, solo parcialmente conocidas en el momento actual. A estos efectos, conviene recordar que las citocinas proinflamatorias activan al RANKL, promoviendo la actividad osteoclástica, tal como se comentó en el apartado correspondiente. En un estudio realizado por nuestro grupo no encontramos relación entre la actividad de RANKL de alcohólicos crónicos con diverso grado de disfunción hepática y controles, sugiriendo por lo tanto que la destrucción de hueso en el alcohólico no está especialmente mediada por el eje RANK-RANKL-OPG (García-Valdecasas-Campelo *et al.*, 2006).

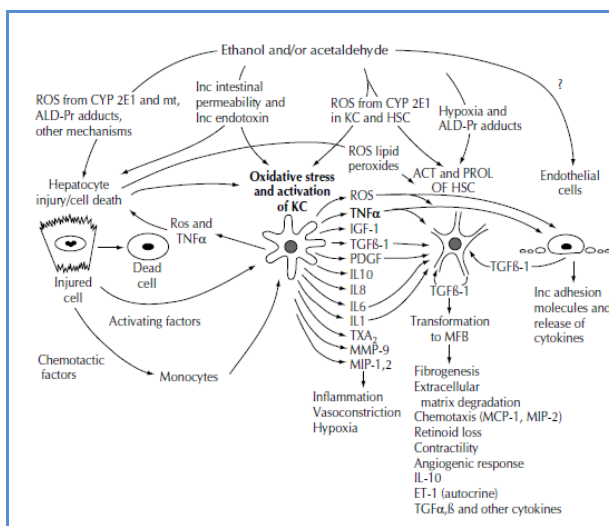


Figura 5: Efectos de la lesión hepatocitaria, endotoxina y de los cambios inducidos por etanol –y/o acetaldehído– (incluyendo hipoxia y estrés oxidativo) sobre las vías autocrina y paracrina de las KC activadas, células estrelladas hepáticas y células endoteliales. ACT, activación; ALD-Pr, aldehído-proteína; 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; TXA₂, tromboxano A₂ (Lumeng y Crabb, 2000).

2.3 METABOLISMO DEL ALCOHOL

Una vez ingerido, el alcohol se absorbe, por difusión simple, en el estómago (20%) y la mayor parte en el intestino delgado. Esta absorción se ve modificada por la cantidad de alcohol, la presencia de alimentos y las características de la bebida consumida. La presencia de carbohidratos, grasas o proteínas, así como un vaciamiento gástrico lento, dificultan la absorción del alcohol. Por el contrario, las bebidas alcohólicas carbonatadas hacen que el alcohol se absorba más rápidamente y también existen diferencias según la bebida en cuestión. También se ha observado que concentraciones de alcohol entre el 15% y el 30% se absorben más rápidamente que otras superiores o inferiores a estos límites (Álvarez-González y del-Río-Gracia, 2003).

El nivel máximo de alcohol en sangre se alcanza entre los 30 y los 90 minutos desde la ingesta, distribuyéndose por todo el organismo, salvo el tejido graso, atravesando con facilidad las membranas, incluyendo la Barrera Hematoencefálica y la Placentaria. Esta distribución hidrófila del alcohol es uno de los motivos por los que las mujeres, al contener mayor proporción de grasa corporal y por tanto menos agua, alcanzan niveles de alcoholemia superiores a igual ingesta que un hombre (Álvarez-González y del-Río-Gracia, 2003).

Entre el 2% y el 10% del alcohol ingerido se elimina sin metabolizar a través de la respiración, la orina y el sudor (Álvarez-González y del-Río-Gracia, 2003).

El alcohol se metaboliza principalmente en el hígado (90%). Este proceso consta de tres pasos: en primer lugar, el alcohol se oxida, por medio de una de las tres vías que comentaremos a continuación, transformándose en acetaldehído; en un segundo paso, el acetaldehído es oxidado nuevamente y transformado en ácido acético en la mitocondria; finalmente, el ácido acético se transforma en acetil-coenzima-A (Acetil-CoA) y se incorpora a otras rutas metabólicas (Álvarez-González y del-Río-Gracia, 2003).

Estas cuatro reacciones de oxidación (tres vías de oxidación de etanol a acetaldehído y una de acetaldehído a ácido acético) integrantes de la ruta de metabolización del etanol se resumen en la Figura 6.

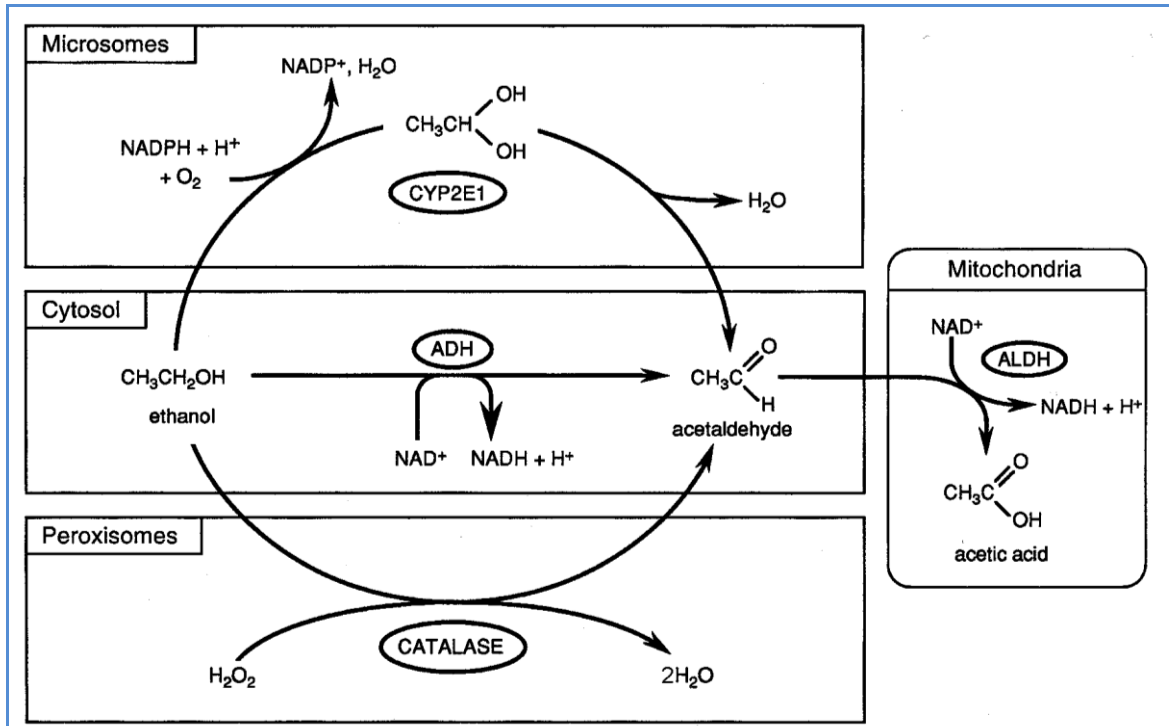


Figura 6: Metabolismo del alcohol. Imagen tomada de Tovar-Franco (2005) y modificada. Vías de la catalasa, alcohol deshidrogenasa y sistema microsómico oxidante del etanol y vía final común a las tres anteriores.

2.3.1 Vía de la alcohol-deshidrogenasa

La alcohol deshidrogenasa (ADH) es una metaloproteína de zinc cuya actividad depende de este metal (Auld y Bergman, 2008). Esta enzima citosólica se encuentra esencialmente en el hígado, pero también está presente en el estómago, riñón, pulmón y en pequeñas cantidades, en el cerebro (Álvarez-González y del-Río-Gracia, 2003).

Se han caracterizado seis isoenzimas de ADH en mamíferos (isoenzimas I a VI), casi todas presentes en seres humanos. La V se encuentra en el hígado fetal y la VI no se encuentra en seres humanos. Estas isoenzimas se conforman como dímeros a partir de 8 tipos de subunidades, codificadas por los genes ADH 1-8. Estas subunidades

presentan además importantes polimorfismos asociados a cambios en su actividad, que se relacionan con la variabilidad individual de este primer paso del metabolismo del alcohol, así como con la lesión hepática producida por el mismo o incluso alcoholismo (Salaspuro, 2001). Una o varias subunidades son específicas de cada isoenzima de ADH, no presentándose en las otras (Lieber, 1997). Las isoenzimas de clase I están compuestas por subunidades α , β y γ (genes ADH1, ADH2 y ADH3), tienen alta afinidad por el etanol y alta velocidad metabólica. Se encuentran principalmente en el hígado y son responsables de la mayor parte del metabolismo del etanol (Salaspuro, 2001) en sujetos no alcohólicos o en las fases iniciales del alcoholismo.

Las isoenzimas de clases II y III, la primera exclusiva del hígado y la segunda, ubicua, presentan menor afinidad con el etanol. En el caso de la isoenzima de clase III se cree que en condiciones fisiológicas, ni siquiera participa en esta vía metabólica (Salaspuro, 2001), si bien otros autores sostienen que en caso de etilismo crónico, se produce un relevo de la ADH de clase I, por la de clase III, desempeñando esta un mejor papel ante concentraciones elevadas de etanol, incluso en presencia de hepatopatía hepática avanzada (Haseba, 2009).

La isoenzima de clase IV, formada por subunidades μ/σ , se localiza predominantemente en la mucosa gástrica (Salaspuro, 2001), aunque también se encuentra en el hígado y en otros tramos del tracto digestivo. Posee elevada eficiencia catalítica en seres humanos para la oxidación del etanol y el retinol. Es por esto que esta isoenzima presenta dos funciones fisiológicas fundamentales: constituye el primer paso del metabolismo del etanol en el estómago; Por otro lado está involucrada en la síntesis de ácido retinoico, siendo esta síntesis inhibida por el etanol. Esta disminución de la síntesis del ácido retinoico puede contribuir a la patogenia del síndrome alcohólico-fetal y a la relación existente entre alcohol y cáncer en el tracto digestivo alto (Yin *et al.*, 2003).

La ADH-IV gástrica supone una protección frente a los efectos sistémicos del etanol, constituyendo un primer paso en su metabolización. Diversos factores pueden alterar la actividad de esta enzima en el estómago: gastrectomía, que produce

vaciamiento gástrico acelerado; alcoholismo, por descenso de actividad de esta isoenzima; cantidad de alcohol consumido; sexo femenino, en el que presenta menos actividad; ayuno prolongado; el consumo de fármacos como la aspirina, el paracetamol y algunos anti-H₂ son factores que disminuyen la actividad de la ADH gástrica (Lieber *et al.*, 1994).

La flora intestinal también presenta cierto grado de actividad ADH, si bien no suele tenerse en cuenta dado que cuantitativamente presenta escasa relevancia (Salaspuro, 2001).

Como hemos visto, la ADH no es una enzima específica del metabolismo del etanol, sino que puede actuar oxidando otras sustancias, como alcoholes (Álvarez-González y del-Río-Gracia, 2003), esteroides y ácidos grasos (Salaspuro, 2001).

En la vía metabólica a la que nos referimos, esta enzima oxida el etanol transformándolo en acetaldehído, metabolito sumamente tóxico (Lieber, 1997). Para ello utiliza como cofactor el dinucleótido de nicotina-adenina (NAD), al que reduce (Figura 6, pág. 41). La velocidad de esta reacción depende de la cantidad de enzima disponible (70%) y de la cantidad de NAD (30%). A consecuencia de esta reacción se produce un aumento de equivalentes reducidos, siendo este aumento NADH/NAD el causante de muchos trastornos metabólicos observados en el consumo crónico de alcohol (Álvarez-González y del-Río-Gracia, 2003). El ciclo del ácido cítrico se encuentra abolido en parte por la falta de NAD. El exceso de NADH provoca acidosis láctica. Esta contribuye a la acidosis metabólica, mermando la capacidad del riñón para la excreción de ácido úrico, produciendo hiperuricemia secundaria. La cetosis inducida por alcohol y el aumento del catabolismo de purinas pueden contribuir a este hecho. Además, el incremento de la degradación de purinas puede contribuir a la producción de ROS mediante la xantina oxidasa (Lieber, 1997).

La síntesis endógena de ácidos grasos, dependiente de NADH, se ve aumentada. Se produce también la disminución de la β -oxidación de ácidos grasos por la escasa disponibilidad de NAD, que es cofactor necesario para la misma. El incremento del

cociente NADH/NAD también eleva la concentración de α -glicerol-fosfato. Todo esto conduce a un aumento en la síntesis de triglicéridos, que se acumulan en el hígado, produciendo esteatosis hepática (Lieber, 1997).

La intoxicación aguda puede ocasionar hipoglucemia por bloqueo de la gluconeogénesis por parte del etanol, como consecuencia del incremento de NADH/NAD, especialmente en sujetos cuya reserva de glucógeno ha sido agotada (Lieber, 1997), lo que es frecuente en alcohólicos, a causa hábitos alimenticios erráticos (Santolaria *et al.*, 2000b). Por otra parte, en alcohólicos es frecuente el fenómeno inverso, produciéndose hiperglucemia por aceleración de la gluconeogénesis a causa del etanol (Lieber, 1997). Mokuda *et al.* (2004) encuentran que el etanol puede producir hipoglucemia ya sea incrementando la oxidación de glucosa o bloqueando la gluconeogénesis, pero también hiperglucemia por inhibición de la síntesis de glucógeno y por aumento de su catabolismo, y que este efecto parece relacionarse con estados postprandial o de ayuno.

2.3.2 Vía del Sistema Microsómico Oxidante del Etanol

El Sistema Microsómico Oxidante del Etanol (MEOS) constituye una vía secundaria del metabolismo del etanol. Se localiza en el retículo endoplasmático liso del hepatocito. Presenta una cinética de orden uno, es decir, dependiente de la concentración. Es responsable del 10% del metabolismo del etanol a concentraciones sanguíneas altas de este. Sin embargo, es inducible y va cobrando progresiva importancia en el alcohólico crónico (Álvarez-González y del-Río-Gracia, 2003). Esta vía se relaciona con el citocromo P450, principalmente con CYP2E1, si bien parece que CYP1A2 puede desempeñar un papel importante cuando CYP2E1 no se encuentra inducido (Kunitoh *et al.*, 1993). Tal como se comentó previamente, este sistema resulta inducible por fármacos y tóxicos –entre ellos el alcohol–, llegando a aumentar su actividad más de un 75% (Kunitoh *et al.*, 1993).

Este aumento de actividad del MEOS conlleva dos consecuencias: a veces el metabolismo de sustancias degradadas por este sistema se ve aumentado, como es el caso de gran número de fármacos y del ácido retinoico (principal metabolito de la vitamina A); otras veces, al compartir la misma vía, estos sustratos se ven desplazados por el etanol, aumentando su concentración en sangre (Danko y Chaschin, 2007). El que ocurra una u otra de estas dos situaciones es en muchas ocasiones impredecible.

La reacción que caracteriza esta vía consiste en que el alcohol con el concurso de una molécula de oxígeno, nicotín-adenín dinucleótido-fosfato reducido (NADPH) y un protón (H^+), se transforma en acetaldehído y nicotín-adenín dinucleótido-fosfato (NADP), produciéndose dos moléculas de agua (Figura 6, pág. 41). En esta reacción dos sustratos se oxidan simultáneamente, reduciéndose una molécula de oxígeno. La reacción que produce la oxidación del segundo sustrato, en este caso el NADPH, está catalizada por *oxidasas de función mixta* –como la *NADPH oxidasa*–, responsables de la generación de ROS (Gropper *et al.*, 2008).

Por otra parte, el aumento de consumo de oxígeno puede producir hipoxia relativa en áreas pericentrales hepáticas (Brauer *et al.*, 1997), ya que están menos oxigenadas que las áreas periportales. De hecho, la lesión inicial en el hepatópata alcohólico se observa precisamente en el área III de *Rappaport*, es decir, en torno a la vena centrolobulillar (Tsukamoto *et al.*, 1990), donde la presión de oxígeno es menor.

2.3.3 Vía de la Catalasa

Esta enzima se expresa en todos los tejidos, aunque presenta mayores niveles en el hígado, riñón, corazón y eritrocitos. En el hígado, se encuentra predominantemente en los peroxisomas y en menor cantidad en las mitocondrias (Kwo y Crabb, 2002). Es en este órgano en donde se produce la mayor parte de su actividad de oxidación del etanol (Álvarez-González y del-Río-Gracia, 2003).

Mediante la acción de esta enzima, el etanol se oxida a acetaldehído en presencia de peróxido de hidrógeno, produciendo agua (Figura 6, pág. 41). Además, su actividad aumenta si dispone de peróxido de hidrógeno en abundancia.

La importancia de esta vía es controvertida, ya que algunos estudios indican que la deficiencia de esta enzima no produce alteraciones en el metabolismo del alcohol de los sujetos que la padecen; sin embargo, otros estudios sugieren que la catalasa es capaz de oxidar una cantidad sustancial de etanol en algunas condiciones fisiológicas, pero que se encuentra inhibida por la ADH y además es inhibida de forma indirecta por algunos inhibidores de la ADH, lo que podría haber llevado a subestimar su importancia (Kwo y Crabb, 2002). De hecho, su actividad en el metabolismo del etanol está limitada por la cantidad de peróxido de hidrógeno disponible. El peróxido de hidrógeno necesario para la misma proviene principalmente de la β -oxidación de ácidos grasos en el peroxisoma, aunque también de las reacciones de las oxidasas de función mixta, como la *xantina oxidasa* y de la NADPH oxidasa. El metabolismo del alcohol por la catalasa puede ser inhibido por la presencia de ácidos grasos. A su vez, la β -oxidación de estos puede ser inhibida por el NADH producido por el metabolismo del alcohol por la vía de la ADH. A consecuencia de esto, estos equivalentes reducidos – producidos por la ADH– inhiben la generación de peróxido de hidrógeno por la catalasa, disminuyendo de forma significativa la tasa de peroxidación de alcohol de la propia catalasa (Lieber, 1997).

Tanto la actividad de las oxidasas de función mixta como de la propia catalasa, contribuye a la génesis de ROS, que tanta importancia tienen en la patogenia de diversas alteraciones relacionadas con el consumo crónico de alcohol.

2.3.4 Oxidación del acetaldehído

Las tres vías comentadas previamente concluyen en la formación de acetaldehído. Más del 90% de la oxidación de este compuesto se produce en el hígado

(Salaspuro, 2001) por dos vías diferentes: La *acetaldehído deshidrogenasa* (ALDH) y la xantina oxidasa (Lieber, 1997), que como hemos visto actúa sobre varios sustratos.

La ALDH, al igual que la ADH, no resulta inducible (Lumeng y Crabb, 2000) y no presenta especificidad de sustrato. También presenta varias isoenzimas (ALDH I-IV) con localización tisular y orgánica bastante heterogénea y variable afinidad para sustrato. Las isoenzimas más afines al acetaldehído se encuentran en las mitocondrias (ALDH-I) y las menos afines (ALDH II-IV) en el citosol (Hernández-Tobías, 1996)

Esta enzima precisa NAD y lleva a cabo la mayor parte de la oxidación del acetaldehído. Por otra parte, la xantina oxidasa, metaboliza una pequeña parte del sustrato produciendo ROS en el proceso, si bien esta última presenta mucha menos afinidad (Lieber, 1997).

El acetaldehído es un compuesto altamente tóxico para el organismo, que en condiciones normales es metabolizado rápidamente a etanol por la ALDH (Lieber, 1997). En condiciones de ingesta aguda de cantidades importantes de alcohol, o en el alcohólico crónico, en el que la actividad ALDH disminuye debido al daño hepático (Álvarez-González y del-Río-Gracia, 2003) y a la disminuida capacidad de la mitocondria, y el MEOS se encuentra inducido; se produce un desequilibrio entre la formación de acetaldehído y su metabolismo (Lieber, 1997). Esto permite que el acetaldehído pase a la sangre en cantidades importantes, pudiendo atravesar la barrera hematoencefálica, que es poco permeable a este compuesto. Esto produce el llamado *síndrome de sensibilidad al alcohol*, en el que se basan las terapias aversivas utilizadas en el alcoholismo. Esta acumulación de acetaldehído en los tejidos también contribuye a las acciones patológicas crónicas asociadas al etanol (Álvarez-González y del-Río-Gracia, 2003).

La toxicidad del acetaldehído radica en que es capaz de unirse a otros compuestos, alterando su función. Uno de ellos es la *glutación peroxidasa* (GPX), posiblemente el más importante de los enzimas antioxidantes del organismo. El acetaldehído se une a esta enzima formando complejos *hemiacetal*, con lo que

disminuye su poder antioxidante. De forma general, se acepta que el déficit de actividad de esta enzima contribuye a la lesión oxidativa. Por otra parte, el propio acetaldehído *per se* es capaz de producir peroxidación lipídica (Lieber, 1997).

El acetaldehído es capaz de combinarse con otras proteínas, incluso enzimas, alterando su función, disminuyendo la reparación del ADN y también generando respuesta inmune, al dejar de ser reconocidas como propias (Lieber, 1997). La respuesta inmune conlleva la liberación de citocinas proinflamatorias, quienes a su vez promueven activación y proliferación de las KC y la generación de ROS por parte de estas, tal como ha sido comentado previamente. También favorece la producción de ROS el aumento de actividad de la cadena de transferencia de electrones mitocondrial, consecuencia de un aumento de equivalentes reducidos producido por esta enzima y también por la ADH. Todo ello contribuye al aumento del consumo de oxígeno y por tanto a la lesión hepática característica de la hepatopatía alcohólica (Lumeng y Crabb, 2000). Por lo tanto, el acetaldehído, por varias vías, contribuye a la síntesis de ROS, la peroxidación lipídica y a la lesión oxidativa de estructuras celulares. A todo esto hay que añadir la actividad del neutrófilo atraído por las citocinas proinflamatorias al foco donde estas se liberan. Al ser activada su actividad fagocítica se generan más ROS conformándose un circuito de retroalimentación positiva.

No debe olvidarse que además de lo comentado, el acetaldehído producido –y el propio etanol– estimula la producción de colágena (Lumeng y Crabb, 2000; Purohit y Brenner, 2006) y este hecho favorece la aparición de fibrosis hepática tal como se ha comentado y puede verse en la Figura 5 (pág. 39).

2.3.5 Otras reacciones en el metabolismo del alcohol

Tras los procesos comentados en los apartados anteriores, aún el acetato debe transformarse en acetil-Coenzima A (acetil-CoA) y pasar a otras rutas del metabolismo general. Esta biotransformación es llevada a cabo por la *acetil-CoA sintetasa*, que se

localiza en la mitocondria (Álvarez-González y del-Río-Gracia, 2003). Por otra parte, existen reacciones paralelas que contribuyen de forma indirecta a estos procesos, como es el caso, por ejemplo, de las oxidasas de función mixta. Estas reacciones se describen brevemente a continuación, así como un resumen de las principales reacciones químicas que se producen en el metabolismo oxidativo del etanol (Tabla 2).

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 sint.	Mitocondria	$\text{CH}_3\text{COOH} + \text{CoA} \rightarrow \text{acetil-CoA}$

Tabla 2: Enzimas y reacciones más importantes del metabolismo oxidativo del alcohol.

A pesar de que el metabolismo del etanol es principalmente oxidativo, parece ser que existen también vías de metabolización no oxidativas, aunque son cuantitativamente mucho menos importantes (Haber *et al.*, 2004). Estas rutas metabólicas parecen estar en relación con el daño producido en órganos diana en el alcohólico crónico, que no presentan capacidad metabólica oxidativa para el etanol, como el páncreas y el pulmón, entre otros (Werner *et al.*, 2002; Werner *et al.*, 2001; Laposata y Lange, 1986; Manautou y Carlson, 1991). Además, algunos autores señalan que la inhibición de la vía oxidativa del etanol produce un flujo hacia la vía no oxidativa, incrementando el daño tisular pancreático –y probablemente en otros tejidos– producido por etil-ésteres de ácidos grasos (FAEE), metabolitos de esta vía (Werner *et al.*, 2001)

2.4 CIRROSIS HEPÁTICA

En el alcohólico crónico coexisten muchas otras alteraciones que pueden influir sobre el hueso, entre ellas ocupa un lugar prioritario la cirrosis hepática, que como veremos, influye de múltiples maneras sobre el metabolismo óseo.

La cirrosis se define por la lesión anatomopatológica que la caracteriza, la fibrosis. Esta, al contrario de lo que se creía, resulta reversible en caso de que cese la *noxa* que la produce. La fibrosis se presenta a causa de la continua agresión al parénquima hepático, cuyo mecanismo ya ha sido comentado (ver Figura 5 en la página 39); y se presenta en grado tal, que altera la estructura hepática, distorsionándola y formando nódulos de regeneración. Esto da como resultado una disminución de la función hepática, como consecuencia de la disminución de la masa hepatocelular, así como alteraciones en el flujo sanguíneo. La hipertensión portal es una complicación importante de la cirrosis descompensada y una manifestación de esta alteración del flujo sanguíneo. Interviene en la aparición de ascitis y varices esofagogástricas (Bacon, 2008).

Es un hecho que eventualmente la hipertensión portal devenga en un déficit nutricional, condicionado en parte por cierto grado de malabsorción de calcio, fósforo, vitamina D y en general de cualquier otro nutriente, fenómeno sobradamente conocido. Por otra parte, el hígado es el lugar donde se produce la 25-hidroxilación de la vitamina D, por lo que la insuficiencia hepática va a acentuar el déficit de esta vitamina, agravando la malabsorción de calcio.

Además, es en el hígado donde se catabolizan los estrógenos, por lo que al deteriorarse la función del mismo aparece hiperestrogenismo, teóricamente beneficioso para el hueso; igualmente, los niveles de andrógenos se ven alterados, disminuyendo; probablemente en relación con la inducción del MEOS producida por el alcohol, que aumenta su actividad *aromatasa*, transformando andrógenos en estrógenos. El alcohol también induce otros sistemas enzimáticos implicados en el metabolismo de hormonas esteroideas, como las *α -reductasas* y las oxidasas de función mixta microsomales (Purohit, 2000). Tal como se ha comentado anteriormente, el hipogonadismo puede jugar un papel en este sentido. El hipogonadismo es frecuente en el alcohólico no cirrótico, debido fundamentalmente a un doble defecto: efecto tóxico directo del alcohol sobre los testículos y del eje hipófiso-hipotalámico (Bacon, 2008). Así, Diamond *et al.* (1989c) encuentran en pacientes afectos de hemocromatosis idiopática –que comparten con los cirróticos

una sobrecarga hepática de hierro, con aumento de ROS y del estrés oxidativo, así como hipogonadismo— hay disminución de la densidad ósea relacionada con hipogonadismo.

Aunque menos estudiado, los niveles de cortisol también se alteran en la hepatopatía alcohólica; por una parte, disminuye la capacidad de eliminación de estas sustancias, que se destruyen en el hígado (Guyton y Hall, 2006b), por deficiente actividad de la *11-β-hidroxiesteroide deshidrogenasa* (Stewart *et al.*, 1993); por otro lado, existe en algunos pacientes una producción aumentada de esteroides por aumento de la actividad del eje hipotalámico-hipofisario-suprarrenal (Sommer *et al.*, 1996), o por alteración del circuito de retroalimentación, manteniendo una secreción normal a pesar de unos niveles de cortisol aumentados (Stewart *et al.*, 1993; Kirkman y Nelson, 1988).

Tanto las alteraciones en las hormonas sexuales como en el cortisol pueden influir en la osteopatía de estos enfermos por los mecanismos que ya han sido explicados.

En el hígado es donde tiene lugar la síntesis de la IGF-1, principal hormona involucrada en la formación de hueso, encontrándose disminuida en pacientes cirróticos (Goral *et al.*, 2010). No es de extrañar por lo tanto que diversos autores hayan encontrado que la osteopatía del alcohólico es más severa si coexiste la cirrosis hepática. Así, Jorge *et al.* (1988), en pacientes cirróticos alcohólicos, encuentran relación entre la disminución del volumen óseo trabecular y los parámetros de función hepática. Sin embargo, no hubo relación alguna con los valores hormonales y de iones que participan en el metabolismo calcio-fosfórico. Otros autores encuentran también asociación entre las alteraciones del metabolismo óseo y cirrosis, siendo estas de forma general, más severas en los cirróticos (Giouleme *et al.*, 2006; Nakano *et al.*, 1996). Es llamativo que a pesar de que la afectación de la vitamina D es más profunda en estos pacientes, al menos desde el punto de vista teórico, la forma predominante de osteopenia en estos pacientes es la osteoporosis y no la osteomalacia (Jorge-Hernández *et al.*, 1988; Cemborain *et al.*, 1998; Diamond *et al.*, 1989a).

2.5 MALNUTRICIÓN DEL PACIENTE ALCOHÓLICO

La malnutrición calórico-proteica es un fenómeno extremadamente frecuente en el alcohólico. En nuestro medio, en el que estos pacientes forman parte de las clases sociales menos favorecidas, hasta el 20% de estos sujetos presentan malnutrición calórica y/o proteica (Estruch, 2002).

La malnutrición del alcohólico puede clasificarse en dos grandes grupos patogénicos. Por una parte existe una malnutrición primaria, por defectuosa ingesta y por mala calidad de los alimentos (Santolaria *et al.*, 2000b), y por otra parte existe una malnutrición secundaria a malabsorción derivada del propio efecto del alcohol, insuficiencia pancreática y/o hipertensión portal, por mecanismos que ya han sido comentados.

En cuanto a la malnutrición primaria en el paciente alcohólico, es clásica la experiencia de Rubin y Lieber (1968), quienes administrando a voluntarios sanos una cantidad determinada de calorías en forma de nutrientes habituales y a otro grupo las mismas calorías en forma de alcohol, observó cómo los individuos del primer grupo ganaban peso mientras que los del grupo alcohólico permanecían estables. Esto generó el concepto de *empty calories* o calorías vacías, por no tener valor nutricional. Una de las explicaciones que se dio a este hecho fue que el MEOS, inducido en los alcohólicos, metabolizaría los sustratos de la dieta, consumiendo oxígeno y aumentando la generación de calor, contribuyendo además a la lesión hepática (Addolorato *et al.*, 1997). Recientemente se han descubierto las *proteínas desacoplantes* mitocondriales (*uncoupling proteins* o *UCP*). Estas proteínas intermembrana, localizadas en la membrana interna de la mitocondria, actúan en la disipando el gradiente de protones sin que se produzca ATP, desacoplando la fosforilación oxidativa, y generando calor en el proceso. Esto disminuye la producción de ATP por mol de principio inmediato metabolizado. El funcionamiento de estas proteínas es aún poco conocido (Nedergaard *et al.*, 2005). Lee *et al.* (2010) describe *in vitro* disminución de la actividad mitocondrial y de la generación de ATP, a la vez que aumento de la UCP-2 en células pancreáticas sometidas a tratamiento con etanol, lo

que abre un nuevo campo en las alteraciones metabólicas relacionadas con consumo de alcohol.

Estos pacientes presentan además defectuosa ingesta, producida por la pérdida de los lazos sociales del alcohólico, la marginación a que esta conduce y la pérdida de interés por la alimentación que se produce en estos sujetos, sobre todo por el efecto anorexígeno del propio alcohol; que los lleva en muchas ocasiones a tomar una sola comida al día y generalmente de baja calidad nutricional, en bares o tabernas; tal como observan Santolaria *et al.* (2000b). Esto provoca malnutrición de tipo marasmático, es decir, con disminución de la masa magra y grasa. Este fenómeno ha sido constatado por diversos autores (Lieber, 1993; Santolaria *et al.*, 2000b). A esto se añade los mecanismos mencionados previamente relativos al efecto directo del alcohol sobre la absorción de nutrientes, la pancreatitis crónica y a la cirrosis hepática. La pancreatitis crónica, de forma subclínica, es más frecuente de lo que inicialmente se pensaba en el alcohólico crónico. Se conoce actualmente que de forma paralela a como ocurre en el hígado, células estrelladas se transforman en miofibroblastos en el acino pancreático, induciendo el progresivo depósito de colágeno bajo el influjo de citocinas (Senoo, 2004) sobre todo del TGF- β (Shimizu, 2008).

Recordemos que la vitamina D es una vitamina liposoluble que precisa por lo tanto del concurso de la secreción pancreática para su correcta absorción, con independencia del impacto que la insuficiencia pancreática tiene sobre la absorción del resto de nutrientes, incluyendo la de calcio.

La malnutrición proteica contribuye al desarrollo de osteoporosis por mecanismos diferentes. Por una parte, disminuye la masa ósea –y también el índice de masa corporal–; y por otra parte altera la fuerza muscular, que por sí sola también influye en el mantenimiento de la estructura ósea. Recordemos que el hueso es un tejido que constantemente se remodela, fenómeno que implica dos procesos contrapuestos, uno de síntesis y otro de destrucción. Recordemos también que lo primero que se ha de sintetizar es una matriz proteica, constituida por lo tanto por aminoácidos, que escasean en situaciones de defectuoso aporte (o de excesiva

demanda). En situaciones de restricción proteica, como es la malnutrición, el hígado utiliza de manera prioritaria los aminoácidos del músculo, hueso, piel, etc. para la síntesis de proteínas indispensables, como reactantes de fase aguda, proteínas de transporte, albúmina, factores de coagulación, etc. No queda, por tanto, sustrato para fabricar otras proteínas como las necesarias para el tejido osteoide, por lo que la síntesis de este se ve comprometida, desacoplándose el proceso de remodelación. La alteración de la síntesis ósea en situaciones de malnutrición proteica puede estar relacionada con unos niveles séricos disminuidos de IGF-1 y estrógenos (Ammann *et al.*, 2000). La ingesta baja de proteínas deteriora tanto la producción como la acción del IGF-1, factor esencial para el crecimiento longitudinal del hueso, así como para la proliferación y diferenciación de los condrocitos. Tal como hemos visto, el IGF-1 puede ser considerado un factor clave en el ajuste del metabolismo calcio-fósforo así como para el desarrollo normal del esqueleto y la mineralización ósea durante el crecimiento. En niños y adolescentes sanos se ha visto una asociación positiva entre la cantidad de proteínas ingeridas y la masa ósea en ambos sexos, asociación particularmente significativa en prepúberes, sugiriendo que el esqueleto responde a la ingesta proteica, especialmente en los años previos al establecimiento de maduración puberal (Bonjour *et al.*, 2001). Se ha observado cómo las alteraciones óseas inducidas por la malnutrición en estadios muy precoces de la vida pueden corregirse tras un aporte nutricional adecuado (Muzzo *et al.*, 1995). También se ha visto que la administración de suplementos proteicos tras fracturas de cadera se asocia a un aumento de los niveles de IGF-1 y a una atenuación en la disminución de la masa ósea femoral proximal que presentan los sujetos que no reciben estos suplementos (Schurch *et al.*, 1998).

En la malnutrición proteica severa se encuentra una osteoporosis de bajo recambio caracterizada por una síntesis defectuosa de hueso con un enlentecimiento en la degradación del mismo. Se observa una disminución de la densidad ósea, de la masa ósea esponjosa y del grosor de la trabécula, adelgazamiento de la cortical y disminución del osteoide y de la tasa de aposición mineral (Bourrin *et al.*, 2000a), todo lo cual se traduce en una pérdida de resistencia del tejido óseo (Bourrin *et al.*, 2000c).

De hecho, se conoce que la malnutrición proteica genera una osteoporosis de bajo *turnover*, con reducción tanto de la síntesis como de la reabsorción ósea, que se acompaña de niveles plasmáticos bajos de IGF-1 y de resistencia de los osteoblastos a la acción de la IGF-1 (Bourrin *et al.*, 2000a).

El efecto de la malnutrición sobre el hueso del alcohólico ha sido ya constatado por diversos estudios tanto experimentales (Molina-Pérez *et al.*, 2000), como clínicos (Santolaria *et al.*, 2000a). Como era de esperar, esta inhibición de la síntesis afecta a todas las fases evolutivas del metabolismo del hueso, expresándose también en el animal en crecimiento. Es interesante señalar que el paciente que comenzó a beber de forma excesiva durante la niñez o adolescencia presenta una talla inferior al que inició el consumo en etapas posteriores de la vida; y que aunque el hecho de referir haber pasado hambre en la infancia también se asociaba a determinadas alteraciones óseas relacionadas con la detención del crecimiento, como las líneas de Harris, el efecto del alcohol era más marcado y aditivo (González-Reimers *et al.*, 2007).

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, y es el que hemos seguido en el presente estudio.

No solo el hueso se ve afectado de forma directa en las situaciones de malnutrición calórico-proteica. El músculo, principal reservorio proteico del organismo es el que más va a sufrir en estas situaciones. De hecho, la pérdida de masa magra es un fenómeno relevante en el paciente marasmático (Heimbürger, 2008). La actividad muscular es esencial para el mantenimiento de una adecuada masa ósea, ya que el factor mecánico es un estímulo directo para la síntesis ósea, concepto que enlaza con la osteoporosis asociada a ingravidez cuyo efecto sobre el hueso se demuestra en algunos modelos experimentales como el de Aguirre *et al.* (2006), en el que utiliza un modelo murino, suspendiendo a los animales por la cola; observando apoptosis en los

osteoblastos, reclutamiento de osteoclastos con incremento en la reabsorción del hueso y pérdida de masa ósea. Por otra parte, no ha sido adecuadamente estudiada la relación entre miopatía alcohólica y osteopatía del alcohólico, pero indudablemente la amiotrofia presente en el alcohólico, especialmente si está sometido a malnutrición proteica, juega un papel patogénico importante. Un estudio de nuestro grupo encontró relación entre atrofia muscular y área de osteoide; aunque no encontró relación entre esta y el volumen de hueso trabecular (González-Reimers *et al.*, 2005a).

2.6 ESTRÉS OXIDATIVO

Hemos visto que en el alcoholismo crónico existe una osteopatía caracterizada por descenso de la masa ósea, indudablemente agravada por la coexistencia de malnutrición proteica. También hemos comentado que este descenso de la masa ósea obedece a un desequilibrio en el recambio óseo: por una parte desciende la síntesis y por la otra, la reabsorción puede también verse alterada, si bien esto es más controvertido, aunque la mayoría de autores encuentran que está aumentada en alcohólicos.

Es posible que el efecto prooxidante del alcohol tras su metabolismo hepático, generando ROS, pueda participar en la toxicidad sobre el osteoblasto y contribuir al déficit de síntesis ósea. Por otra parte, el ciclo de la hepatopatía hepática, mediado por citocinas y donde las ROS desempeñan un papel destacado, incrementa la producción de citocinas circulantes capaces de activar al RANKL y por tanto la reabsorción ósea. Es decir, existe un nexo de unión entre peroxidación lipídica y osteopenia tanto sobre la síntesis como sobre la destrucción del hueso.

El tratamiento antioxidante se ha ensayado con variable éxito en diversas formas de osteoporosis. Por ejemplo Wolf *et al.* (2005) no encontraron relación alguna entre la ingesta de antioxidantes como vitamina C, retinol, vitamina A, vitamina E y selenio y masa ósea en mujeres postmenopáusicas. Otros autores tampoco encuentran que el

tratamiento con vitamina E mejore la masa ósea en ratas macho (Chai *et al.*, 2008). El estudio Framingham sí que encuentra efecto protector de la ingesta de *licopenos* sobre la fractura de cadera y no vertebral, y de la ingesta de carotenoides sobre la fractura de cadera en un total de más de 900 hombres y mujeres (Sahni *et al.*, 2009a). Los mismos autores encuentran que la ingesta de vitamina C previene la pérdida de masa ósea en el anciano (Sahni *et al.*, 2009b), aunque este efecto puede interpretarse por la acción estimulante de la síntesis de colágena ejercida por la vitamina C. Morinobu *et al.* (2008) encuentran que otro antioxidante, la epigallocatecina –componente fundamental del té verde–, suprime la actividad osteoclástica y mejora la masa ósea en ratones con artritis reumatoide experimental. Yamaguchi *et al.* (2010) refieren que a adición de zinc puede beneficiar la síntesis ósea, resultados que concuerdan con los de otros autores (Merialdi *et al.*, 2004; Díaz-Gómez *et al.*, 2003; Iannotti *et al.*, 2008), y que podrían obedecer en parte al efecto antioxidante del zinc. Existe como vemos cierta disparidad de resultados relativos a los potenciales efectos beneficiosos de un tratamiento antioxidante en la osteoporosis.

Uno de los principales antioxidantes es el selenio, ya que es cofactor del más importante de los sistemas enzimáticos antioxidantes, como es el sistema de la Glutación Peroxidasa (GPX). El déficit de selenio está ampliamente descrito en pacientes alcohólicos, y guarda relación con la hepatopatía alcohólica y con el pronóstico de la misma en algunos estudios (González-Reimers *et al.*, 2008), aunque el tratamiento con selenio no ha mejorado el pronóstico de pacientes con cirrosis hepática (Stewart *et al.*, 2007). Independientemente de su eventual efecto terapéutico, muchos autores han encontrado descenso de los niveles de selenio en el alcohólico crónico (Dworkin *et al.*, 1984; Aaseth *et al.*, 1986; Johansson *et al.*, 1986; Korpela *et al.*, 1985), que se recuperan tras la abstinencia alcohólica (Girre *et al.*, 1990). Existen datos experimentales que sugieren que lo que causa el descenso de los niveles de selenio en el alcohólico es más bien la defectuosa ingesta de este elemento que el alcohol como tal (Cho *et al.*, 1991). Por lo tanto, si el selenio es un potente antioxidante, si sus niveles están descendidos en el alcohólico y si la lesión oxidante juega un papel en la afectación ósea del paciente alcohólico, es pertinente analizar el

efecto del selenio sobre la osteopatía de la rata alcohólica, como hemos perseguido en este estudio.

3. OLIGOELEMENTOS INVOLUCRADOS EN MECANISMOS ANTIOXIDANTES Y PEROXIDACIÓN

Anteriormente hemos hablado de la frecuente asociación de alcoholismo y alteraciones nutricionales. Como parte de estas alteraciones nutricionales debemos señalar las del contenido corporal y metabolismo de diversos oligoelementos. En el alcohólico crónico, como veremos a continuación, estas alteraciones no se caracterizan por déficit en todos los casos; tampoco obedecen siempre a defectuosa ingesta o absorción, influyendo en ellas mecanismos directamente relacionados con el metabolismo del etanol y solo parcialmente conocidos. Estas alteraciones van a tener importancia en el mantenimiento de la masa ósea, ya que como veremos, pueden modular la actividad de enzimas clave relacionadas con la síntesis de matriz osteoide, la degradación de colágeno y/o la mineralización.

3.1 HIERRO

Los mecanismos principales de absorción del hierro, así como su transporte y almacenamiento son bien conocidos (Figura 7). El hierro es absorbido en todo el intestino delgado, preferentemente en el duodeno. En primer lugar es necesaria la reducción del hierro a catión ferroso en el polo apical del

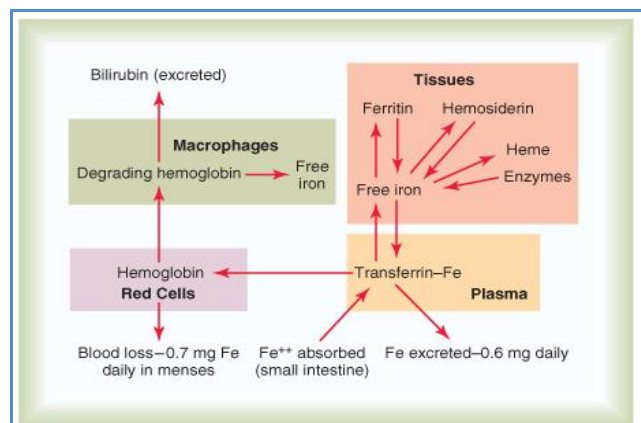


Figura 7: Transporte y metabolismo del hierro (Guyton y Hall, 2006)

enterocito, ya que en sus *microvilli* hay una *ferro-reductasa* que es la Dcytb; En segundo lugar, el hierro ferroso es transportado al interior del enterocito por el transportador de metales divalentes 1 (DMT-1 ó *Divalent Metal Transporter 1*). El hierro así absorbido se almacena en el enterocito como ferritina. Si el enterocito es senescente y se descama, este hierro se pierde. Si la célula no se descama el hierro es transportado desde el enterocito a la sangre por la membrana basolateral por medio de la *ferroportina*. Este proceso es facilitado por un análogo de la *ceruloplasmina*, la *hefestina*, con actividad ferroxidasa.

A estos mecanismos se añade la absorción del hierro unido a *apotransferrina* en la luz intestinal. Esta apotransferrina, es secretada por el hígado en la bilis y es capaz de unir moléculas más complejas que contienen hierro en su estructura, como son la hemoglobina y la mioglobina de la carne, dos de las principales fuentes de hierro de la dieta. Al complejo apotransferrina-hierro se le denomina *transferrina*. La transferrina se une a receptores epiteliales específicos en el intestino delgado, absorbiéndose por pinocitosis. Esta transferrina es posteriormente liberada en sangre. Esta absorción intestinal de hierro es lenta y poco eficiente, con lo que sólo un pequeño porcentaje del hierro ingerido es absorbido por el organismo. Esta absorción está sujeta a regulación ya que cuando los depósitos de hierro están completos, existe poca cantidad de apotransferrina capaz de captar el hierro intestinal. Lo contrario sucede cuando los depósitos de hierro son bajos.

Una vez en sangre, el hierro llega al hígado de dos formas: como hierro libre; o como hierro unido a apotransferrina, uniéndose ésta al hepatocito por medio de dos receptores diferentes, uno de los cuales es idéntico al encontrado en las membranas del eritroblasto.

En condiciones normales el organismo almacena 4-5 gramos de hierro, con una concentración aproximada de 70 ppm para un hombre de 70 Kg. En la rata adulta en cambio, esta concentración es inferior, siendo de 50 ppm aproximadamente. De nuevo en humanos, del total de hierro corporal el 65% está en forma de hemoglobina. Es por tanto un elemento cuya principal utilidad en el organismo es la síntesis de

hemoglobina, aún cuando es cofactor de multitud de procesos metabólicos en los que actúa como catalizador enzimático (citocromos, citocromo-reductasa, catalasa, peroxidasa, etc.). El 15%-30% del hierro se encuentra almacenado en el Sistema Mononuclear Fagocítico (SMF) y en las células del parénquima hepático. El exceso de hierro se acumula especialmente en los hepatocitos y menos en las células reticuloendoteliales de la médula ósea. En su mayoría, el hierro está unido a *apoferritina*, formando *ferritina* aunque una pequeña parte está en una forma muy insoluble, la *hemosiderina*. Esto último sucede especialmente cuando la cantidad total de hierro del organismo es mayor que la que puede acomodar la reserva de apoferritina. Los cúmulos de hemosiderina pueden observarse mediante microscopía óptica.

Cuando la sideremia se reduce, parte del hierro de la ferritina se libera fácilmente y se transporta en forma de transferrina. Este complejo se une fuertemente a moléculas en la superficie de los eritroblastos, que la incorporan mediante endocitosis. Este hierro es depositado directamente en la mitocondria, donde se sintetiza el *grupo hemo*.

Aproximadamente un 4% del hierro se encuentra en forma de mioglobina, un 1% en forma de diversos compuestos relacionados con reacciones de oxidación intracelulares y un 0,1% se encuentra unido a transferrina en plasma sanguíneo. Acorde con lo que hemos dicho, el principal destinatario del hierro es la eritrona, ya que diariamente se producen unos 6 gramos de hemoglobina¹.

Cuando los hematíes son destruidos, los macrófagos de todo el organismo recuperan casi inmediatamente la hemoglobina liberada, especialmente las *células de Kupffer* y los macrófagos del bazo y la médula ósea. El hierro contenido en la hemoglobina es separado de la molécula, que se degrada, y es liberado a la sangre en la transferrina.

¹ Cálculo realizado con la media entre hombres y mujeres del valor de referencia de la concentración de hemoglobina en sangre (Medline Plus, 2009). Se ha tomado un volumen total sanguíneo estimado de 5 litros y una vida media de 120 días (Guyton y Hall, 2006).

En cuanto a las pérdidas diarias de hierro por el organismo, se estiman en 0,6 mg de hierro diarios en el varón, principalmente en las heces. En la mujer deben añadirse además las pérdidas menstruales, que se estiman en 1,3 mg/día.

Hasta este punto hemos hablado del metabolismo del hierro en términos generales y bien conocidos, pero el metabolismo del hierro también está sujeto a la acción de las interleucinas proinflamatorias, de tal manera que mediante la estimulación de la *hepcidina* por éstas, se promueve que el hierro quede atrapado en el SMF y en el hepatocito y no sea liberado a la sangre. Además la *hepcidina* bloquea la actividad de la ferroportina, uniéndose a ella, internalizándola y promoviendo su degradación, con lo que atrapa el hierro dentro del enterocito y es susceptible de perderse eventualmente al descamarse éste.

El hierro contenido en el SMF se puede estimar mediante la ferritina sérica. Por eso, en procesos inflamatorios, agudos o crónicos, la ferritina está elevada, pese a que la sideremia suele estar baja y pueda haber incluso anemia, configurando el cuadro denominado “anemia de los procesos crónicos”. Por eso en estas situaciones no es conveniente administrar hierro, puesto que realmente este metal está en exceso en el organismo y el exceso de hierro está involucrado en la lesión oxidativa. El catión férrico es capaz de producir peroxidación lipídica y daño celular, habiéndose sugerido que parte de la lesión hepática observada en la hepatopatía alcohólica, hepatitis C o en la hemocromatosis, obedecen al efecto lesivo del exceso de hierro (Ren *et al.*, 2010).

En la hemocromatosis se describe además osteoporosis, que clásicamente se atribuía a la hepatopatía característica de esta enfermedad y/o al hipogonadismo acompañante. Así, por ej. Duquenne *et al.* (1996) encontraron mayor prevalencia de fracturas vertebrales en esta entidad, que se incrementaba cuando coexistía hipogonadismo.

Además, en otras situaciones de sobrecarga de hierro, como es el caso de la β -talasemia, también se encontró mayor incidencia de fracturas (Mahachoklertwattana *et al.*, 2003; Soliman *et al.*, 1998), hallazgo que sustentó la hipótesis de que el exceso

de hierro podía afectar a la síntesis y/o mineralización del hueso. Algunos autores (Lasco *et al.*, 2002) encuentran un incremento de la reabsorción ósea en pacientes talasémicos y Matsushima *et al.* (2003) en un modelo experimental de sobrecarga de hierro, encuentra osteoporosis que obedece a un aumento de la reabsorción ósea.

En un estudio preliminar de nuestro grupo, utilizando un modelo similar al empleado en el presente trabajo, no encontramos relación entre hierro óseo y masa ósea, aún cuando las ratas alcohólicas, especialmente si estaban sometidas a dieta hipoproteica (en las que más osteoporosis se encontraba), presentaban un aumento significativo del hierro óseo. En cambio, Yamasaki y Hagiwara (2009) encuentran que la sobrecarga de hierro en cultivos de osteoblastos inhibe la diferenciación de estas células, la actividad de la fosfatasa alcalina y el depósito de sales cálcicas, sugiriendo un efecto inhibitorio de la síntesis ósea.

De hecho, actualmente se piensa que el hierro suprime la síntesis ósea, siendo discutible su efecto sobre los osteoclastos. No está claro si esto es un efecto directo o derivado del hipogonadismo secundario que caracteriza a las enfermedades por depósito de hierro (Weinberg, 2008). Schnitzler *et al.* (2005) encuentran en 50 pacientes subsaharianos sometidos a biopsia de cresta iliaca que el exceso de hierro – presente en un 88% de sus pacientes– guardaba una relación significativa con la masa ósea y con un descenso del osteoide. Aún cuando la mayor parte de los enfermos eran alcohólicos, los autores concluyen que tanto la sobrecarga férrica como el déficit de ácido ascórbico y el exceso de alcohol, contribuyen a la osteoporosis, debido a un incremento de la reabsorción. Esta observación concuerda con datos recientes que sugieren que la osteoporosis en la talasemia, encontrada en esta serie en el 35% de los pacientes, obedece a activación del Sistema Osteoprotegerina-RANKL (activación osteoclastos) involucrado en la actividad osteoclástica (Pietrapertosa *et al.*, 2009).

Por lo tanto, aún cuando la mayoría de autores coincide en encontrar osteopenia en situaciones de sobrecarga de hierro, el mecanismo íntimo de la misma no es totalmente conocido. Algunos autores han encontrado que la suplementación con hierro provoca osteomalacia y aumento de la actividad osteoblástica reflejado en un

aumento de los niveles de osteocalcina, aunque la mineralización está bloqueada (Matsushima *et al.*, 2003).

El modelo de Lieber-DeCarli (1989) incluye la administración de alcohol y una dieta hipoproteica a ratas de laboratorio, a fin de observar los efectos combinados y relativos de ambos factores sobre alteraciones diversas en diferentes órganos diana. Es conocido que el alcohol ejerce un efecto sobre el hierro consistente en un incremento de su absorción intestinal y sobrecarga tisular del mismo.

Duane *et al.* (1992) encontraron un aumento al doble de la absorción intestinal de hierro en estudios *in vivo* realizados en pacientes alcohólicos, interpretando que este incremento obedecía a un aumento de la permeabilidad intestinal a este metal. El hierro es lesivo para las células de Kupffer ya que aumenta en ellas la expresión de citocinas proinflamatorias, en especial el TNF- α , quien como antes señalamos, puede activar al RANKL y promover la actividad osteoclástica. Se piensa que en parte la sobrecarga de hierro obedece a un efecto inhibitorio de la expresión de hepcidina hepática, lo que provoca un aumento de la actividad de DMT-1 con el consiguiente incremento de la absorción intestinal de este metal (Harrison-Findik *et al.*, 2006).

Tanto hierro como alcohol ejercen un efecto sinérgico sobre la producción de ROS, por lo que su estudio es pertinente en un trabajo como este, en el que se baraja la posibilidad de que la inhibición de la lesión oxidante mediante selenio pueda mejorar la masa ósea. Como hemos demostrado en estudios previos (Conde *et al.*, 1992), tanto el alcohol como la dieta hipoproteica provocan un aumento de los niveles óseos de hierro, por lo que constituye este modelo una herramienta ideal para estudiar el objetivo que nos hemos propuesto.

Aunque no conocemos trabajos en los que se demuestre que la administración de selenio mejora la osteoporosis inducida por exceso de hierro, Claster *et al.* (2009) encuentran que los pacientes con talasemia eran deficitarios en selenio.

3.2 COBRE

Las necesidades diarias de cobre en pacientes con nutrición parenteral total se calculan en 400 µg/día. El comité de expertos de la WHO establece que 2 mg al día de ingesta de cobre son adecuadas para mantener un equilibrio adecuado en el adulto (Solomons, 1980). Los alimentos más ricos en cobre son los crustáceos y mariscos y las vísceras, seguidos de avellanas, legumbres y pasas, frutas con hueso y cacao.

Se ha estimado que el cuerpo de un adulto sano contiene aproximadamente 80 mg de cobre, aunque la variabilidad individual es alta. En general, neonatos e individuos jóvenes contienen mayores niveles que adultos de la misma especie. Estos niveles caen de forma estable tras la lactancia y durante el periodo de crecimiento hasta alcanzar los valores propios del adulto (Underwood, 1977).

La distribución del cobre entre los tejidos depende de la especie, la edad y el estado del cobre del individuo, pero parece ser que en seres humanos el hígado y el cerebro contienen similares proporciones de cobre, aunque esta es solo una pequeña parte del total. Otros tejidos de alto contenido en cobre son: riñones y corazón, además del cabello. El hueso por su parte presenta un contenido intermedio de este metal.

Los diferentes tejidos responden con distinta intensidad a las variaciones en la ingesta de cobre. Hígado, riñón, sangre, bazo, pulmón, cerebro y hueso son particularmente reactivos ante dichos cambios.

En los glóbulos rojos, en torno al 60% del cobre –incluso más– se encuentra unido a una proteína prácticamente incolora, generalmente denominada *eritrocupreína*, o con frecuencia *hemocupreína*. Esta proteína forma parte de un grupo de proteínas solubles con afinidad por el cobre que pueden encontrarse en diversos tejidos. La eritrocupreína humana posee además dos átomos de zinc y tiene actividad similar a la *superóxido-dismutasa* (SOD), Convirtiendo dos radicales superóxido monovalentes en agua oxigenada y oxígeno molecular con el concurso de dos

protones. En el eritrocito, el resto del cobre no unido a eritrocupreína está escasamente unido a proteínas y cuando lo hace, se une de forma menos estable.

En el plasma sanguíneo, el cobre se encuentra también de dos formas: la principal, unido fuertemente a la “proteína azul de cobre” o *ceruloplasmina*, una α_2 -globulina. En la mayoría de los mamíferos el 90% del cobre plasmático se encuentra unido a ceruloplasmina, encontrándose correlaciones altamente significativas entre niveles de ceruloplasmina, cobre sérico y plasmático y contenido total de cobre en sangre.

La ceruloplasmina es una auténtica oxidasa (*ferroxidasa*) involucrada en la utilización de hierro y que aumenta la saturación de transferrina en plasma. No juega un papel significativo en el transporte de cobre ya que la cantidad de cobre unido a ceruloplasmina intercambiado diariamente es pequeña en comparación con la cantidad absorbida en el tracto intestinal. El verdadero transportador sanguíneo de cobre es la *albúmina*. Además, una pequeña proporción del cobre plasmático se encuentra unido a aminoácidos y como cobre-metaloenzimas, en cantidades variables según el estado del cobre del individuo.

En mamíferos es habitual que el cobre plasmático sea superior al contenido en los eritrocitos. Teniendo en cuenta que el cobre plasmático es mucho más lábil que el corpuscular, este último es mejor indicador del estado del cobre en el organismo que el cobre en sangre. 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).

La concentración plasmática de cobre no aumenta después de las comidas ni desciende durante el ayuno. Tampoco parece tener un patrón cíclico. Además, tal como hemos comentado, estos niveles son similares en hombres y mujeres, si bien las mujeres tienen valores discretamente más elevados. Las mujeres que toman anticonceptivos presentan valores aumentados de cobre. En apariencia, dicho fenómeno es debido a un efecto estrogénico, ya que la administración de estradiol en

hombres y de estilbestrol en ratas también produce elevación del cobre plasmático. Niveles plasmáticos elevados de cobre han sido bien documentados durante el embarazo humano. Estos niveles volvieron a la normalidad a las pocas semanas tras el parto. En seres humanos, el neonato a término posee aproximadamente un tercio de los niveles plasmáticos de cobre observados en el adulto, presentando una elevación no lineal hasta la edad adulta a diferencia del cobre total en sangre, que ya ha sido comentado (Underwood, 1977).

Ingestas insuficientes de cobre se correlacionan con niveles bajos de cobre en sangre en seres humanos. Algunas sustancias disminuyen la absorción de cobre y pueden disminuir su concentración en plasma cuando son ingeridos en altas cantidades o influir en su absorción de forma variable.

Incrementos moderados en la ingesta de cobre en dietas normales parecen tener escaso efecto en los niveles sanguíneos de cobre. Se requieren ingestas muy elevadas, tal como 750 ppm para producir hipercupremia grave en cerdos, si bien esta puede ser prevenida si dicha ingesta se acompaña de 500 ppm de zinc. En las fases finales del envenenamiento por cobre, el nivel sanguíneo de este metal puede ser hasta 10 veces el valor normal (Underwood, 1977).

La hipocupremia se asocia a nefrosis y *Enfermedad de Wilson*. También se da en *Kwashiorkor* y en fibrosis quística, asociada al déficit de ingesta de proteínas. Pacientes nefróticos y aquellos que padecen la Enfermedad de Wilson muestran niveles séricos de cobre en torno a la mitad de lo normal. En esta enfermedad existe una correlación entre la cupremia y los niveles de ceruloplasmina, que se encuentra en el límite bajo de la normalidad, aunque algunos individuos sanos muestran niveles de ceruloplasmina anormalmente bajos.

Niveles bajos de cobre en sangre y ceruloplasmina han sido hallados también en pacientes afectados de *Síndrome de Menkes*. Esta entidad, caracterizada por cambios degenerativos en el cerebro y arterias, alteraciones en el cabello y lesiones óseas; se

produce a causa de la deficiencia de cobre secundaria a un defecto *ligado al X* de la proteína intestinal transportadora de cobre (Underwood, 1977).

La mayoría de las infecciones agudas o crónicas, bacterianas o víricas en seres humanos producen hipercupremia. También puede darse en la leucemia, *Enfermedad de Hodgkin*, anemias, colagenopatías, hemocromatosis e infarto miocárdico. Tanto el cobre sérico como la ceruloplasmina se ven elevadas en el establecimiento de los síntomas durante la infección, asociándose a redistribución del metal desde el hígado a la sangre, posiblemente debido a citocinas, que estimularía el hígado para la síntesis de cantidades adicionales de ceruloplasmina. También se eleva el cobre sérico en pacientes afectados de pelagra (Underwood, 1977).

El cobre es absorbido en el estómago y en todo el intestino delgado, especialmente en la parte alta del mismo. En la mayoría de las especies la proporción absorbida es baja y es influenciada por la edad del individuo y por la cantidad y la forma química del cobre ingerido, y por los niveles en la dieta de otros iones metálicos y sustancias orgánicas, de modo que complejos pequeños y estables pueden aumentar la absorción intestinal de este metal. Algunos factores dietéticos inorgánicos pueden influenciar de forma notable la absorción de cobre. Entre estos se incluyen principalmente calcio, cadmio, zinc, hierro, plomo, plata, además de molibdeno y azufre administrados conjuntamente (Underwood, 1977).

Existen evidencias de que la absorción de cobre en el intestino es regulada según las necesidades de cobre del organismo, al menos cuando la ingesta es escasa. En ratas y ratones se ha observado que la absorción aumenta con el déficit plasmático de cobre así como con la baja ingesta. La absorción aumenta de forma paralela a la ingesta hasta alcanzar un punto de "saturación" en la que deja de aumentar (Underwood, 1977).

El cobre que accede al plasma sanguíneo procedente del intestino se adhiere de forma laxa a la albúmina y aminoácidos, siendo de esta forma distribuido ampliamente a lo largo del organismo y pudiendo acceder así a los eritrocitos. Este *almacén*

plasmático también recibe cobre de los tejidos. Recordemos que la ceruloplasmina sérica tiene una tasa de unión al cobre demasiado lenta para suponer un buen método de transporte de este metal, por lo que no juega un papel principal en dicho transporte.

El hígado es el principal órgano encargado del almacenamiento del cobre y un órgano diana en el metabolismo de este metal. A su llegada a este órgano, el cobre se distribuye de forma variable por núcleos, mitocondrias, microsomas y otras localizaciones celulares. En este punto, el cobre se almacena o se libera para su unión a eritrocupreína (sintetizada en la médula ósea), ceruloplasmina (de síntesis hepática) o alguna de las numerosas cuproenzimas. El hígado es además el principal órgano involucrado en la eliminación de cobre, que es excretado por la vía biliar. En cuanto a la excreción de cobre, se ha estimado que de los 2-5 mg de cobre ingeridos diariamente por una persona, 0,6-1,6 mg (32%) son absorbidos, 0,5-1,3 mg son excretados por la bilis, 0,1-0,3 mg pasan a través del intestino y 0,01-0,06 mg son eliminados por la orina (Underwood, 1977).

Pérdidas insignificantes de cobre han sido halladas en sudor. En el flujo menstrual normal se producen también pérdidas de cobre que se estiman en una media de 0,5 mg de cobre por periodo, lo que supone un mejor balance durante la menstruación que el que se produce en el caso del hierro (Underwood, 1977).

El déficit de cobre mantenido produce anemia y disminución del número de reticulocitos, disminuyendo también la vida media del eritrocito.

La deficiencia de cobre produce alteración de la capacidad para absorber hierro, movilizarlo desde los tejidos y utilizarlo en la síntesis de hemoglobina. En estos casos, el hierro también se acumula en la mucosa duodenal y existe alteración de su transporte hacia el plasma. La liberación de hierro al plasma desde el SRE, el parénquima hepático y los normoblastos requiere del concurso de la ceruloplasmina. Esta proteína acelera enormemente la oxidación del hierro ferroso a férrico, y de ella depende la formación de transferrina-Fe³⁺. Sin ella, la tasa de oxidación del hierro en

plasma es insuficiente para las demandas de los tejidos eritropoyéticos y el desarrollo normal de los reticulocitos (Underwood, 1977).

Alteraciones en el equilibrio del cobre se relacionan también con otras enfermedades tanto humanas como veterinarias, como son la ataxia neonatal, acromotriquia, defectos en la queratinización (Síndrome de Menkes), infertilidad, alteraciones cardiovasculares y del metabolismo de ácidos grasos. Por otra parte, es bien conocida la enfermedad de Wilson, que produce acumulación de cobre en hígado, cerebro, riñón y córnea.

Si bien es infrecuente, la intoxicación por cobre puede producir vómitos, dolor abdominal, diarrea e ictericia. Asimismo, el contacto con grandes cantidades de cobre puede ocasionar decoloración del cabello (verde). Los síntomas pueden abarcar: anemia, sensación de ardor, escalofríos, convulsiones, diarrea (a menudo con sangre y puede ser de color azul), fiebre, insuficiencia hepática, sabor metálico, dolores musculares, náuseas, oligo-anuria, dolor, shock, vómitos, debilidad (Heller y Zieve, 2010).

Recordemos que el hueso está formado por una estructura colágena (osteoide) sobre la que se depositan sales de hidroxapatita. La matriz colágena del hueso, al igual que otros tipos de colágeno, precisa del enzima *lisil-oxidasa* para su síntesis. La lisil-oxidasa –enzima que contiene cobre– cataliza el entrecruzamiento de lisina e hidroxiprolina en la colágena contribuyendo a la fuerza mecánica y tenacidad de las fibras de colágena. Se ha observado que la deficiencia de cobre provoca una disminución en la resistencia del hueso en modelos animales (Jonas *et al.*, 1993) y humanos, habiéndose descrito alteraciones óseas similares a las halladas en el escorbuto (Zelkowitz *et al.*, 1980).

No obstante, como pasa con el resto de oligoelementos, los resultados son dispares. Por ejemplo Mutlu *et al.* (2007) no encuentran diferencias en los niveles de cobre sérico entre mujeres postmenopáusicas con o sin osteoporosis, resultado parecido al de Odabasi *et al.* (2008), quienes tampoco encuentran diferencias entre los

niveles séricos de cobre en 77 mujeres osteoporóticas en relación con controles. Conlan *et al.* (1990) encuentran niveles descendidos de cobre en individuos con fractura de cadera, y Howard *et al.* (1992) lo encuentran en individuos con bajo BMD. Por el contrario, Milachowski *et al.* (1980) no encuentran diferencias en los niveles de cobre en individuos con y sin fractura de cadera. Sin embargo se sabe que los niveles de cobre pueden no reflejar el depósito real de cobre del organismo (Danzeisen *et al.*, 2007). Klevay y Wildman en (2002) no encuentran relación entre los niveles óseos de cobre y osteoporosis en un modelo experimental; y Lappalainen *et al.* (1982) encuentran que el cobre óseo era similar en individuos osteoporóticos y no osteoporóticos. Por otra parte, en niños que sufrieron déficit nutricional de cobre aparece osteoporosis y retraso en el crecimiento óseo, acompañado de múltiples fracturas, que respondieron de forma espectacular al tratamiento mediante suplementación con cobre (Schmidt *et al.*, 1991). Resultados superponibles, son los referidos por Velin *et al.* (1989) en un niño prematuro afecto de déficit de cobre. Por el contrario, Kaji *et al.* (1988) en embriones de pollo, encuentran que la suplementación con cobre desplaza el depósito de calcio en la diáfisis, generando osteoporosis.

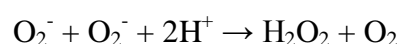
En los síndromes de deficiencia de cobre que debutan en la infancia se ha encontrado anomalías del desarrollo de las metáfisis, adelgazamiento cortical y reacción perióstica, habiéndose descrito también fracturas patológicas (al-Rashid y Spangler, 1971). De hecho en niños con déficit de cobre se ha descrito un cuadro esquelético parecido al escorbuto con osteoporosis, formación de escaras, calcificación de tejidos blandos y espolones metafisarios.

Tal como hemos comentado, la similitud del déficit de cobre con el escorbuto ha suscitado que se haya pensado en que el déficit de cobre afecta a la actividad de una cuproenzima, la *ascorbato-oxidasa*. Lo que parece claro es que el cobre es un elemento esencial para la formación de hueso, siendo al parecer relevante –aunque no exclusivo– su efecto sobre el entrecruzamiento de las fibras de colágena (Karcioglu, 1980). Diversos autores han estudiado el efecto de los suplementos de cobre sobre el hueso, existiendo un acuerdo general, aunque no unánime (Yee *et al.*, 1995), de que los suplementos de cobre benefician o mejoran la osteopenia en diversas situaciones,

como osteopenia inducida por ovariectomía en ratas (Rico *et al.*, 2000; Lowe *et al.*, 2002; Klevay, 1998).

Se sabe que además del entrecruzamiento de las fibras de colágeno, el déficit experimental de cobre altera y retrasa la formación de hueso nuevo, el hueso cortical recién sintetizado es anormalmente fino, mientras que el hueso trabecular se caracteriza por trabéculas adelgazadas y disminución global de la masa ósea (Karcioglu, 1980).

Otro aspecto que no se puede olvidar del metabolismo del cobre es su función como cofactor de la Superóxido Dismutasa (SOD). La SOD cataliza la unión de dos aniones superóxido -extremadamente reactivos- en molécula de agua oxigenada y oxígeno:



El agua oxigenada es mucho menos lesiva que el anión superóxido, por lo que el cobre es otro elemento importante en la cadena antioxidante. Tal vez ese efecto pudiera estar relacionado también con los beneficios sobre la estructura ósea que comentamos previamente.

La síntesis del *grupo prostético* de la SOD, el *hemo*, es una de las principales funciones del cobre. Se ha encontrado descenso en la actividad de la citocromo oxidasa en centros de osificación –además de en otros tejidos– como resultado de fallo en la síntesis del grupo hemo. También se ha relacionado el déficit de cobre con bajo nivel de actividad osteoblástica (Karcioglu, 1980).

La acción del etanol sobre el cobre óseo es discutida. Algunos autores no han encontrado que el cobre óseo se modifique por la acción del etanol (Bogden *et al.*, 1984; González-Reimers *et al.*, 1998). Sin embargo otros encontraron un descenso del cobre óseo en ratas alimentadas con etanol, descenso que era paralelo a la disminución de la masa ósea (Preedy *et al.*, 1991).

Si parte del efecto beneficioso del cobre en el hueso puede depender de su acción antioxidante, se puede formular la hipótesis de que tal vez la acción concomitante del selenio pueda potenciar su acción sobre el hueso. Esto constituye uno de los objetivos del presente trabajo.

3.3 MANGANESO

Las necesidades de Manganeseo de un adulto sano se estiman entre 2-5 mg (Underwood, 1977). Las dietas humanas comunes contienen manganeseo en abundancia, encontrándose en frutos secos, cereales, tubérculos, frutas, vegetales sin hoja y tejidos y fluidos animales, principalmente.

El contenido de manganeseo del organismo es muy inferior al de los elementos hasta ahora analizados, por lo que sus efectos metabólicos son también peor conocidos. Se estima que un ser humano de 70 Kg de peso contiene en su cuerpo entre 12 y 20 mg de manganeseo distribuidos de forma más o menos uniforme. Se encuentran variaciones relativamente pequeñas entre órganos o con la edad (Underwood, 1977).

Lo que sí es cierto es que el manganeseo está más concentrado en las mitocondrias, por lo que tiende a ser más alta su concentración en tejidos que contienen a estas en abundancia. Así, huesos, hígado y riñón poseen habitualmente mayor carga de manganeseo que otros tejidos. Los niveles de manganeseo en hueso pueden modificarse variando sustancialmente la ingesta de este metal (Underwood, 1977).

La concentración en sangre de este metal parece variar ampliamente en humanos sanos: desde 8,45 µg/L hasta 69 µg/L, aproximadamente; encontrándose además resultados controvertidos en su distribución entre plasma y eritrocitos. Eventos isquémicos coronarios agudos parecen aumentar el manganeseo en sangre

hasta el doble de los niveles normales, elevación que puede persistir hasta varias semanas después. También puede encontrarse aumento de los niveles de manganeso eritrocitarios en pacientes afectados de *Artritis Reumatoide*. Se han hallado indicios de la influencia de estrógenos sobre los niveles de manganeso en plasma de gallinas (Underwood, 1977).

La absorción intestinal de manganeso es de solo un 3-4%. Esta se produce por igual a lo largo de prácticamente todo el tracto digestivo por un mecanismo de dos pasos que incluye la captación desde la luz intestinal y su posterior transferencia a través de las células de la mucosa intestinal. Estos dos procesos operan simultáneamente, con el manganeso compitiendo con hierro y cobre en ambos casos. De hecho, la absorción de manganeso parece estar aumentada en casos de déficit de hierro, disminuyendo a su vez con la administración oral de hierro. Resulta aparente que los mecanismos de absorción del manganeso y el hierro resultan similares, no así sus mecanismos de excreción (Underwood, 1977)

Si bien no se han encontrado diferencias en la absorción de manganeso en distintas formas químicas, existen algunas evidencias que apoyan que el calcio disminuye el manganeso disponible en la luz intestinal por adsorción del mismo y además dificulta su retención hepática (Underwood, 1977).

La alimentación con etanol ha demostrado incrementar el manganeso hepático. Aparentemente esto se debe a un incremento significativo en la absorción, doblándola, mediada por el metabolismo del etanol en el intestino (Underwood, 1977).

El manganeso absorbido en la circulación portal puede permanecer libre, o bien rápidamente unirse a α_2 -macroglobulina antes de atravesar el hígado, donde la mayor parte de este manganeso unido a proteína es extraído, permaneciendo solo una pequeña parte unido a la α_2 -macroglobulina, que pasará a la circulación sistémica, siendo oxidado a estado mangánico y unido a transferrina (Underwood, 1977).

El aclaramiento del manganeso sucede en tres fases. La primera, similar a otros iones pequeños, sugiere movimiento normal del ion por transcilaridad; la segunda fase consiste en la entrada del metal en las mitocondrias; la tercera, más lenta debido a la baja tasa de recambio de los núcleos celulares, consiste en la entrada de manganeso en estos. Los patrones de aclaramiento sanguíneo y de captación de manganeso en el hígado son similares, indicando que ambas reservas entran rápidamente en equilibrio (Underwood, 1977).

Una fracción importante del manganeso absorbido en el tracto digestivo aparece prontamente en la bilis, siendo excretado con las heces. Aunque parece que en los bóvidos la excreción de manganeso tiene lugar por secreción intestinal, se interpreta que este mecanismo juega un papel secundario en la homeostasis del manganeso. El manganeso absorbido es excretado prácticamente en su totalidad por la vía intestinal por varias rutas independientes que se combinan proveyendo un mecanismo eficiente para mantener la homeostasis de este metal. En condiciones normales, el flujo biliar constituye la principal vía de excreción. La concentración de manganeso en este fluido puede alcanzar hasta 10 veces o más los valores normales ante situaciones de sobreingesta de este metal. En caso de bloqueo de la vía biliar o situaciones de sobrecarga, la secreción pancreática aumenta. También se produce excreción de manganeso en duodeno y yeyuno, y en menor cuantía en íleon terminal, aunque estas son rutas auxiliares. En condiciones normales este metal se excreta escasamente en orina (Underwood, 1977).

Existen hallazgos que sostienen que la regulación homeostática de este metal se produce en gran medida por regulación de la excreción. Aunque parece que la absorción también desempeña un papel importante en su homeostasis (Underwood, 1977).

Se ha demostrado déficit de manganeso en diversos animales, adquirido de forma natural a causa de ciertas dietas. También ha sido observado en seres humanos en asociación a déficit de *vitamina K*. Las manifestaciones de este déficit dependen del grado y duración del mismo y de la edad y estado de desarrollo del sujeto. Las

principales manifestaciones son: alteraciones de la función reproductiva, ataxia del recién nacido, defectos en el metabolismo de lípidos e hidratos de carbono, defectos en el crecimiento y anomalías esqueléticas.

Como comentábamos, hay datos que sugieren que la deficiencia de manganeso provocada artificialmente en modelos experimentales de animales recién nacidos se asocia a retraso en el crecimiento óseo y alteraciones de la configuración del cráneo, habiéndose descrito también arqueamiento de las patas e incapacidad para la deambulación en diversos tipos de modelos animales con afectación importante del cartílago de crecimiento. En estos modelos, al parecer la mineralización no estaba afectada, lo que enfocó la investigación a analizar los efectos del déficit de manganeso sobre la síntesis de la matriz orgánica del cartílago, habiéndose demostrado que hay defectuosa síntesis de los mucopolisacáridos del tipo condroitín sulfato. Se sabe actualmente que esta reducción del contenido de mucopolisacáridos del osteoide se debe a una defectuosa actividad de la glicosil-transferasa, enzima manganeso-dependiente (Leach, Jr. *et al.*, 1969). Esta defectuosa síntesis de la matriz osteoide justifica que el déficit prolongado de manganeso se asocie a osteoporosis en modelos de ratas. La defectuosa actividad de esta enzima afecta también a otras estructuras como por ejemplo los glicosaminoglicanos de la pared aórtica, seriamente afectada en las situaciones de déficit de manganeso (Kalea *et al.*, 2006).

Rico *et al.* (2000) encontraron niveles descendidos de manganeso en individuos con osteoporosis. Sin embargo otros estudios que han tratado de encontrar diferencias en los niveles de manganeso en relación con la presencia o no de osteoporosis, han arrojado resultados negativos. Así Bureau *et al.* (2002) no encuentran diferencias significativas en los niveles de manganeso en mujeres postmenopáusicas sometidas a tratamiento hormonal. Preisinger *et al.* (1995) no encuentran diferencias en la ingesta de manganeso entre mujeres con y sin osteoporosis.

De forma parecida al cobre, el manganeso es también un cofactor de la SOD, por lo que también su déficit podría jugar un papel en la lesión oxidante asociada al

consumo de alcohol y de esa forma influir en la osteopatía del alcohólico. Con respecto al manganeso, es especialmente relevante considerar además el estado nutricional y el aporte de proteínas, ya que como el zinc, es un elemento fuertemente ligado a proteínas animales.

El manganeso es de los oligoelementos menos tóxicos para los mamíferos. La intoxicación por manganeso retarda el crecimiento y disminuye el apetito, con disminución del peso corporal. Los efectos adversos sobre el crecimiento parecen deberse principalmente a dicha disminución del apetito. También se ha encontrado disminución de niveles plasmáticos de hierro en un experimento llevado a cabo en ovejas intoxicadas con manganeso (Underwood, 1977). Sin duda, esto se debe a la interacción competitiva en la absorción intestinal de estos dos metales, tal como se ha comentado previamente.

El envenenamiento crónico por manganeso es como poco, infrecuente en seres humanos, especialmente el causado por ingesta excesiva. Sin embargo, en ocasiones ocurre en mineros que trabajan en la extracción de este metal, que inhalan enormes cantidades de polvo de óxido de manganeso además de ingerirlo por contaminación de su entorno. Los pulmones actúan como reservorio que mantiene una absorción continua. Este envenenamiento se caracteriza por una alteración psiquiátrica grave (*locura mangánica*) que recuerda a la esquizofrenia, seguida de una alteración neurológica permanente e incapacitante similar a la *Enfermedad de Parkinson* (Underwood, 1977).

3.4 ZINC

Los requerimientos mínimos de este metal en humanos varían según la dieta, condiciones climáticas y el estrés orgánico. La Academia Nacional de Ciencias (EEUU) recomienda 3-5 mg/día para niños hasta 10 años; 10mg para hombres entre 11-51 años; 15 mg para mujeres de la misma edad; 20 mg para embarazadas y 25 mg para

mujeres en periodo de lactancia. Un adulto sano ingiere normalmente unos 10-15 mg de zinc al día (Underwood, 1977).

Las fuentes más ricas de zinc son las ostras y en menor medida otros alimentos procedentes del mar, la carne, los cereales (en grano) y las avellanas.

El cuerpo humano contiene de 1,4 a 2,3 g de zinc. Aproximadamente el 90% se encuentra en el tejido muscular, óseo, en la piel y en el pelo, mientras que circulando en sangre se encuentra menos del 1% (Underwood, 1977).

El zinc está presente en la sangre, tanto en el plasma como en sus elementos formes. El 30-40% del zinc contenido en plasma se encuentra firmemente unido a una α_2 -macroglobulina y el 60-70% lo está, aunque de forma más laxa, a la albúmina. Casi todo el zinc de los eritrocitos se encuentra en la *anhidrasa carbónica*, junto con una pequeña fracción asociada a otras enzimas. El 75-88% del zinc total en sangre humana 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%. Este incremento se debe en gran medida a la destrucción de las plaquetas durante la coagulación, a un leve aumento de la solubilidad y una pequeña parte debida a hemólisis (Underwood, 1977).

En recién nacidos, el contenido de zinc de los eritrocitos es solo una cuarta parte del hallado en adultos, aumentando progresivamente hasta los 12 años. Se presupone que esto se debe a la escasa cantidad de anhidrasa carbónica presente en los eritrocitos de neonatos y prematuros.

En adultos sanos, los valores de zinc en sangre son los siguientes: $8,8 \pm 0,2$ $\mu\text{g/ml}$ de zinc en sangre, $1,21 \pm 0,19$ $\mu\text{g/ml}$ en plasma y $14,4 \pm 2,7$ $\mu\text{g/ml}$ en eritrocitos. Las variaciones diarias de un mismo individuo, además de pequeñas, presentan un ritmo circadiano relacionado con la ingesta de alimentos. El contenido en plasma de este metal desciende a los niveles de ayuno tres horas después de la ingesta (Underwood, 1977). Se han encontrado diferencias regionales en EEUU en cuanto a los niveles en

plasma de zinc en hombres sanos, presumiblemente reflejando diferencias dietéticas en la ingesta de este metal (Underwood, 1977).

Los niveles de zinc en plasma caen en mujeres en el embarazo avanzado así como con la toma de anticonceptivos (Underwood, 1977).

Ingestas cuantiosas de zinc incrementan en gran medida la cantidad total en sangre y la concentración plasmática de zinc en ratas y otros mamíferos. Lo contrario sucede en animales alimentados con dietas deficientes en este metal. La caída de los niveles plasmáticos de zinc es muy marcada en el primer día, haciéndose menos brusca hasta el 5º día de déficit y en adelante se estabiliza. La adición de zinc restaura los valores a la normalidad (Underwood, 1977).

Enfermedad y estrés producen cambios de la concentración en sangre de este metal. Se han hallado valores inferiores a lo normal en pacientes con tumores malignos, aterosclerosis, enfermedad hepática (incluyendo cirrosis hepática alcohólica), tuberculosis y lepra, anemia perniciosa no tratada, infecciones crónicas o agudas, lesión tisular y presencia de endotoxina de forma dosis dependiente. También la administración de grandes dosis de corticosteroides a pacientes con estrés quirúrgico o quemados, que presentaban bajo gasto cardiaco produjo un descenso rápido y sostenido del nivel de zinc en suero (Underwood, 1977).

El zinc es absorbido principalmente en el intestino delgado, presentando escasa absorción en estómago o intestino grueso. El control homeostático del zinc corporal es alcanzado, en parte, a través de la regulación de la absorción. La captación se lleva a cabo por medio de una proteína de unión al zinc, secretada por el páncreas, transportada a través de las microvellosidades al interior de la célula epitelial, y transferida al lado plasmático de la membrana basolateral por medio de sitios de unión específicos. Ya aquí, se uniría al a albúmina plasmática. La cantidad de zinc unido a albumina en el plasma determinaría la cantidad de zinc que se libera de la membrana basolateral, y por tanto la cantidad de zinc que entra en el organismo (Underwood, 1977).

Se sabe que el zinc de la dieta es secuestrado en el interior de las células epiteliales intestinales por proteínas de unión formadas en respuesta al propio zinc, de esta manera, inhiben su transferencia a la albúmina sérica y permiten la excreción del zinc secuestrado mediante la descamación del epitelio mucoso. El calcio, el cobre y otros metales inhiben la absorción de zinc, al menos en parte, compitiendo por los sitios de unión de la albúmina. La competición por la unión a la proteína secretada por el páncreas constituiría otra oportunidad para inhibir la absorción de zinc (Underwood, 1977).

La absorción de zinc varía con la concentración en la dieta y con la presencia de otros componentes de la misma. También hay resultados contradictorios respecto a variación de la absorción con la edad (Underwood, 1977).

Como mencionamos anteriormente, el calcio interfiere con la absorción de zinc, por lo que una ingesta baja de calcio favorece su absorción. Además, la reabsorción ósea producida por la ingesta deficiente de calcio produce movilización del zinc óseo, disminuyendo los efectos de su déficit. El zinc óseo sólo es movilizado en condiciones de destrucción del hueso, fisiológicas o no, y una vez es liberado es utilizado inmediatamente en procesos metabólicos (Underwood, 1977).

También la ingesta elevada de fosfato inorgánico agrava el déficit de zinc en ratas. Su efecto parece ser independiente y aditivo al del calcio. Se ha establecido claramente una acción independiente del fósforo en la absorción de zinc. Además, la forma química del zinc ingerido influye sobre la disponibilidad del mismo para el organismo. Así, es igualmente bien absorbido como óxido, carbonato, sulfato o en forma metálica; sin embargo, el sulfuro de zinc, y el óxido de zinc junto a hierro y manganeso, demostraron ser aportes de zinc mucho menos absorbibles. También los fitatos disminuyen la absorción de zinc uniéndose a él y dificultando su absorción. Por otro lado, la caseína y extractos de hígado pueden aumentar la absorción de este metal, así como mejorar su utilización (Underwood, 1977).

Otros factores han probado ser relevantes en la absorción de zinc, como son la cantidad de alimento del individuo, la velocidad del tránsito intestinal y la etapa de crecimiento (Underwood, 1977).

Ya se ha comentado con anterioridad el antagonismo existente entre zinc y cobre en cuanto a la absorción intestinal de estos metales. Parece que este se halla a nivel de la transferencia desde la mucosa al plasma. Lo mismo sucede con otros metales divalentes (Underwood, 1977).

En cuanto a la excreción de este metal, ocurre principalmente por las heces. La mayor parte del zinc que encontramos en heces proviene de la dieta, no habiéndose absorbido hasta el 70%, tanto en dietas de alto contenido en zinc, como de contenido normal. Además, una cantidad de origen endógeno es secretada hacia el intestino delgado. Se sabe también que pequeñas cantidades de zinc son secretadas hacia la bilis, el ciego y el colon. Aproximadamente un 0,25-0,3% del zinc administrado por vía oral es excretado en la orina. Normalmente en humanos adultos esta cantidad corresponde a 0,3-0,6 mg/día. Este patrón de excreción es similar en dietas muy ricas en zinc y también en dietas con contenido normal de este metal (Underwood, 1977).

En dietas pobres en zinc la excreción se reduce, poniendo de manifiesto la contribución de este mecanismo al control homeostático de este elemento, alcanzado principalmente mediante el aumento de la absorción, tal como se ha comentado previamente (Underwood, 1977).

La excreción urinaria de zinc aumenta en algunas situaciones como la nefrosis, la cirrosis hepática alcohólica, y la porfiria hepática. También puede observarse este hecho en la inanición absoluta y en la administración de sustancias quelantes como DTPA y EDTA (*ácidos dietilen-triaminopentaacético y etilen-dinitrilo-tetraacético*, respectivamente; Underwood, 1977).

El sudor puede constituir una fuente importante de excreción de zinc, con una media de $1,15 \pm 0,30$ $\mu\text{g/ml}$, pudiéndose llegar a excretar unos 4 mg de zinc al día en individuos de climas tropicales. Esta cantidad se reduce aproximadamente a la mitad

en pacientes con déficit de zinc. La mayor parte de este zinc se encuentra en la fase acuosa, no asociado a elementos celulares, como sucede con el hierro (Underwood, 1977).

Las pérdidas menstruales de este metal apenas parecen ser significativas, estimándose en unos 450 μg /periodo, unos 15 μg /día, lo que supone una milésima parte de la ingesta normal (Underwood, 1977).

El zinc absorbido por el intestino es transportado al hígado unido a transferrina en el plasma del sistema portal. En plasma venoso el zinc está unido en su mayoría a la albúmina y en pequeñas cantidades a la transferrina y otras α_2 -macroglobulinas. Este zinc es incorporado a velocidad variable a los diversos tejidos, revelando tasas de recambio diferentes; así, la captación de este metal por el tejido óseo es lenta y permanece en este tejido por largos periodos. Este zinc normalmente no está disponible de forma rápida para su uso metabólico, al contrario que el que se halla en páncreas, hígado, riñón o bazo (Underwood, 1977).

El principal órgano involucrado en el metabolismo del zinc es el hígado, en cuyo citosol abundan sustancias afines por el zinc (y el cobre). La cantidad y proporción de estas varía según el estado de la reserva de zinc. El incremento de la cantidad de zinc hepático se ha asociado a la cantidad de este metal que se encuentra en forma de *metalotioneína* o *metalotioneína-like*. Estas proteínas aumentan proporcionalmente al aumento de la entrada de zinc al organismo. Así, el papel de la metalotioneína como reserva proteica de zinc es análogo al de la ferritina para el hierro. La labilidad de esta unión hace posible su función como almacén temporal previo a su utilización en funciones metabólicas esenciales. La unión del zinc a estas proteínas en las células de la mucosa intestinal en situaciones de sobrecarga de zinc previene que se una a la albúmina, contribuyendo así al control metabólico de este metal (Underwood, 1977).

El zinc se une rápidamente en plasma a las proteínas del mismo, pero entra a formar parte de los elementos formes de la sangre más lentamente. El aclaramiento

también sigue este patrón. También es transportado rápidamente a través de la placenta (Underwood, 1977).

Son muchas las alteraciones que se producen a causa del déficit de zinc, como alteraciones en el crecimiento y en el desarrollo esquelético, en el apetito, gusto, queratogénesis, reproducción, cicatrización, desarrollo cerebral y comportamiento, y metabolismo de proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos; también produce alteración de funciones enzimáticas, cambios hematológicos y desarrollo de aterosclerosis (Underwood, 1977). De las más relevantes para este trabajo se hablará a continuación.

El zinc juega un papel importante en el metabolismo del tejido conectivo, actuando como cofactor de enzimas como la fosfatasa alcalina (necesaria para la mineralización ósea) y las colagenasas (esenciales para el desarrollo de la estructura de colágena del hueso). Además, hay estudios que demuestran que el aporte de zinc aumenta el crecimiento óseo (Díaz-Gómez *et al.*, 2003).

El déficit de zinc, por otro lado, provoca un deterioro en la síntesis de ADN y del metabolismo proteico. Enzimas como la ARN polimerasa y ADN polimerasa, relevantes para la división celular y la síntesis proteica, son zinc-metaloenzimas, cuya actividad enzimática depende de la presencia de zinc. Además, muchas otras dipeptidasas, decarboxilasas y deaminasas importantes en el metabolismo de los aminoácidos, necesitan zinc como cofactor; y finalmente debe resaltarse el efecto inhibitorio del zinc sobre la actividad de la prolil-hidroxilasa, enzima que juega un papel esencial en la síntesis de colágena. Se ha atribuido al déficit de zinc propio del alcohólico un papel importante en la progresión de la hepatopatía etílica (Kang *et al.*, 2009). De forma parecida al selenio, la mayor parte de los autores han encontrado déficit de zinc en el alcohólico crónico, especialmente si se asocia a cirrosis hepática (Sullivan y Heaney, 1970).

El déficit de zinc altera el crecimiento del hueso debido fundamentalmente a una disminución de la actividad osteoblástica. Los primeros estudios relativos al déficit de

zinc se realizan en aves y mamíferos en crecimiento, observándose una defectuosa condrogénesis, atrofia del cartílago epifisario y disminución de la actividad mitótica de los condrocitos. Eso provoca que el crecimiento de los huesos largos se vea comprometido, observándose una talla reducida y un incremento de la anchura de los huesos. Estas alteraciones en mamíferos son parecidas a las que se observan en el déficit de manganeso. El déficit de zinc ejerce un efecto directo sobre el osteoblasto. De hecho se ha observado que el zinc es cofactor necesario para la acción de la IGF-1 y existen datos en humanos en los cuales el aporte de zinc incrementa el crecimiento fetal (Díaz-Gómez *et al.*, 2003; Merialdi *et al.*, 2004).

Al margen del efecto directo que pueda ejercer el zinc sobre el osteoblasto y el crecimiento óseo, hay que considerar otras vías teóricas por las que el zinc pueda influir sobre el hueso. Por una parte, el zinc es imprescindible para la función gonadal, de tal manera que el déficit de zinc provoca atrofia testicular y alteración de la espermatogénesis; también ejerce una función importante como antioxidante, por lo que su déficit podría causar aumento del daño oxidativo, y activación de osteoclastos por medio de RANKL; y por otra parte, es además cofactor de multitud de enzimas involucradas en la síntesis proteica, por lo que su déficit afecta al desarrollo muscular.

Las hormonas gonadales son necesarias para el normal desarrollo del hueso y del músculo, relacionándose a nivel experimental el déficit de testosterona con la disminución de la masa ósea en modelos de ratas alimentadas según el esquema de Lieber-DeCarli (Molina-Pérez *et al.*, 2000). Por otro lado, una adecuada masa muscular, por el efecto de tracción sobre el hueso, incrementa la masa ósea; de hecho la atrofia muscular se asocia a osteoporosis, siendo en este sentido el ejemplo más llamativo la osteopenia asociada a ingravidez (Aguirre *et al.*, 2006).

Como hemos comentado el zinc es cofactor de múltiples enzimas relacionadas fundamentalmente con la síntesis proteica, aunque también es cofactor de enzimas involucrados en los mecanismos antioxidantes, tales como la SOD y la propia GPX. El alcance del trastorno de los mecanismos antioxidantes en las lesiones óseas inducidas por el déficit de zinc no es conocido, aunque se sabe que la acumulación de radicales

libres es lesiva para la estructura y función de múltiples enzimas citosólicos. Teóricamente, el tratamiento con un cofactor antioxidante como es el selenio podría ser de utilidad en situaciones de déficit de zinc, ya que minimizaría el déficit de mecanismos antioxidantes. En el modelo de Lieber-DeCarli se ha observado déficit de zinc, habiéndose postulado que el déficit de zinc puede jugar un papel en la osteoporosis del alcohólico (González-Reimers *et al.*, 2005b).

El zinc es relativamente poco tóxico para mamíferos y aves, además, su toxicidad varía mucho en relación a la dieta y su contenido en otros elementos, especialmente calcio, cobre, hierro y cadmio, por lo que resulta complicado establecer de forma general un nivel tóxico mínimo, sin embargo, la mayoría de los autores encuentran efectos tóxicos en animales que ingieren dietas a partir de 3000 ppm de zinc. Otros, en cambio, encuentran efectos tóxicos en animales alimentados con dietas deficientes o marginales en cobre, partir de 300 ppm de zinc. Esto sugiere que la mayor parte del efecto tóxico de este metal se produce por el déficit de cobre (y también de hierro) que induce. La intoxicación por zinc produce disminución del crecimiento, anorexia, anemia, hemorragias, reabsorción fetal y alta mortalidad (Underwood, 1977).

3.5 SELENIO

El selenio es un elemento esencial cuyas necesidades mínimas diarias parecen depender de la formulación química del selenio ingerido y de la naturaleza del resto de la dieta. En general, una ingesta de 0,1 ppm basta para garantizar un aporte suficiente en animales de granja. Es conocido que en determinados lugares de China (Provincia de *Keshan*) se desarrolla una miocardiopatía en relación con el déficit intenso de selenio en la dieta de los habitantes de esta región debido a la extrema pobreza de selenio en el suelo. Se ha visto que en aves de corral se puede prevenir la aparición de esta miocardiopatía con dosis entre 0,17 y 0,28 ppm dependiendo de si se añade o no vitamina E.

Hasta 1977 se desconocía las necesidades exactas de selenio para el ser humano. Estudios llevados a cabo en Pekín (Yang y Xia, 1995) han establecido que una dosis de 17 $\mu\text{g}/\text{día}$ es la mínima necesaria para prevenir la *enfermedad de Keshan*, aunque el mantenimiento de los niveles adecuados de GPX requiere dosis de hasta 40 $\mu\text{g}/\text{día}$. Podían aparecer signos de toxicidad con dosis superiores a 1600 $\mu\text{g}/\text{día}$, y desaparecían si la dosis se rebajaba a $819 \pm 126 \mu\text{g}/\text{día}$. Por todo ello se concluye que dosis entre 400 y 600 $\mu\text{g}/\text{día}$ pueden ser dosis seguras.

Otros estudios llevados a cabo en China han encontrado que en suelos ricos en selenio la ingesta puede llegar a ser hasta de 1430 $\mu\text{g}/\text{día}$ (Yang *et al.*, 1989). Otros estudios llevados a cabo en lactantes confirman un requerimiento de selenio aproximadamente de 15 $\mu\text{g}/\text{día}$ para estos (Smith *et al.*, 1982).

La cantidad de selenio del organismo es fuertemente dependiente del estado nutricional, posiblemente porque guarde relación con el aporte y absorción de este elemento, que abunda especialmente en alimentos cárnicos.

El selenio se encuentra en los distintos tejidos a diferentes concentraciones, dependiendo de la ingesta y de la forma química en que se encuentra en la dieta. Hígado y riñón son habitualmente las vísceras más ricas en selenio, presentándose menor concentración de este metal en hueso, músculo y sangre (Underwood, 1977).

Se ha demostrado que el depósito de selenio en sangre, músculo, hígado, riñón y piel mantiene una relación directa con el nivel de selenio inorgánico en la dieta hasta dietas de 0,2-0,3 ppm. Incrementando estos valores hasta 0,8 ppm se produce un incremento de la concentración de este elemento en hígado y riñón, no así en los otros tejidos. En animales alimentados con 0,67 ppm de selenio orgánico se indujo mayor concentración de selenio en músculo, hígado y sangre que con ingestas similares de selenio en forma de selenito. Igualmente, ratas alimentadas con dietas deficientes en selenio presentan niveles descendidos de éste en riñones e hígado. Este descenso se ha encontrado también en otros estudios con diferentes animales. Algunos autores consideran en sus estudios que niveles inferiores a la mitad de lo normal en corteza

renal e hígado son indicativos de déficit de selenio en la dieta, y que niveles de una cuarta parte y una quinta parte, respectivamente, son indicativos de déficit severo (Underwood, 1977).

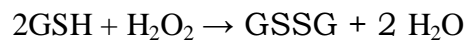
La concentración de selenio en sangre está fuertemente ligada a los cambios en la ingesta de este elemento. Los niveles de selenio en sangre en 210 varones americanos se encontraban entre 0,10 a 0,34 $\mu\text{g/ml}$, encontrándose algunos patrones regionales según el contenido en selenio de los cultivos, fenómeno también observado en otros países. Un estudio llevado a cabo en Nueva Zelanda, país que cuenta con áreas extensas de suelo pobre en selenio y donde no es raro que enfermedades por déficit de selenio se den en el ganado, reveló que la población nativa poseía valores inferiores de selenio en sangre que la población foránea y que los visitantes a ese país, presentaban descenso paulatino hasta igualarlos a los de la población local. A la luz de estos datos se sugiere que las variaciones de selenio en sangre puedan deberse a diferencias en la disponibilidad de selenio en la región (Underwood, 1977).

El suero humano de sujetos sanos presenta un valor promedio de selenio en torno a 0,118 $\mu\text{g/ml}$, variando poco entre estudios. Pacientes con cáncer, especialmente gastrointestinal presentan valores descendidos de selenio. Los pacientes con neoplasias del Sistema Retículo-Endotelial (SRE), en términos generales, presentan niveles de selenio sérico superiores a los valores normales. Otros pacientes con diversas alteraciones, médicas o quirúrgicas, muestran en su mayoría valores normales de selenio sérico. También se han encontrado niveles descendidos de selenio en niños afectos de Kwashiorkor (Underwood, 1977).

El contenido de selenio en eritrocitos es mayor que en el plasma. Estos valores, en adultos sanos son de $0,130 \pm 0,014$ ppm en sangre y $0,102 \pm 0,018$ ppm de selenio en plasma (Underwood, 1977).

El selenio se encuentra en los tejidos en parte unido a proteínas; o formando parte de ellas, sustituyendo al azufre y formando seleno-aminoácidos, cuya máxima expresión es la GPX (Underwood, 1977).

El selenio es un componente esencial de la GPX, principal enzima responsable de los mecanismos antioxidantes de la célula. La dependencia de la actividad de esta enzima de los niveles de selenio es tal, que prácticamente su actividad antioxidante queda anulada en disminuciones extremas de este elemento (Underwood, 1977). Esta actividad antioxidante se lleva a cabo mediante las siguientes reacciones acopladas:



La mayor parte de la actividad GPX ocurre en el hígado, moderadamente en eritrocitos, músculo cardíaco, pulmones y riñones.

La absorción, distribución y almacenamiento de selenio en el organismo y la cantidad, forma y vías de excreción varían según la forma química y las cantidades ingeridas de este elemento y los niveles en la dieta de otros elementos, tales como arsénico y mercurio.

Estudios con ^{75}Se han demostrado que fisiológicamente, el selenio se absorbe principalmente en el duodeno. En un estudio realizado sobre tres mujeres jóvenes a las que se administró ^{75}Se en forma de selenito, la absorción intestinal varió entre 44 y 70% de la dosis; la excreción urinaria entre 14 y 20% de lo absorbido en la primera semana; presentando solo trazas en aire espirado y piel descamada. La pérdida fecal acumulada a las dos semanas fue de 33 a 58% de la dosis. La radioactividad en corazón, plasma e hígado descendió más rápidamente que en el promedio del total del cuerpo, mientras que descendió más lentamente en eritrocitos y hueso. Algunos estudios han encontrado una relación inversa entre la excreción de selenio y su disponibilidad en la dieta. El radio-selenio es retenido de manera más eficiente en animales alimentados con dietas deficientes en este elemento, que en las suplementadas (Underwood, 1977).

Se produce mayor absorción para selenio contenido en granos seleníferos que para selenitos o selenatos, y en estos últimos, la absorción es aún mayor que la de

seleniuros y selenio elemental. Por otra parte, algunos compuestos orgánicos como el selenopropionato y el selenodiacetato presentan menor toxicidad, presumiblemente por menor absorción. Diferentes formas químicas de selenio varían la capacidad del mismo para prevenir el déficit de este elemento, aunque estas variaciones no se deban necesariamente a menor absorción. De hecho, la selenometionina y la selenocisteína promueven mayor retención de selenio en los tejidos corporales que ingestas equivalentes de selenito o selenato (Underwood, 1977).

El selenio absorbido es transportado primeramente en el plasma, desde donde pasa a los tejidos. El selenio en forma de selenito debe sufrir aún una transformación química en los eritrocitos antes de poder unirse a las proteínas del plasma. El proceso de expulsión de selenio de los eritrocitos depende la existencia de un nivel apropiado de glutatión en dichas células. La mayor parte de este selenio es transportado en la albúmina, tras lo cual es desplazado a las fracciones globulares. Se ha demostrado que el selenio procesado por los eritrocitos es en gran medida transportado por β -lipoproteínas y por una fracción globulínica entre α_1 y α_2 (Underwood, 1977).

Se ha observado mediante estudios con ^{75}Se que una vez que el selenio pasa a formar parte de las proteínas del eritrocito, permanece en él el resto de su vida. También es incorporado a la mioglobina, citocromo c, enzimas musculares, miosina, aldolasa y nucleoproteínas. Al contrario que en los eritrocitos, la mayor parte del selenio presente en tejidos es altamente lábil, movilizándose al principio rápido, y posteriormente decreciendo la velocidad (Underwood, 1977).

Como comentamos anteriormente, el selenio se excreta en heces, orina y en aire espirado. Las cantidades y proporciones dependen del nivel y la forma de la ingesta, el resto de la dieta y el estado de oxidación. La exhalación de selenio es una importante vía ante grandes cantidades de selenio, no siendo apenas relevante en ingestas pequeñas. El aumento de proteínas y del contenido en metionina de la dieta aumenta la excreción pulmonar de ^{75}Se inyectado. Otros metales (As, Hg, Ta, Cd) por vía parenteral también aumentan la volatilización del selenio (Pb y Zn no; Underwood, 1977).

La excreción fecal del selenio ingerido consiste en su mayoría en selenio no absorbido, junto con pequeñas cantidades excretadas por las secreciones biliar, pancreática e intestinal.

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, y que se relacionan con el pronóstico (González-Reimers *et al.*, 2008). El efecto beneficioso del selenio sobre el hueso, aunque poco conocido en su mecanismo íntimo, se pone de manifiesto al observar que es capaz de revertir, por ejemplo, la pérdida de masa ósea inducida por plomo (Lai *et al.*, 2004). Otros estudios (Turan *et al.*, 2000) encuentran que el déficit de selenio disminuye la resistencia biomecánica del fémur y la tibia de rata en relación con el grupo control. Esta observación concuerda con el hallazgo de selenoproteínas antioxidantes (GPX) en el osteoblasto fetal humano, lo que refuerza el papel protector del selenio frente a la lesión oxidante en estas células y aporta la base teórica de su efecto anti-osteoporótico. En la malnutrición calórico-proteica también se han descrito niveles bajos de selenio (Sempertegui *et al.*, 2003), por lo que también en esta entidad puede el selenio jugar un papel en el mantenimiento de una masa ósea adecuada.

Como hemos comentado previamente, en la génesis de la osteopatía del alcohólico, se le da cada vez más importancia a las citocinas proinflamatorias, tales como TNF, IL-1, IL-6 e IL-8, entre otras. Un potente estímulo para la secreción de estas citocinas es la peroxidación lipídica que tiene lugar fundamentalmente en las células de Kupffer. El TNF y la IL-6 activan al RANKL y de esta manera, activan al osteoclasto, promoviendo la reabsorción ósea, y desequilibrando la balanza síntesis-reabsorción, a favor de la segunda. De esta manera, se comprende que combatir la excesiva peroxidación lipídica puede ejercer un beneficio sobre la masa ósea.

Es posible que los efectos positivos observados con el zinc, tanto a nivel experimental como clínico, sobre el crecimiento y la masa ósea, obedezcan a este mecanismo. Siendo el selenio un elemento aún más activo en su capacidad antioxidante, es esperable que su eficacia en situaciones de defectuoso crecimiento

óseo u osteoporosis, sea al menos comparable a la del zinc, hipótesis que analizamos en el presente trabajo. De hecho, algunos autores han estudiado la relación del aporte de selenio con la masa ósea, con resultados dispares. Así Zhang *et al.* (2006) en 1215 individuos mayores de 50 años encuentra una relación inversa entre fractura de cadera e ingesta de selenio. Odabasi *et al.* (2008) no encontraron relación entre los niveles de selenio y la presencia de osteoporosis en un grupo de mujeres postmenopáusicas, resultado que concuerda con el estudio de Wolf *et al.* (2005) en 11.068 mujeres o con un estudio reciente realizado en China (Liu *et al.*, 2009). En contraste con esto, Turan *et al.* (2003) encuentran que el tratamiento con selenio mejora la osteoporosis inducida por heparina. Por lo tanto como vemos, los resultados referentes al papel patogénico del selenio en la osteoporosis son discordantes, aún cuando pueden ser útiles como arma terapéutica.

[OBJETIVOS]

Objetivos

A razón de lo expuesto previamente, se ha planteado este trabajo con la finalidad de alcanzar los siguientes objetivos:

1. Analizar los efectos combinados y relativos de el alcohol y la malnutrición proteica sobre la masa ósea en un modelo murino, determinando también la relación de los efectos observados con los niveles séricos de distintas hormonas que gobiernan el metabolismo óseo y marcadores bioquímicos de síntesis y reabsorción ósea.

2. Determinar si los trastornos mencionados en el punto anterior se modifican con el tratamiento con selenio.

3. Analizar los efectos combinados y relativos del alcohol y la malnutrición proteica sobre los niveles séricos y el contenido óseo de zinc, cobre, hierro, manganeso y selenio, y si los mismos se modifican tras la adición de selenio.

4. Establecer la relación existente entre contenido óseo de estos metales y la masa ósea, así como con hormonas y parámetros bioquímicos relacionados con la síntesis y destrucción ósea.

[MATERIAL Y MÉTODO]

Población a estudio
Estudio del hueso
Determinaciones serológicas
Determinaciones en orina
Análisis estadístico

1. POBLACIÓN A ESTUDIO.

1.1 ANIMALES Y ALIMENTACIÓN.

El estudio se inicia incluyendo ocho grupos de ocho ratas Sprague-Dawley macho que configuraban los grupos experimentales, además de un grupo de ratas alimentadas con dieta control *ad libitum*. Los animales fueron alimentados con pienso estándar y agua a demanda hasta alcanzar un peso aproximado de 300 g (Tabla 3), momento en el que fueron incluidos y distribuidos aleatoriamente en los distintos grupos de estudio. Desde este momento, se les alimentó, mediante biberones, exclusivamente con dieta líquida según el modelo de Lieber-DeCarli (Dyets Inc., Bethlehem, Pennsylvania).

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	
Se		F=26,9; p<0,001	F=18,1; p<0,001
Interacción triple			
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 3: 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.

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

Se establecieron ocho grupos de 10 ratas cada uno y un noveno *ad libitum* de 6 ejemplares que fueron alimentados durante 5 semanas y seguidamente sacrificados. El grupo 1 (Control o CT) recibió dieta control con un 18% de contenido en proteínas; el grupo 2 (hipoproteico o HP) recibió dieta hipoproteica con el 2% de proteínas; el grupo 3 (alcohólico u OH) fue alimentado con dieta a la cual se añadió alcohol al 95% en cantidad de 5 g/dl, lo que supone un 36% de la energía total suministrada por la dieta, normoproteica con el 18% de proteínas; el grupo 4 (alcohólico hipoproteico u OHHP) recibió dieta alcohólica (36%), hipoproteica (2%); los siguientes cuatro grupos, recibieron dietas homólogas, además de un suplemento de selenio disuelto en la dieta, a dosis de 1 mg/Kg peso de seleniometionina. Todas las dietas utilizadas proveen 1 Kcal/ml.

Los animales fueron alimentados siguiendo un proceso de *pair feeding* (Tabla 3, pág. 94), ajustando cada 24 a 36 horas las cantidades ingeridas por todos los grupos a la cantidad consumida por los animales que menos ingerían (grupo 8). Este ajuste de la ingesta permite que la cantidad calórica ingerida por todos los animales sea similar. El grupo 9 (*Ad libitum* o AL) se alimentó *ad libitum* con dieta control.

La dieta, al igual que la sal de selenio, fue conservada a temperatura de 4°C . Se preparó semanalmente, siguiendo las recomendaciones indicadas por la empresa distribuidora *Dyets Inc. 1993/1994 Catalog*. Así, para la preparación de las dietas se utilizó agua ultrapura (Sistema de deionización Milli-Q OM-140). La preparación de un litro de las distintas dietas se realizó según lo siguiente: para la dieta control se disolvió 221,78 g de dieta en polvo en agua milli-Q hasta alcanzar un litro; para la dieta hipoproteica se disolvió 224,77 g; para la dieta alcohólica se utilizó 132,18 g de dieta en polvo, añadiendo 67cc de alcohol ultra puro al 95%; y para la dieta alcohólica hipoproteica, se disolvió 133,87 g de dieta en polvo, añadiéndosele 67cc de alcohol

ultra puro al 95%. (Lieber *et al.*, 1989). Para los animales tratados con selenio, se añadió seleniometionina a la dieta a razón de 6 mg por litro (que corresponden aproximadamente a 2,4 mg de selenio puro, es decir 2,4 ppm de selenio elemento). Esta cantidad se añade a la que contienen habitualmente las dietas de Lieber-DeCarli (Tabla 7, pág. 97) y supone –teniendo en cuenta la ingesta media de nuestros animales– una ingesta diaria de 120-140 µg de selenio al día, dosis similar a la empleada por otros investigadores en otros modelos experimentales con altas dosis de selenio como Sieber *et al.* (2009), que utiliza 100 µg de selenio o Ip (1986), que utiliza dietas que contienen 2-4 ppm de seleniometionina.

A pesar de todo, hubo diferencias en la ingesta total de nuestros animales (F=5,62; p<0,001). Las ratas alcohólicas hipoproteicas que recibieron selenio fueron las que menos consumieron mientras que los controles fueron los que más. Tanto el alcohol como el tratamiento con selenio ejercieron un efecto independiente sobre la cantidad de alimento consumida por nuestros animales (Tabla 4).

Efectos principales	Ing. (Kcal/d)
OH	F=6,4; p=0,014
Se	F=18,1; p<0,001
Interacción triple	F=10,3; p=0,002

Tabla 4: Efectos principales sobre la ingesta. Acrónimos: OH: alcohol; Se: adición de selenio.

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

Las características nutricionales de los grupos de estudio (Tabla 5), la composición de las dietas (Tabla 6), y la cantidad de vitaminas, minerales y

Grupos	Prot. (%)	Líp. (%)	CH (%)	Se (mg/l)	OH 36%
1 (CT)	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 (CT-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 (OHHP-Se)	2	35	63	2,425	Sí
9 Ad Libitum	18	35	47	0	No

Tabla 5: Características nutricionales de la dieta de los grupos de estudio. Porcentajes de Kcal.

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 6: Composición de la dieta líquida Lieber-DeCarli (Dyets Inc.).

oligoelementos (Tabla 7) se especifican en las tablas correspondientes.

Minerales y Oligoelementos	mg/1 Kcal	Vitaminas	mg/1 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 7: Composición en minerales, oligoelementos y vitaminas (Dyets Inc.).

1.2 SACRIFICIO Y RECOGIDA DE MUESTRAS

Tras un periodo de 5 semanas, los animales fueron sacrificados mediante inyección intraperitoneal de 1,5 ml de solución de hidrato de cloral en concentración de 160 mg/ml, que supone 240 mg de esta sustancia. Esto equivale a 80 mg/100 g de peso, doble de la dosis anestésica y dentro del rango de dosis letal.

Durante las 24 horas previas al sacrificio los animales fueron emplazados en jaulas metabólicas, obteniéndose la orina excretada durante ese periodo, a fin de analizarla.

Tras el sacrificio se tomaron muestras de hueso y sangre:

1.2.1 Hueso

Se extrajo la primera y segunda vértebras lumbares y se conservó en alcohol al 70% y a una temperatura de 4°C. Posteriormente se incluyó la muestra en metil-

metacrilato. Las muestras fueron cortadas con microtomo de 7 micras y finalmente se llevó a cabo la tinción con tricrómico para estudio histomorfométrico.

También se extrajo la tibia derecha, conservándose a 4°C en formol al 10 % para estudio del contenido en oligoelementos.

1.2.2 Sangre

Se obtuvo muestra de sangre por punción directa intracardiaca. Posteriormente se centrifugó a 3500 rpm durante 5 minutos, obteniéndose suero para determinación de parámetros bioquímicos y hormonales. El suero fue conservado a -80°C.

2. ESTUDIO DEL HUESO

2.1 ANÁLISIS HISTOLÓGICO

Las muestras de tejido óseo vertebral fueron incluidas en metil-metacrilato y posteriormente teñidas con tricrómico (Ilustración 8).

La mezcla de metil-metacrilato se compone de: 100 ml de M-metacrilato (monómero estabilizado con hidroquinona), 20 ml de nonifenol-poliglicol-éter acetato, 2 ml de dibutil-ftalato y 5 g de peróxido de benzoilo.

El peróxido de benzoilo actúa como catalizador y se adiciona de inmediato. Una vez preparada la mezcla se guarda en frasco cerrado a 4°C. Antes de abrir la botella se

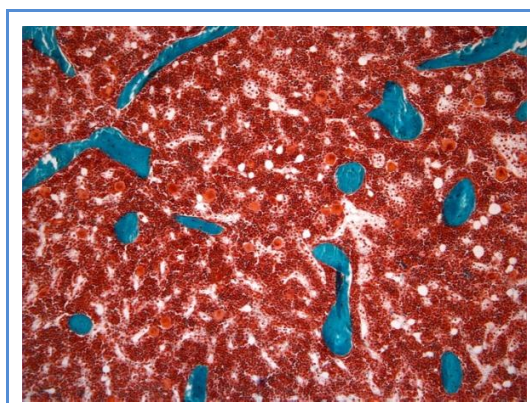


Ilustración 8: Corte histológico de tejido óseo teñido con tricrómico.

debe esperar a que se atempere.

La técnica se describe paso a paso a continuación:

-Antes de incluir la muestra se debe deshidratar completamente. Esto se consigue mediante baños en etanol a concentración creciente. De etanol 70º se pasa a etanol 96º durante un día y después a etanol absoluto durante tres días, cambiando este cada día.

-Se coloca la muestra en la mezcla de metil-metacrilato a 4ºC durante 48 horas para infiltrar bien la muestra. Debe usarse recipiente de vidrio.

-Pasadas las 48 horas se cambia la mezcla de metilmetacrilato por otra nueva y se coloca en la estufa a 32ºC esperando a que el metil-metacrilato endurezca, esto suele tardar tres o cuatro días aproximadamente. El bloque de metilmetacrilato se obtiene rompiendo los recipientes de vidrio.

-Se cortan las muestras en el microtomo con un grosor de 7 micras y se colocan en portaobjetos.

En este punto se procede a realizar la tinción. El proceso de tinción con tricrómico se describe en las siguientes líneas:

-Se hidrata la muestra con agua destilada, lavándola durante 5 minutos.

-Teñir en hematoxilina férrica durante 5 minutos.

-Lavar con agua corriente durante 10 minutos, hasta que el agua salga clara.

-Lavado en Ponceau de xilidina durante 45 minutos.

-Lavado rápido en ácido acético al 1%.

-Lavado rápido en agua destilada.

-Diferenciar en ácido fosfotungstico-Orange G durante 10 minutos.

-Lavado rápido en ácido acético al 1%.

-Lavado rápido en agua destilada.

-Verde luz al 2% durante 15 minutos.

-Lavado rápido en ácido acético al 1%.

-Lavado rápido con agua destilada.

-Deshidratar la muestra y montar.

A continuación se procedió al estudio histológico mediante microscopio Leica y posterior análisis semiautomatizado mediante programa de análisis de imagen Leica Qwin para medición de áreas, determinándose la superficie relativa de hueso trabecular por campo, para el volumen de hueso osteoide (VOT) y la superficie relativa de tejido osteoide.

2.2 DETERMINACIÓN DE OLIGOELEMENTOS

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

Para ello se seleccionaron muestras de diáfisis tibial, ya que es un hueso que puede ser aislado prácticamente sin tejido blando adherido en el mismo momento del sacrificio. Por otra parte, al estar constituido prácticamente por hueso cortical, los resultados obtenidos reflejan con bastante fidelidad la concentración ósea de oligoelementos, con escasa contaminación de elementos medulares o sanguíneos.

Los oligoelementos se debían determinar una vez disuelto el hueso mediante digestión ácida con ácido nítrico *suprapur*, en un sistema de digestión por microondas. A este efecto, tras su conservación en formol, las muestras de tibia se sometieron al siguiente proceso:

-Desecación en estufa a 100°C, hasta constancia en peso, durante al menos 24 horas. Para el traslado posterior de las muestras se utilizó un desecador.

-Pesada de la muestra seca, situándola en vaso de teflón PTFE (TFM-HPV100), en una balanza analítica de 0,1 mg de precisión previamente calibrada.

-Disolución de la muestra mediante 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 procedió 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 hueso recomendado en el manual de aplicaciones de Milestone (Milestone Inc., CT, USA).

-Una vez disuelta la muestra, se trasvasa cuantitativamente 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).

-Conservación de las muestras a temperatura ambiente hasta análisis ulterior, utilizando para ello contenedores de teflón de tapa roscada (Sigma-Aldrich, HDPE bottles 30 ml).

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. En términos generales, zinc, cobre y hierro fueron medidos con la técnica de

espectrofotometría de absorción atómica con atomización por llama aire-acetileno, mientras que manganeso y selenio, lo fueron en un sistema de atomización electrotermal en cámara de grafito. Los límites de detección en esta técnica para los oligoelementos estudiados se exponen en la Tabla 8.

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

Tabla 8: Límites de detección según técnica y elemento traza.

En la cuantificación de los oligoelementos a estudio fue necesaria la calibración de los citados instrumentos. Para ello, se prepararon las correspondientes disoluciones patrón de diferentes concentraciones del elemento químico a estudio, a partir de disoluciones estándar certificadas de 1000 ppm (Fluka y Sigma-Aldrich, disoluciones certificadas para espectrofotometría de absorción atómica). Asimismo, en la cuantificación mediante cámara de grafito se utilizaron 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). Además, 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 la cuantificación se han considerado válidos aquellos resultados que superan el límite de cuantificación del oligoelemento. En todo caso se ha considerado el límite de cuantificación del analito como diez veces el límite de detección del mismo.

3. DETERMINACIONES SEROLÓGICAS

3.1 DETERMINACIÓN DE SELENIO

El suero obtenido tras el centrifugado fue diluido convenientemente 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).

En la calibración del espectrofotómetro de absorción atómica se utilizó, además de las correspondientes disoluciones patrón de selenio, el material de referencia *Seronorm® Trace Elements Serum L-1* (Sero AS, Billingstad, Norway). Posteriormente se procedió a la determinación de la concentración de selenio siguiendo la metodología analítica recomendada, de forma análoga al hueso.

3.2 OTRAS DETERMINACIONES

Las determinaciones serológicas que fueron realizadas en los distintos grupos de estudio, se detallan a continuación:

-**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:** Cuya concentración se determinó 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:** Que fue determinada también mediante 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.

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

-**PTH** por ensayo secuencial inmunométrico quimioluminiscente en fase sólida con el kit IMMULITE-2000 *PTH intacta* de Diagnostic Product Corporation® (Los Angeles, California) con sensibilidad de 3,0 pg/ml.

-**Telopéptido C-terminal sérico de colágeno tipo I específico de murinos:** Determinado por ELISA mediante el kit RatsLaps EIA® (Immunodiagnostic Systems, Boldon, UK), con un rango de recuperación (*recovery*) de 81-115,1% y un límite de detección de 2 ng/ml.

4. DETERMINACIONES EN ORINA

La determinación en orina de calcio, fósforo, magnesio y creatinina se realizó con los mismos test, las mismas técnicas e idénticos kits que fueron utilizados en sangre, variando solo los límites de detección inferiores (sensibilidades) 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 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 análisis *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 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.

RESULTADOS

[RESULTADOS]

Parámetros nutricionales

Remodelado óseo

Principales hormonas del metabolismo óseo

Oligoelementos

Resumen de correlaciones halladas

1. PARÁMETROS NUTRICIONALES

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		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	
Interacción triple		F=8,16; p=0,006	F=8,44; p=0,005	F=10,3; p=0,002	
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 9: 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 de dieta y albúmina sérica. Acrónimos: 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 – Test de *Student-Newman-Keuls*.

1.1 INGESTA Y PESO

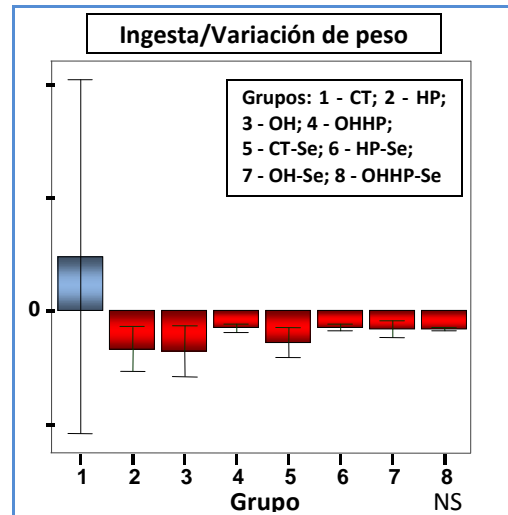
Los animales incluidos en el análisis final presentaron un peso al inicio del estudio similar en los 8 grupos. Sin embargo, pese a la estrategia de *pair feeding*, hubo diferencias significativas en lo que respecta a la ingesta media diaria, de tal manera que las ratas control ingirieron mayor cantidad de alimento que el resto de las ratas (Tabla 3).

Tanto el aporte de alcohol como el aporte de selenio, ejercen un efecto independiente sobre la cuantía de ingesta, existiendo una interacción significativa entre los tres factores (Tabla 10).

Efectos principales	Ingesta (Kcal/d)
OH	F=6,4; p=0,014
Se	F=18,1; p<0,001
Interacción triple	F=10,3; p=0,002

Tabla 10: Efectos principales. Acrónimos: OH: alcohol; Se: adición de selenio.

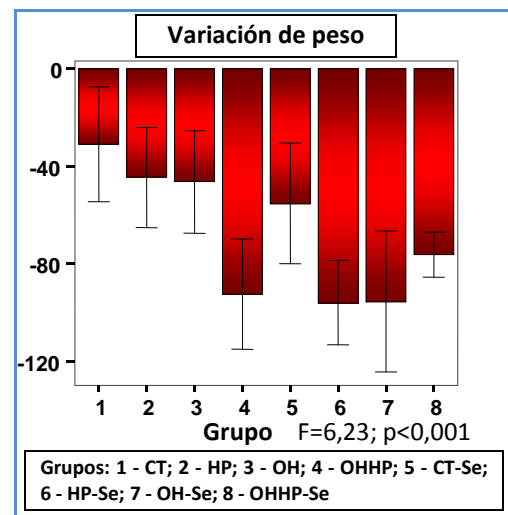
No obstante, al corregir la ingesta media por la pérdida de peso experimentada por los animales a lo largo del estudio, observamos que no hay diferencias significativas entre los 8 grupos, tal como puede observarse en la siguiente figura (Gráfica 1).



Gráfica 1: Ingesta diaria (ml) en relación con el peso (g). NS: No significativo.

Algunos animales pertenecientes al grupo control ganaron peso, lo que explica que el cociente *ingesta/variación de peso* sea positivo en este grupo (grupo 1), frente al resto de grupos, en los que este cociente es negativo (Gráfica 1).

La mayor parte de nuestros animales perdieron peso a lo largo del estudio, como se puede apreciar en la Gráfica 2. Las diferencias de peso entre el momento inicial y el momento final fueron significativas para todos los grupos, destacando al realizar el análisis de la *T apareada*, el grupo de ratas alcohólicas con dieta hipoproteica, tanto sin selenio (T=9,89; p<0,001; grupo 4), como con selenio (T=19,55; p<0,001; grupo 8); y el grupo hipoproteico tratado con selenio (T=12,66; p>0,001; grupo 6). Puede observarse claramente este hecho en la Gráfica 2.



Gráfica 2: Variación del peso (g).

Los tres factores estudiados ejercen un efecto independiente sobre la pérdida de peso. No existieron interacciones considerados los factores dos a dos. Sin embargo, sí se observaron interacciones al considerar conjuntamente los tres parámetros. El resultado del análisis de varianza se expone con más detalle en la Tabla 11.

Observamos diferencias significativas en la variación de peso entre los ocho grupos ($F=6,2$; $p<0,001$), estableciéndose dichas diferencias entre los grupos 1, vs. 4, 6, 7 y 8; y el 2 y 3 vs. 4, 6 y 7.

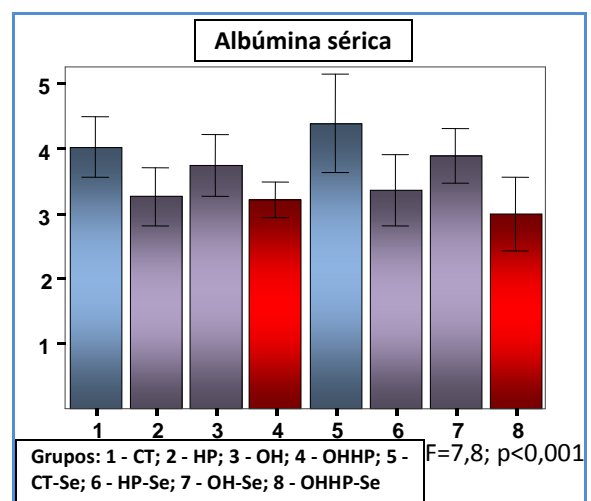
Efectos principales	Variación de peso (g)
OH	$F=10,65$; $p=0,002$
HP	$F=7,08$; $p=0,01$
Se	$F=11,59$; $p=0,001$
Interacción triple	$F=8,44$; $p=0,005$

Tabla 11: Efectos principales. Acrónimos: OH: alcohol; HP: dieta hipoproteica; Se: adición de selenio.

Como era de esperar, los animales alimentados *ad libitum* con dieta control presentaron una ganancia significativa de peso ($32,8 \pm 16,4$ g), en claro contraste con los animales del grupo control ($T=4,1$; $p=0,002$).

1.2 ALBÚMINA SÉRICA

La albúmina fue significativamente superior en el grupo control, con o sin selenio (grupos 5 y 1, respectivamente), estando significativamente descendida en los animales alcohólicos alimentados con dieta hipoproteica (grupos 4 y 8), especialmente en el grupo tratado con selenio (grupo 8;). Esto puede observarse en la Gráfica 3.



Gráfica 3: Albúmina sérica (g/dl).

Se establecieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos 1 y 5, que fueron diferentes del resto; mientras que el grupo 8 mostró niveles

significativamente inferiores a cualquiera de los otros grupos (SNK: 1 y 5 vs. 2, 4, 6 y 8; 7 vs. 2, 4 y 8; 3 vs. 8).

Al realizar el análisis de varianza de dos vías (Tabla 12) vemos que tanto alcohol como dieta hipoproteica ejercen un efecto independiente y significativo, sobre los niveles de albúmina, descendiendo. En cambio no existe interacción entre ambos factores, como puede verse en la Gráfica 3 (pág. 109), ni tampoco efecto alguno del selenio.

Efectos principales	Albúmina (g/dl)
OH	F=5,7; p=0,026
HP	F=46,84; p<0,001

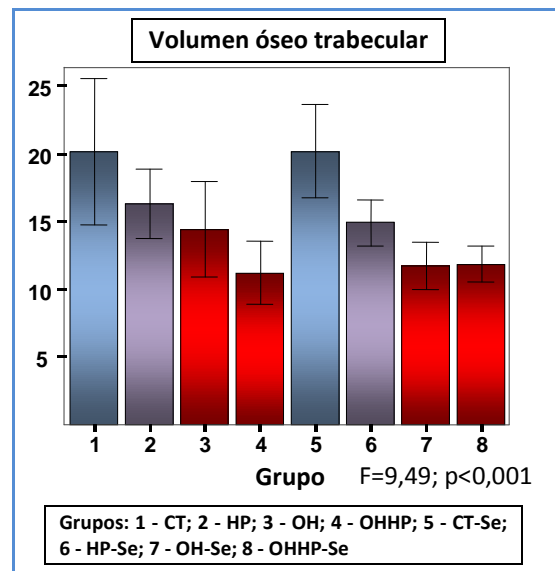
Tabla 12: Efectos principales. Acrónimos: OH: alcohol; HP: dieta hipoproteica.

Al comparar los niveles de albúmina entre el grupo control ($4,02 \pm 0,37$ gr/dl) y grupo *ad Libitum* ($3,94 \pm 0,33$ gr/dl) observamos que no habían diferencias significativas entre ambos (T=0,33; p=0,75).

2. REMODELADO ÓSEO

2.1 VOLUMEN ÓSEO TRABECULAR

Con respecto al volumen óseo trabecular (VOT) observamos diferencias significativas entre los grupos analizados. Estas diferencias se establecen entre ambos grupos control –con y sin selenio– y el resto de los grupos; así como entre los animales tratados con dieta hipoproteica (grupo 2) y los grupos alcohólicos alimentados con dieta hipoproteica (grupos 4 y 8) y alcohólico-control en tratamiento con selenio (grupo 7; SNK: 1, 5 vs. 2, 3 y 4, 6, 7 y 8; 2 vs. 4, 7 y 8). Esto puede apreciarse en la Gráfica 4.



Gráfica 4: Volumen óseo trabecular (%).

Mediante análisis de varianza de dos vías, observamos que tanto alcohol como dieta hipoproteica ejercen un efecto independiente y significativo sobre el VOT. Se aprecia también que existe una interacción entre ambos factores que roza la significación estadística ($p=0,063$). En cambio el selenio no ejerce efecto alguno sobre el VOT (Tabla 13).

No se hallaron diferencias significativas entre ratas control y ratas alimentadas *ad libitum* en lo que respecta al VOT (Tabla 13).

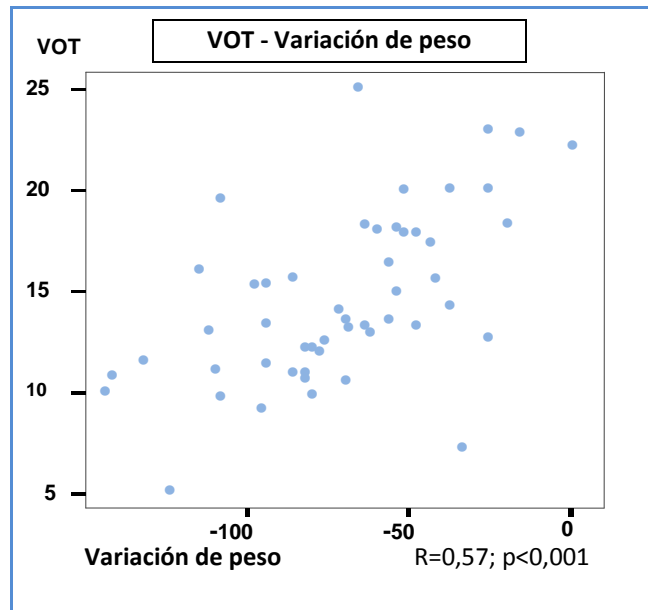
Grupo	VOT (%)	Osteoide (%)	OCN (ng/dl)	TP (ng/ml)
1 (CT)	20,17 ± 4,36	1,01 ± 0,27	454,5 ± 148,9	65,6 ± 15,0
2 (HP)	16,33 ± 3,05	1,01 ± 0,47	693,2 ± 150,3	72,0 ± 44,7
3 (OH)	14,40 ± 3,81	1,15 ± 0,34	574,0 ± 322,0	117,3 ± 53,7
4 (OHHP)	11,23 ± 2,79	0,89 ± 0,23	262,0 ± 80,8	78,8 ± 26,5
5 (CT-Se)	20,19 ± 3,26	1,15 ± 0,09	378,4 ± 157,9	100,4 ± 40,3
6 (HP-Se)	14,98 ± 2,66	0,89 ± 0,21	494,8 ± 80,4	96,5 ± 10,0
7 (OH-Se)	11,71 ± 1,87	1,08 ± 0,29	471,0 ± 253,0	95,5 ± 67,8
8 (OHHP-Se)	11,86 ± 1,62	1,05 ± 0,33	448,2 ± 201,1	95,3 ± 39,3
F; p	F= 9,49; p<0,001	NS	F= 2,44; p=0,037	NS
Diferencias entre grupos (SNK)	1,5 vs 2-4, 6-8 2 vs 4,7,8		2 vs 4	
Efectos principales				
OH	F=50,50; p<0,001			
HP	F=14,58; p<0,001			
Interac. Dobles: OH-HP			F=8,91; p=0,005	
9 (AL)	19,33 ± 2,52	2,8 ± 0,62	841,1 ± 54,1	-----
Diferencias 1-9	NS	T=5,78; p=0,001	T=4,93; p=0,001	-----

Tabla 13: Valores promedio y desviación estándar por grupos de volumen óseo trabecular, área de tejido osteoide, osteocalcina y telopéptido. Acrónimos: 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 – Test de Student-Newman-Keuls; VOT – Volumen óseo trabecular; OCN – osteocalcina; TP – telopéptido.

Al analizar por separado los animales tratados con selenio y los no tratados con selenio vemos que, al realizar un análisis de varianza de dos vías, los efectos independientes del alcohol y la dieta hipoproteica son evidentes en los subgrupos de ratas sin selenio ($F=16,94$; $p<0,001$ y $F=7,04$; $p=0,014$; respectivamente) y de forma incluso más acusada en las ratas tratadas con selenio ($F=42,15$ y $F=8,04$), tal como puede observarse en la Gráfica 4 (pág. 110).

2.1.1 Relaciones con parámetros nutricionales

Encontramos una relación significativa entre VOT y pérdida de peso (Gráfica 5). Las ratas que recibieron tratamiento con selenio esta relación fue especialmente acusada ($R=0,68$; $p<0,001$), aunque también resultó significativa en las ratas que no recibieron tratamiento ($R=0,45$; $p=0,009$).



Gráfica 5: Relación entre VOT (%) y pérdida de peso (g).

Como es lógico, también encontramos correlación entre VOT y el peso final, resultando esta estadísticamente significativa ($R=0,55$; $p<0,001$). En cambio, no encontramos relaciones con significación estadística con los otros parámetros nutricionales estudiados.

2.1.2 Relación con hormonas involucradas en el recambio óseo

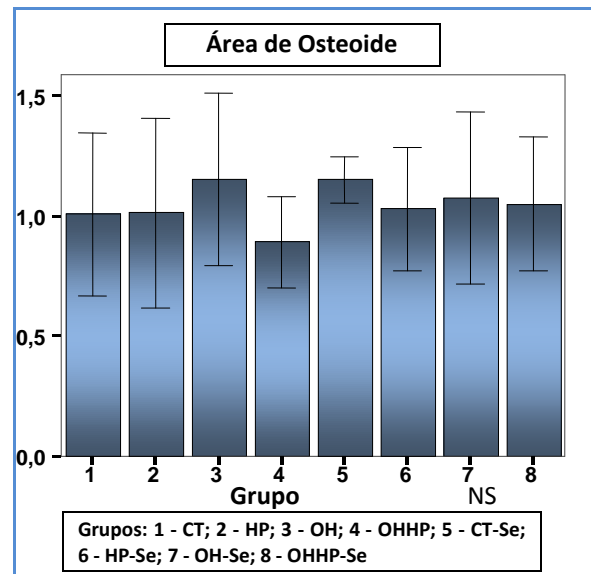
No se encontraron relaciones con las hormonas intervinientes en el remodelado óseo analizadas (IGF-1 y PTH).

2.1.2 Relación con parámetros de remodelado óseo

No se hallaron relaciones estadísticamente significativas ni con osteocalcina, ni con telopéptido.

2.2 ÁREA DE OSTEOIDE

No hubo diferencias significativas en el área de osteoide (AO) entre los grupos analizados ($F=0,75$, $p=0,87$; Gráfica 6), por tanto, ninguno de los tres factores juega un papel independiente en este parámetro. En contraste con el hueso trabecular, las ratas alimentadas *ad libitum* sí tenían mayor cantidad de osteoide que las controles ($T=5,78$; $p=0,001$).

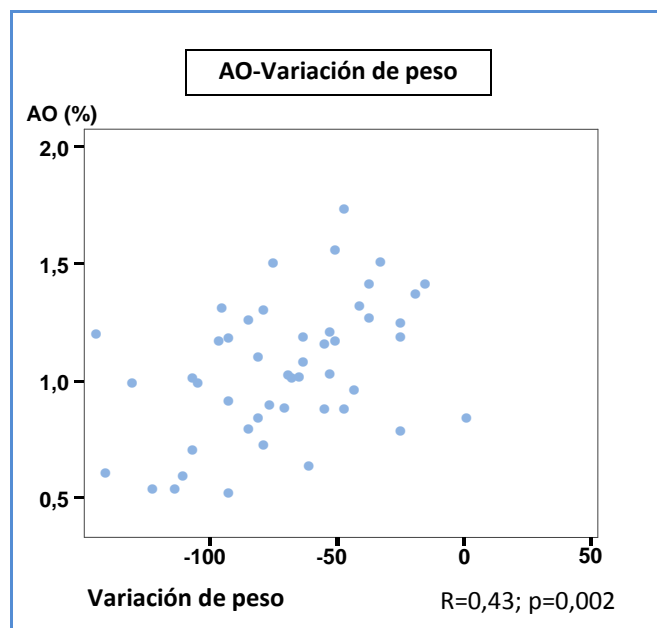


Gráfica 6: Área de osteoide (%).

2.2.1 Relaciones con parámetros nutricionales

Se halló una relación significativa entre el área de osteoide y la variación de peso ($R=0,43$; $p=0,002$), tal como puede apreciarse en la Gráfica 7.

Al igual que sucedió con el VOT, se encontró correlación con el peso final, resultando ésta significativa ($R=0,40$; $p=0,005$). Esto es lógico, ya que al ser los pesos al inicio similares entre los grupos, la variación de peso depende únicamente del peso final.



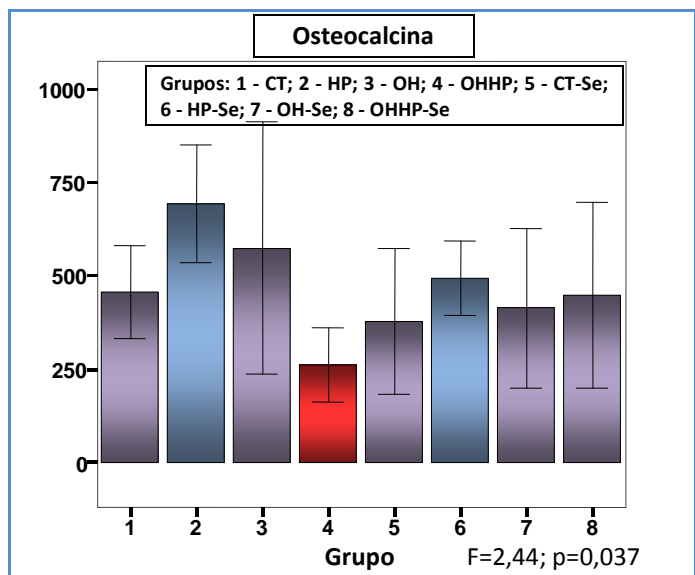
Gráfica 7: Relación entre área de osteoide (%) y variación de peso (g).

2.2.2 Relación con hormonas involucradas en el recambio óseo

No se encontraron relaciones significativas entre área de osteoide y marcadores y promotores de síntesis ósea como osteocalcina e IGF-1.

2.3 OSTEOCALCINA

Se hallaron diferencias significativas en los niveles de osteocalcina (OCN) entre los ocho grupos ($F=2,4$; $p=0,037$), existiendo una sinergia entre los efectos del alcohol y dieta hipoproteica ($F=8,9$; $p=0,005$), presentando el grupo tratado con alcohol y dieta hipoproteica (grupo 4) niveles más bajos de osteocalcina. Al añadir selenio este descenso desaparece, de



Gráfica 8: Osteocalcina (ng/dl).

modo que las ratas alimentadas con dieta hipoproteica y tratadas con alcohol y selenio (grupo 8), presentaron niveles de osteocalcina similares a los otros grupos.

No hubo diferencias entre el grupo control y el resto de los grupos con o sin selenio. Como vemos en la Gráfica 8, destacan los bajos niveles de osteocalcina de las ratas alimentadas con alcohol y dieta hipoproteica (grupo 4), que difieren del resto de animales, especialmente de las alimentadas con dieta hipoproteica ($p<0,05$ por SNK). Como se observa en esta figura, los niveles de osteocalcina presentan marcadas diferencias en los cuatro primeros grupos, es decir, en los no tratados con selenio, diferencias que se aminoran en los grupos tratados con selenio.

En efecto, al analizar por separado las ratas no tratadas con selenio observamos que existe una interacción entre alcohol y dieta hipoproteica ($F=11,9$; $p=0,002$), y que las diferencias entre los cuatro grupos son altamente significativas ($F=4,79$; $p=0,011$).

Estas diferencias desaparecen en las ratas tratadas con selenio (NS), por lo que la adición de este elemento parece aminorar los efectos del alcohol y la dieta hipoproteica.

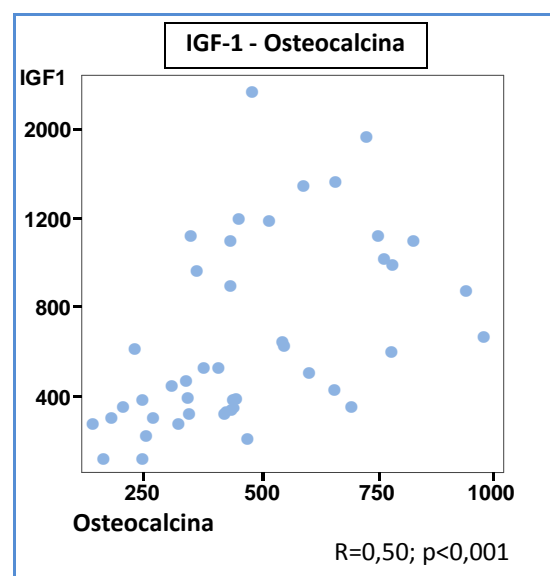
2.3.1 Relaciones con factores nutricionales

La osteocalcina se relacionó positivamente y de forma significativa con la ingesta ($R=0,33$; $p=0,028$). No hubo correlaciones significativas con otros parámetros nutricionales.

2.3.2 Relaciones con factores involucrados en el remodelado óseo

Observamos una correlación estadísticamente significativa entre la osteocalcina y el IGF-1 ($R=0,50$, $p<0,001$; Gráfica 9).

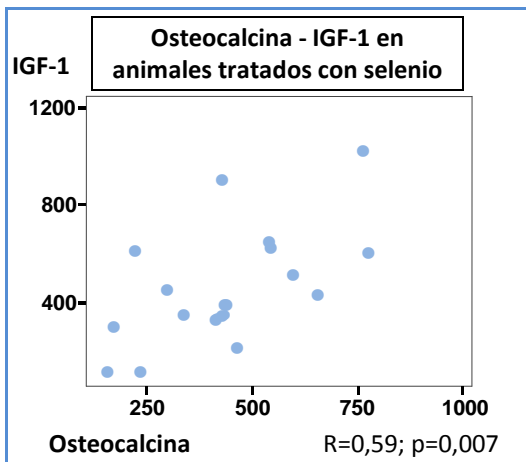
Considerando por separado los animales tratados con y sin selenio, vemos que en aquellos que no han sido tratados con selenio, la osteocalcina guarda relación con el IGF-1 ($R=0,49$; $p=0,014$). Sin embargo, en animales tratados con selenio la OCN no solo guarda relación directa estadísticamente significativa con el IGF-1



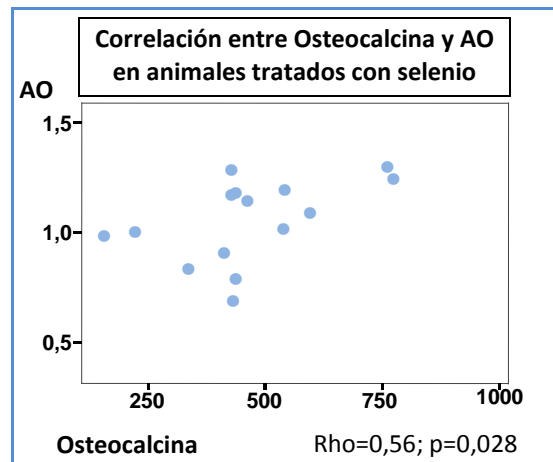
Gráfica 9: Relación entre Osteocalcina (ng/dl) e IGF-1 (ng/ml).

($R=0,59$; $p=0,007$; Gráfica 10), sino que también lo hace con el área de osteoide ($Rho=0,56$; $p=0,028$; Gráfica 11).

Se encontró una relación en el límite de la significación estadística entre osteocalcina y telopéptido ($R=0,29$, $p=0,052$).



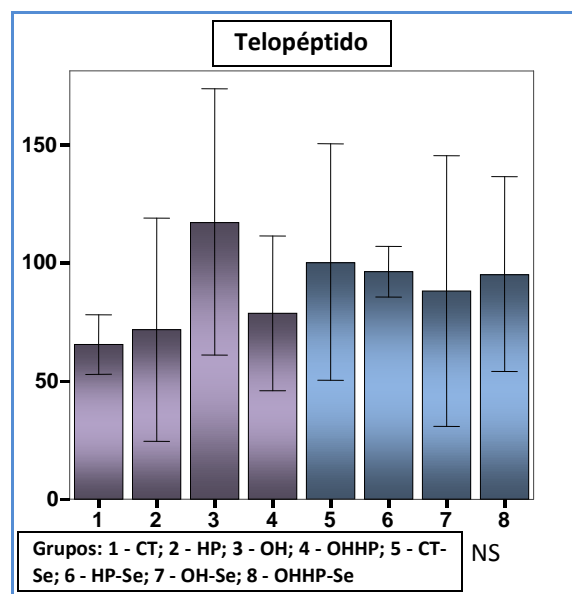
Gráfica 10: Relación entre osteocalcina (ng/dl) e IGF-1 (ng/ml), sólo en animales que recibieron tratamiento con selenio.



Gráfica 11: Relación entre osteocalcina (ng/dl) y área de osteoide (%) sólo en animales que recibieron tratamiento con selenio.

2.4 TELOPÉPTIDO

No encontramos diferencias en los niveles de telopéptido aún cuando las ratas alcohólicas mostraban una tendencia a niveles más elevados que el resto (Tabla 13, pág. 111). Así, al considerar únicamente las ratas sin selenio, vemos (Gráfica 12) que hay una tendencia casi significativa a niveles más elevados en las ratas alcohólicas ($F=3,69$, $p=0,068$), efecto que desaparece en el



Gráfica 12: Telopéptido (ng/ml).

grupo tratado con selenio ($F=0,231$; $p=0,637$). Se aprecia de nuevo que el selenio tiende a aminorar los cambios producidos por la dieta alcohólica.

A excepción de la relación –en el límite de la significación estadística– hallada con la osteocalcina que ha sido ya comentada, los niveles de telopéptido no mostraron ninguna relación significativa con otros parámetros estudiados.

3. PRINCIPALES HORMONAS DEL METABOLISMO ÓSEO

3.1 FACTOR DE CRECIMIENTO INSULÍNICO TIPO 1

Existieron diferencias significativas entre los grupos estudiados en lo que respecta a la IGF-1 ($F=4,67$, $p=0,001$). En efecto, las ratas alimentadas con dieta hipoproteica y alcohol, presentaban los niveles más bajos.

En el análisis de varianza de dos vías presentaron un efecto independiente el alcohol y el tratamiento con selenio, pero no la dieta hipoproteica. Se observaron interacciones significativas entre dieta hipoproteica y tratamiento con selenio, así como alcohol y tratamiento con selenio (Tabla 15, pág. 119).

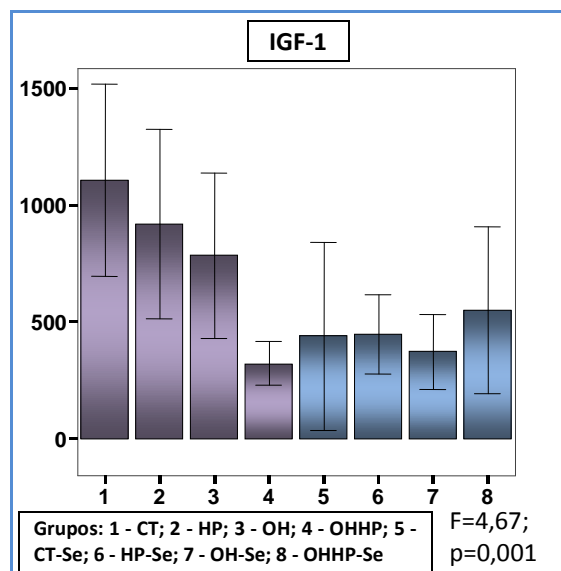
Si analizamos por separado las ratas alimentadas con el modelo de Lieber-DeCarli sin añadir selenio, (Tabla 14) vemos que tanto alcohol como dieta hipoproteica ejercen efectos independientes, provocando un descenso de los niveles de IGF-1.

Efectos principales	IGF-1 (ng/ml)
OH	$F=8,78$; $p=0,007$
HP	$F=4,42$; $p=0,048$

Tabla 14: Efectos principales en animales no tratados con selenio. Acrónimos: OH: alcohol; HP: dieta hipoproteica; IGF-1: Factor de crecimiento insulínico tipo 1.

Sin embargo, al considerar únicamente las ratas alimentadas con selenio vemos que las diferencias entre los cuatro grupos de Lieber-DeCarli desaparecen. Este hecho puede observarse claramente en la Gráfica 13 (pág. 118).

En efecto, en el análisis de varianza de dos vías, el selenio muestra una acción independiente superior a la del etanol (Tabla 15): si bien las ratas alimentadas con selenio tienen por lo general niveles más bajos de IGF-1 en todos los grupos, las diferencias entre los grupos hipoproteico y alcohólico hipoproteico desaparecen. Por lo tanto, el selenio aminora los efectos del alcohol y la dieta hipoproteica, al igual que pasara con la osteocalcina.



Gráfica 13: Factor de crecimiento insulínico tipo 1 (ng/ml).

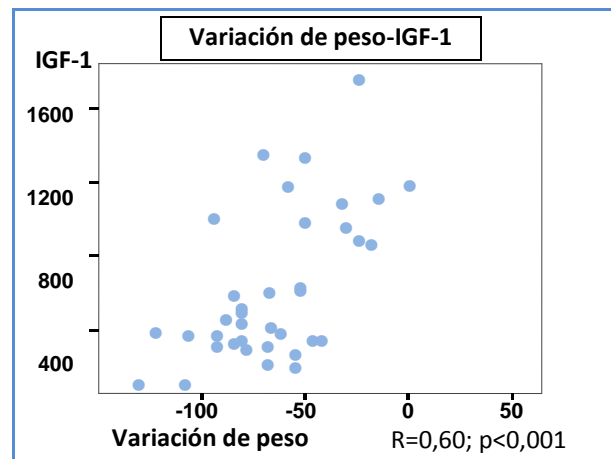
Grupo	PTH (pg/dl)	IGF-1 (ng/ml)
1 (CT)	690 ± 347	1105 ± 494
2 (HP)	611 ± 375	917 ± 386
3 (OH)	496 ± 382	784 ± 336
4 (OHHP)	496 ± 349	323 ± 74
5 (CT-Se)	915 ± 249	439 ± 323
6 (HP-Se)	1278 ± 721	449 ± 135
7 (OH-Se)	755 ± 378	393 ± 180
8 (OHHP-Se)	909 ± 428	551 ± 87
F; p	NS	F=4,67; p=0,001
Diferencias entre grupos (SNK)		1 vs 4-8
Efectos principales		
OH		F=4,69; p=0,037
Se		F=10,73; p=0,002
Interacción doble HP-Se		F=4,24; p=0,47
Interacción doble OH-Se		F=5,99; p=0,019
9 (AL)	787 ± 760	2047 ± 774
Diferencias 1-9	NS	T=2,60; p=0,027

Tabla 15: Valores promedio y desviación estándar por grupos de Factor de crecimiento insulínico tipo 1 y Hormona paratiroidea. Acrónimos: 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 – Test de Student-Newman-Keuls; IGF-1 – Factor de crecimiento insulínico tipo 1; PTH – Hormona paratiroidea.

3.1.1 Relaciones con parámetros nutricionales

Observamos una correlación estadísticamente significativa entre IGF-1 y la variación de peso ($R=0,60$, $p<0,001$).

En el grupo de ratas no tratadas con selenio, se observó además una relación con la albúmina que resultó estadísticamente significativa ($R=0,50$; $p=0,034$).



Gráfica 14: Relación entre Factor de crecimiento insulínico tipo 1 (ng/ml) y variación de peso (g).

3.1.2 Relaciones con parámetros de formación de hueso

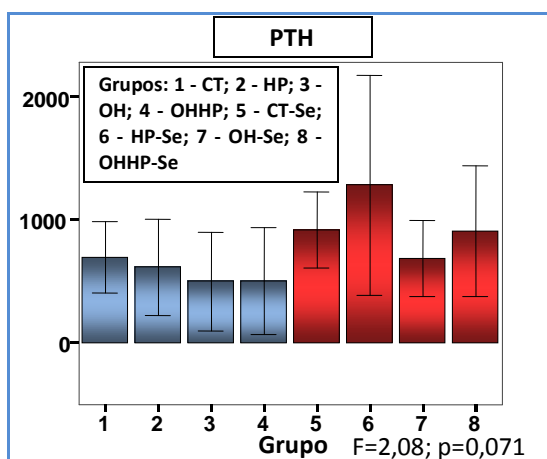
La IGF-1 guardó una relación significativa con la osteocalcina ($R=0,50$; $p<0,001$), como ya se comentó.

También se observó relación –rozando la significación estadística– con el hueso trabecular ($R=0,32$, $p=0,053$).

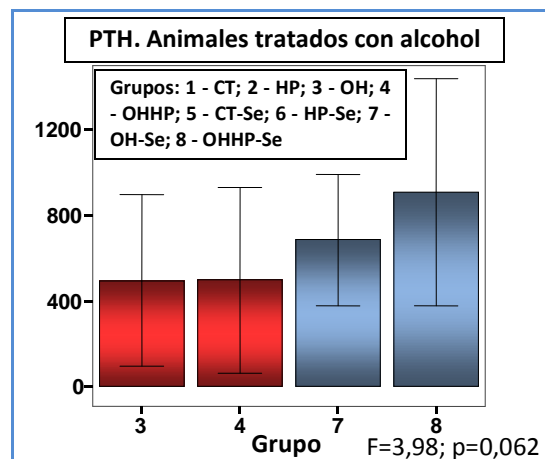
No se observaron otras relaciones estadísticamente significativas.

3.2 HORMONA PARATIROIDEA

No encontramos diferencias significativas entre los 8 grupos estudiados ($F=2,08$; $p=0,071$), aunque el alcohol tiende a disminuir los niveles de PTH, sin que este descenso llegue a resultar significativo ($F=2,79$; $p=0,1$). En cambio, el selenio aumenta los valores de esta hormona ($9,71$; $p=0,004$; Gráfica 15, pág. 120).



Gráfica 15: Hormona paratiroidea (pg/dl) en todos los grupos.



Gráfica 16: Hormona paratiroidea (pg/dl) en animales tratados con alcohol.

Si analizamos por separado el grupo de las ratas no alcohólicas, observamos que el selenio tiende a incrementar los valores de PTH ($F=5,95$; $p=0,024$) tanto de las ratas control, como de las alimentadas con dieta hipoproteica.

Como vemos en la Gráfica 16, existe una tendencia a que los niveles sean más elevados en las ratas alcohólicas tratadas con selenio. Aunque en este grupo, este efecto se encuentra atenuado, perdiendo la significación estadística ($F=3,98$; $p=0,062$).

3.2.1 Relaciones con parámetros nutricionales

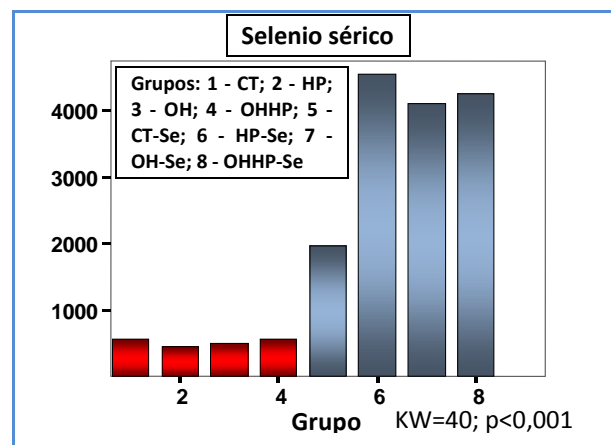
Se halló correlación inversa, estadísticamente significativa con el peso final ($R=-0,40$; $p=0,015$).

No se hallaron otras correlaciones con parámetros nutricionales, ni bioquímicos u hormonales relacionados con el metabolismo óseo.

4. OLIGOELEMENTOS

4.1 SELENIO SÉRICO

Como era de esperar, las ratas tratadas con selenio presentaron niveles de selenio sérico significativamente diferentes del resto (Gráfica 17). Efectivamente, el único factor que influye de forma independiente en el selenio sérico es el aporte de selenio (Tabla 16).



Gráfica 17: Selenio sérico (mediana; ppb).

Grupo	Selenio sérico ($\mu\text{g/L}$)		
	$\bar{X} \pm \text{SD}$		Md (p25 - p75)
1 (CT)	831 \pm 763		559 (438 - 815)
2 (HP)	477 \pm 54		458 (439 - 503)
3 (OH)	516 \pm 37		504 (492 - 550)
4 (OHHP)	554 \pm 107		567 (426 - 623)
5 (CT-Se)	2740 \pm 2255		1962 (1360 - 3234)
6 (HP-Se)	4306 \pm 1763		4555 (2440 - 6040)
7 (OH-Se)	4136 \pm 2210		4109 (1734 - 6492)
8 (OHHP-Se)	4042 \pm 438		4250 (3572 - 4417)
KW; p	KW= 40; p<0,001		
Diferencias entre grupos (SNK)	5-8 vs 1-4		
Efectos principales			
Se	F=95,31; p<0,001		
9 (AL)	564 \pm 316		564 (341 - 787)
Diferencias 1-9	Z=0,52; NS		

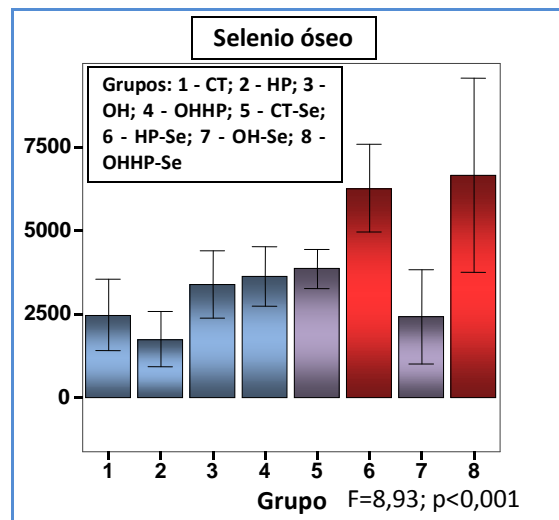
Tabla 16: Valores promedio (\bar{X}), desviación estándar (SD), mediana (Md) y rango intercuartílico, por grupos, de selenio sérico. Acrónimos: Grupos: CT – control; HP – hipoproteico; OH – alcohólico; OHHP – alcohólico hipoproteico; AL – ad libitum; -Se – grupo tratado con selenio. Efectos principales: Se – adición de selenio. Otros acrónimos: NS – no significativo; KW – Kruskal-Wallis; SNK – Test de Student-Newman-Keuls; Z de Mann-Whitney.

4.1.1 Relación con selenio óseo

Los niveles de selenio sérico guardaron relación estadísticamente significativa con los niveles de selenio óseo ($Rho=0,36$; $p=0,007$).

4.2 SELENIO ÓSEO

Como era de esperar, las ratas tratadas con selenio (grupos 5 a 8) mostraban en general una tendencia a niveles de selenio más elevados que las ratas tratadas sin selenio (grupos 1 a 4), siendo especialmente llamativos los resultados relativos a las ratas alimentadas con dieta hipoproteica y alcohólica-hipoproteica (grupos 6 y 8, respectivamente; Gráfica 18).



Gráfica 18: Selenio en hueso (ppb).

En el análisis de varianza de dos vías (Tabla 17) observamos que el aporte de selenio juega un papel independiente sobre el selenio óseo, aunque también la dieta hipoproteica ejerce un papel, reduciéndolo. No obstante, se observa una interacción entre selenio y dieta hipoproteica, de manera que la adición de selenio corrige en las ratas hipoproteicas el déficit anteriormente señalado. También hay una interacción entre selenio y alcohol, reflejándose en el hecho de que las ratas alimentadas con alcohol tienden a tener una mayor concentración de selenio óseo, fenómeno que se contrarresta al añadir selenio (grupos 3 y 7, respectivamente).

Efectos principales	Selenio óseo (ppb)
HP	F=11,75; p=0,001
Se	F=20,11; p<0,001
Interacción doble HP-Se	F=15,62; p<0,001
Interacción doble OH-Se	F=4,81; p=0,033

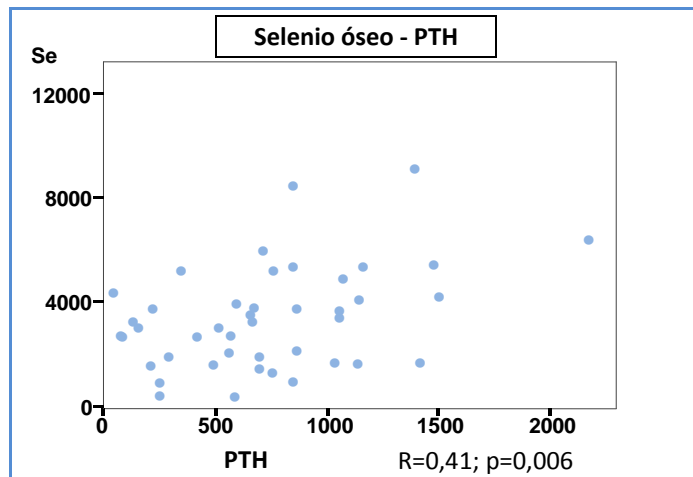
Tabla 17: Efectos principales. Acrónimos: OH: alcohol; HP: dieta hipoproteica; Se: Tratamiento con selenio.

4.2.1 Relaciones con parámetros de destrucción de hueso

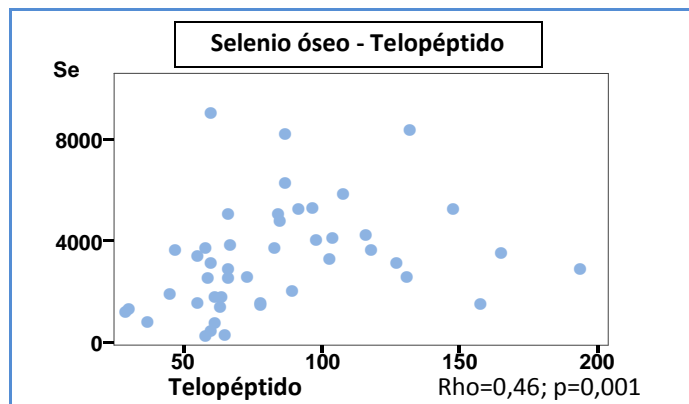
Observamos correlaciones directas entre selenio óseo y marcadores de destrucción del hueso resultaron significativas estadísticamente.

Así, la PTH guardó relación directa con la concentración de selenio en el hueso ($R=0,41$; $p=0,006$; Gráfica 19).

También el telopéptido se correlacionó de forma directa y estadísticamente significativa con la concentración de selenio en hueso ($Rho=0,46$; $p=0,001$). Puede observarse esta correlación, en la Gráfica 20.



Gráfica 19: Relación entre selenio óseo (ppb) y Hormona paratiroidea (pg/dl).



Gráfica 20: Relación entre selenio óseo (ppb) y telopéptido (ng/ml).

4.2.2 Otras relaciones

No fueron observadas otras relaciones significativas entre selenio óseo y hormonas, marcadores de formación o destrucción ósea, o parámetros histológicos.

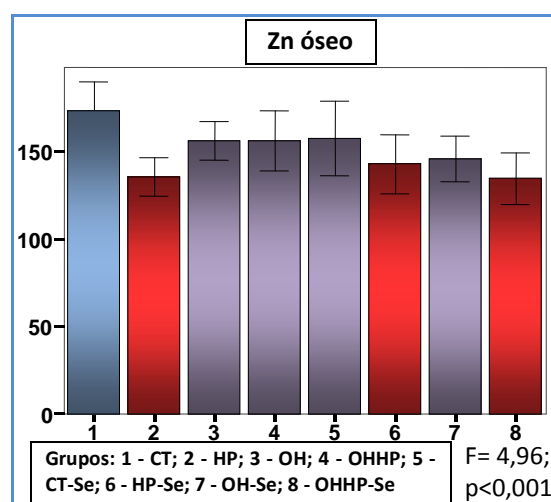
Grupo	Selenio óseo (ppb)	Zinc óseo (ppm)	Hierro óseo (ppm)
1 (CT)	2450 ± 1497	171,6 ± 23,3	179,6 ± 59,5
2 (HP)	1735 ± 991	135,7 ± 13,4	186,4 ± 31
3 (OH)	3379 ± 1230	156,1 ± 13,2	193,6 ± 68,2
4 (OHHP)	3604 ± 1065	156,1 ± 20,7	203,3 ± 45,9
5 (CT-Se)	3853 ± 625	157,8 ± 23,1	140,7 ± 50,6
6 (HP-Se)	6264 ± 1977	131,4 ± 12,3	156,4 ± 23,8
7 (OH-Se)	2473 ± 1703	147,5 ± 17,7	143,4 ± 60,5
8 (OHHP-Se)	6647 ± 3495	134,8 ± 17,8	177,7 ± 25,1
F; p	F=8,09; p<0,001	F= 4,96; p<0,001	NS
Diferencias entre grupos (SNK)	6, 8 vs. 1-5 y 7	1 vs. 2, 6 y 8	
Efectos principales			
HP	F=11,75; p=0,001	F=16,92; p<0,001	
Se	F=20,11; p<0,001	F=6,92; p=0,011	F=8,87; p=0,004
Interacción doble OH-HP		F=7,44; p=0,009	
Interacción doble HP-Se		F=15,62; p<0,001	
Interacción doble OH-Se		F=4,81; p=0,033	
9 (AL)	2327 ± 1643	184,3 ± 27,3	197,7 ± 50
Diferencias 1-9	NS	NS	NS

Tabla 18: Valores promedio y desviación estándar por grupos de selenio óseo (ppb), zinc óseo (ppm) y hierro óseo (ppm). Acrónimos: 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 Test de Student-Newman-Keuls; ppb partes por *billón*²; ppm partes por millón.

4.3 ZINC ÓSEO

Hubo diferencias significativas entre los grupos estudiados (F= 4,96; p<0,001). En términos generales, los valores más elevados correspondían al grupo control (azul), y los más bajos a los grupos hipoproteicos (rojo) (SNK: 1 vs. 2, 6 y 8). Esto puede verse en la Gráfica 21.

La dieta hipoproteica ejerció un efecto independiente y significativo. El selenio mostró una tendencia significativa



Gráfica 21: Zinc óseo (ppm).

² Aquí, *billón* hace referencia a la acepción anglosajona, es decir, 10⁹ unidades.

a disminuir los niveles de zinc en general. En cambio las ratas hipoproteicas alimentadas con selenio, tendían a niveles más elevados que las ratas sin selenio, existiendo una interacción significativa entre ambos factores (Tabla 19).

Efectos principales	Zinc óseo (ppm)
HP	F=16,92; p<0,001
Se	F=6,92; p=0,011
Interacción doble OH-HP	F=7,44; p=0,009

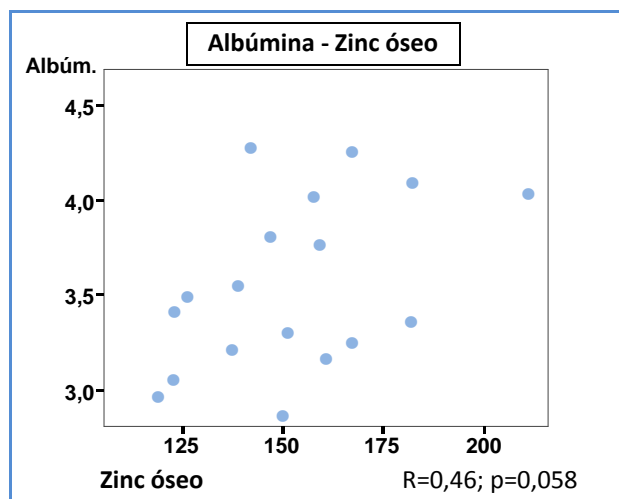
Tabla 19: Efectos principales. Acrónimos: OH: alcohol; HP: dieta hipoproteica; Se: Tratamiento con selenio.

No hallamos diferencias significativas en los niveles de zinc en hueso entre el grupo control y el grupo alimentado *ad libitum*.

Se hallaron correlaciones con parámetros nutricionales y de síntesis ósea, que se analizan a continuación.

4.3.1 Relación con albúmina

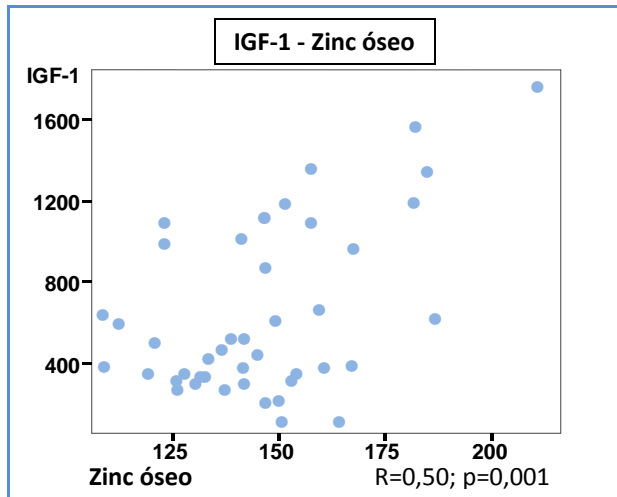
Los niveles de zinc óseo mostraron una tendencia ($R=0,31$; $p=0,092$) a relacionarse con la albúmina. Esta tendencia dependía de los grupos no tratados con selenio (Gráfica 22), en los que es más fuerte, acercándose a la significación estadística la correlación entre zinc óseo y albúmina ($R=0,46$; $p=0,058$). Por el contrario, encontramos que esta relación no es estadísticamente significativa en aquellos animales que han sido tratados con selenio.



Gráfica 22: Relación entre albúmina (g/dl) y zinc óseo (ppm) en animales no tratados con selenio.

4.3.2 Relación con IGF-1

También se observó que existía correlación directa, estadísticamente significativa con los niveles de IGF-1 ($R=0,50$; $p=0,001$; Gráfica 23). Esta correlación dependía del grupo de ratas no tratadas con selenio, en las que la correlación entre IGF-1 y zinc óseo es estrecha ($R=0,59$; $p=0,002$). Al igual que para la albúmina, en las ratas tratadas con selenio no hubo relación alguna.



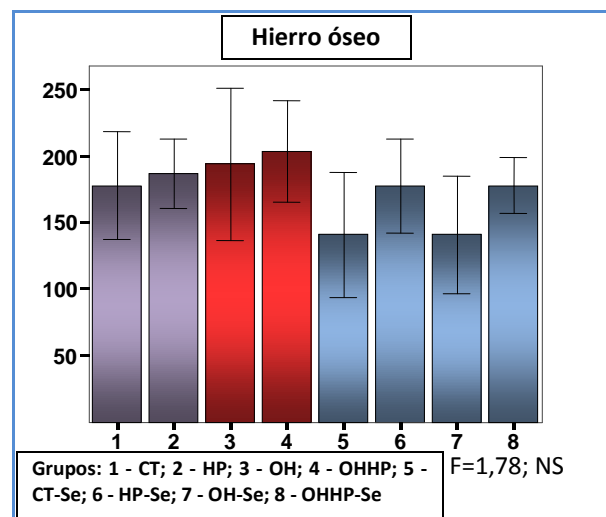
Gráfica 23: Relación entre Factor de crecimiento insulínico (ng/ml) y zinc óseo (ppm).

4.3.3 Otras relaciones

No se hallaron correlaciones significativas con ninguno de los otros parámetros histológicos, marcadores de remodelado u hormonas analizados.

4.4 HIERRO ÓSEO

No encontramos diferencias significativas entre los 8 grupos estudiados (Tabla 18, pág. 124). Sin embargo, las ratas alimentadas con selenio presentaban, en general, niveles más bajos de hierro que las no tratadas, ejerciendo este elemento un



Gráfica 24: Hierro óseo (ppm).

efecto independiente estadísticamente significativo ($F=8,87$; $p=0,004$), según revela el análisis de varianza. Esto se observa claramente en la Gráfica 24 (pág. 126). Como vemos en esta gráfica, los animales no tratados con selenio y alimentados con alcohol y dieta hipoproteica tenían los niveles más altos de hierro.

4.4.1 Relaciones

Se halló relación inversa, estadísticamente significativa ($R=-0,41$; $p=0,022$), entre hierro óseo y albúmina. Tal vez esto se explique por la relación directa entre alcohol y dieta hipoproteica con los niveles de hierro óseo, tal como se comentó en el apartado anterior.

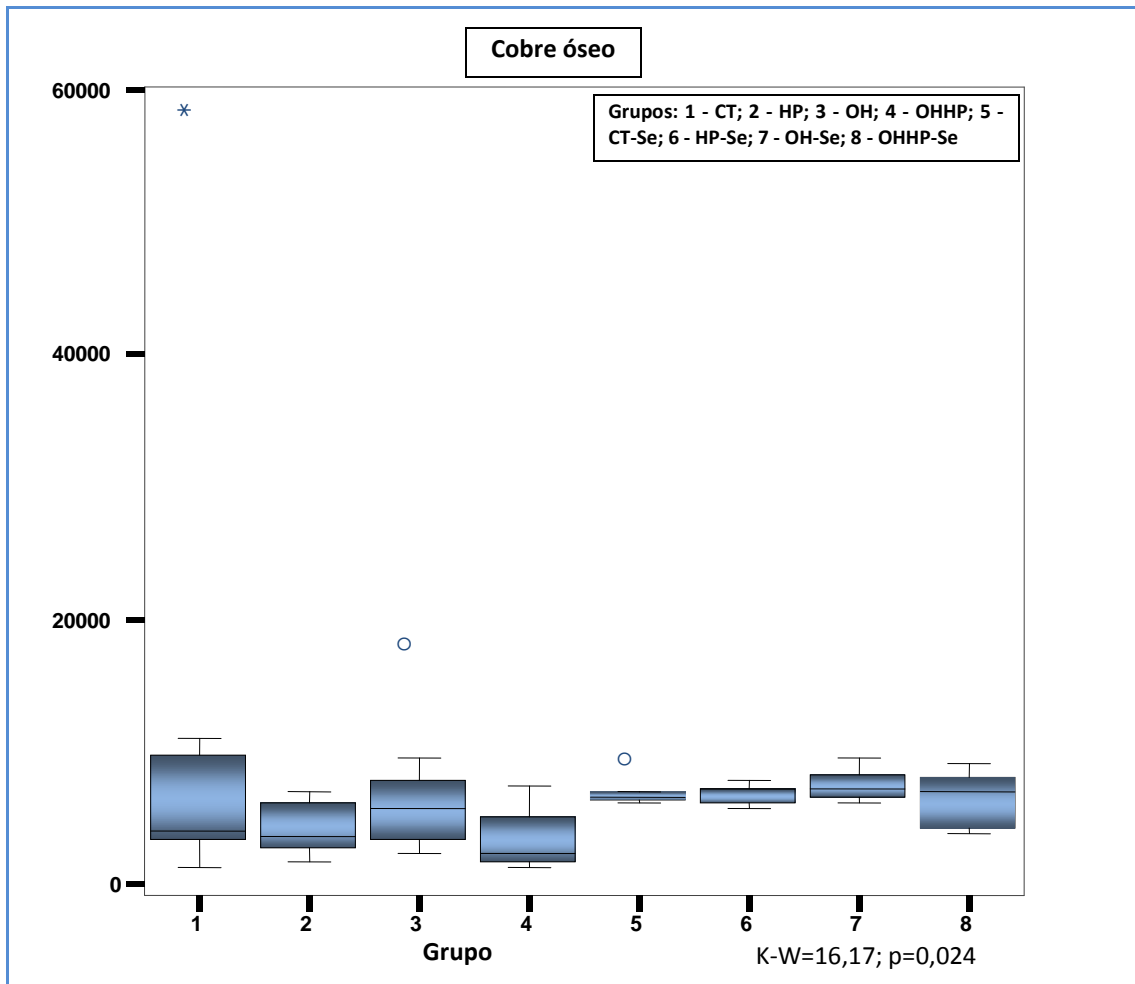
Observamos una relación significativa entre hierro óseo e IGF-1 ($R=0,37$; $p=0,015$). Además se observa una relación inversa entre hierro óseo y PTH ($R=-0,34$; $p=0,025$)

Encontramos también una correlación inversa, estadísticamente significativa ($R=-0,46$; $p=0,041$) entre hierro óseo y telopéptido en animales tratados con selenio, que no está presente en aquellos que no recibieron selenio.

No se observaron otras correlaciones significativas con marcadores de remodelado óseo o parámetros histológicos.

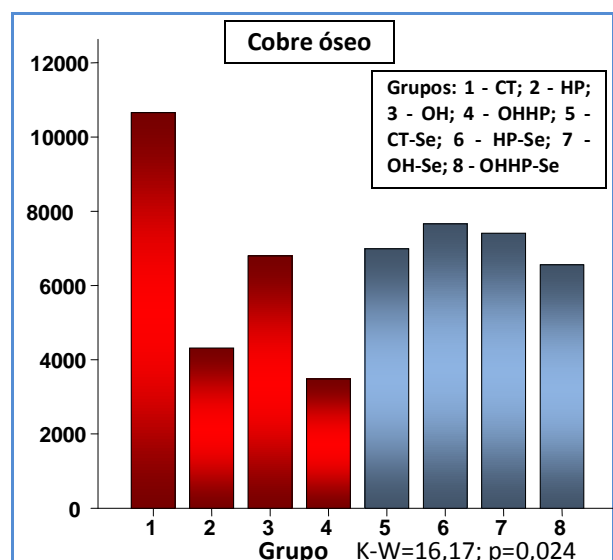
4.5 COBRE ÓSEO

Al contrario que los oligoelementos en el hueso analizados hasta el momento, el cobre y el manganeso –del que hablaremos en el apartado siguiente– presentaron una distribución no paramétrica. Analizamos las diferencias entre los grupos mediante el Test de *Kruskall-Wallis*, observando diferencias significativas entre los ocho grupos analizados ($K-W=16,17$; $p=0,024$; Tabla 21, pág. 130; Gráfica 26 y Gráfica 25, pág. 128).



Gráfica 25: Cobre óseo (ppb).

Aunque en la Gráfica 26 existe una aparente diferencia entre los valores del grupo control con los grupos hipoproteicos con y sin alcohol, y se aprecia además que el tratamiento con selenio disminuye las diferencias observadas, al realizar un análisis de varianza de dos vías, observamos que no hay interacciones significativas considerando los ocho grupos globalmente.



Gráfica 26: Cobre óseo (ppb).

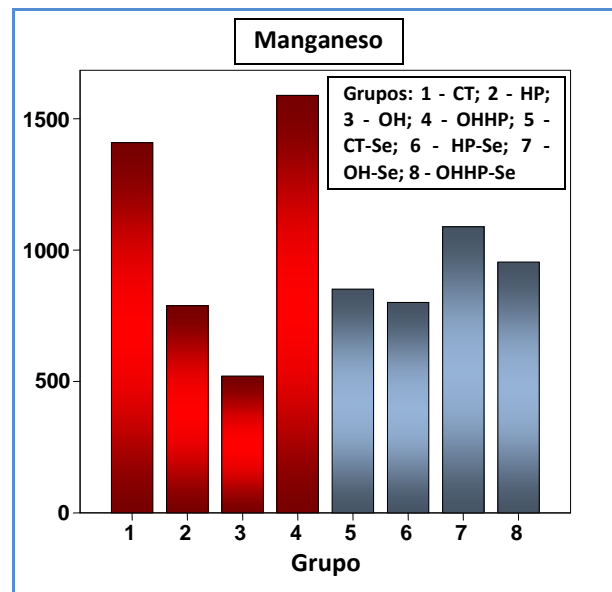
4.5.1 Relaciones

Se encontró una relación directa estadísticamente significativa entre el cobre en hueso y el área de osteoide ($Rho=0,34$; $p=0,013$).

No hubo otras relaciones con significación estadística entre el cobre en hueso y los parámetros de remodelado óseo, hormonas o parámetros histológicos.

4.6 MANGANESO ÓSEO

Se obtuvieron diferencias significativas tras el análisis en los niveles de manganeso óseo ($K-W=25,34$; $p=0,001$), presentando las ratas alcohólicas sin selenio los niveles más bajos. Se aprecia además una interacción con significación estadística entre el factor “dieta hipoproteica” y “alcohol”, ya que si bien por separado cualquiera de ellos mostraba una tendencia a disminuir los niveles de manganeso, cuando



Gráfica 27: Manganeseo óseo (ppb).

ambos factores coexisten, los niveles de manganeso aumentan. Como con otros oligoelementos, la adición de selenio parece aminorar las diferencias (Tabla 20).

Efectivamente, si consideramos únicamente las ratas no tratadas con selenio, observamos que la interacción entre alcohol y dieta hipoproteica es altamente significativa ($F=14,51$; $p=0,001$) y en cambio, si consideramos únicamente

Efectos principales	Manganeseo óseo (ppb)
Interac. doble OH-HP	$F=11,23$; $p=0,001$
Interacción Triple	$F=13,71$; $p<0,001$

Tabla 20: Efectos principales. Acrónimos: OH: alcohol; HP: dieta hipoproteica.

las ratas tratadas con selenio vemos que dicha interacción no existe ($p=0,35$). Sin embargo, al considerar solo a estos animales –tratados con selenio–, obtenemos una interacción con el alcohol ($F=7,48$; $p=0,011$). Este fenómeno puede observarse de forma más clara en la Gráfica 27.

4.6.1 Relaciones

Se encontró una correlación indirecta, estadísticamente significativa entre VOT y manganeso óseo ($Rho=-0,27$; $p=0,043$).

No se hallaron otras correlaciones significativas con ninguno de los parámetros de metabolismo óseo estudiados.

Grupo	Cobre óseo (ppb)		Manganeso óseo (ppb)	
	X ± SD	Md (p25 - p75)	X ± SD	Md (p25 - p75)
1 (CT)	11361 ± 17746	4110 (2995 - 10400)	1409 ± 618	1160 (904 - 1963)
2 (HP)	4313 ± 1987	3782 (2705 - 6491)	788 ± 682	633 (336 - 808)
3 (OH)	6800 ± 4922	5724 (3008 - 8794)	520 ± 369	391 (208 - 918)
4 (OHHP)	3482 ± 2334	2458 (1763 - 5831)	1589 ± 800	1374 (925 - 2468)
5 (CT-Se)	6990 ± 945	6710 (6335 - 7088)	851 ± 115	852 (789 - 955)
6 (HP-Se)	6928 ± 668	7216 (6237 - 7285)	800 ± 155	739 (690 - 970)
7 (OH-Se)	7505 ± 1206	7205 (6504 - 8635)	1089 ± 204	1071 (977 - 1279)
8 (OHHP-Se)	6559 ± 2043	7110 (4365 - 8209)	954 ± 275	930 (715 - 1243)
KW; p	K-W=16,17; p=0,024		K-W= 25,34; p=0,001	
Diferencias entre grupos (Test de SNK)			4 vs 2,3,5,6 y 8; y 1 vs 3	
Efectos principales				
Se	F=8,87; p=0,004			
Interac. doble OH-HP	F=11,23; p=0,001			
Interacción Triple	F=13,71; p<0,001			
9 (AL)	184,3 ± 27,3	3501 (2805-5400)	197,7 ± 50	1705 (902-2662)
Diferencias 1-9	Z=0,87; NS		Z=0,60; NS	

Tabla 21: Valores promedio y desviación estándar (SD); y mediana (Md) y rango intercuartílico (p25-p75) por grupos, de cobre óseo y manganeso óseo. Acrónimos: Grupos: CT – control; HP – hipoproteico; OH – alcohólico; OHHP – alcohólico hipoproteico; AL – ad libitum; -Se – grupo tratado con selenio. Otros acrónimos: NS – no significativo; KW – Test de Kruskal-Wallis; SNK – Test de Student-Newman-Keuls; ppb – partes por *billón*; Z de Mann-Whitney.

5. RESUMEN DE RELACIONES HALLADAS

	Se-sérico	Var. peso	P. final	Albúmina
VOT	-----	R=0,57; P<0,001	R=0,55; P<0,001	NS
AO	-----	R=0,43; P=0,002	R=0,40; P=0,005	NS
OCN	-----	NS	NS	NS
TP	-----	NS	NS	NS
IGF-1	-----	R=0,60; P<0,001	R=0,64; P<0,001	NS
PTH	Rho 0,36; P=0,007	NS	R=-0,40; P=0,015	NS
Se	-----	-----	-----	NS
Zn	-----	-----	-----	R=0,31; P=0,092
Fe	-----	-----	-----	R=-0,41; P=0,022
Cu	-----	-----	-----	NS
Mn	-----	-----	-----	NS

Tabla 22: Relaciones de parámetros histológicos, bioquímicos y hormonales, así como niveles de oligoelementos en hueso, con parámetros nutricionales. En gris los que mostraron tendencia, sin llegar a la significación estadística.

	VOT	AO	OCN	TP	IGF-1	PTH
VOT	-----	-----	NS	NS	R=0,32; P=0,053	NS
AO	-----	-----	NS	NS	NS	NS
OCN	NS	NS	-----	R=0,29; P=0,052	R=0,50; P<0,001	NS
TP	NS	NS	R=0,29; P=0,052	-----	NS	NS
IGF-1	R=0,32; P=0,053	NS	R=0,59; P=0,007	NS	-----	NS
PTH	NS	NS	NS	NS	NS	-----
Se	NS	NS	NS	Rho=0,47; P=0,001	NS	R=0,41; P=0,006
Zn	NS	NS	NS	NS	R=0,50; P=0,001	NS
Fe	NS	NS	NS	NS	R=0,37; P=0,015	R=-0,34; P=0,025
Cu	NS	Rho=0,34; P=0,013	NS	NS	NS	NS
Mn	Rho=-0,27; P=0,043	NS	NS	NS	NS	NS

Tabla 23: Relaciones entre parámetros histológicos, bioquímicos y hormonales, así como niveles de oligoelementos en hueso. En gris los que mostraron tendencia, sin llegar a la significación estadística.

DISCUSIÓN

[DISCUSIÓN]

Discusión

Hemos diseñado este estudio con el objetivo de analizar si la adición de selenio revierte las alteraciones óseas generadas por el alcohol y la malnutrición proteica. Para ello hemos utilizado el modelo de Lieber-DeCarli, ya que permite analizar por separado y conjuntamente los efectos de alcohol y malnutrición proteica. Un requisito importante para este tipo de experimentos estriba en la conveniencia de que todos los grupos de ratas ingieran la misma cantidad de calorías, a fin de que la interpretación de los resultados finales no se vea enturbiada por la eventual presencia de diferencias en el aporte calórico. Esto se consigue tras una observación inicial en la que se identifica al grupo de ratas que menor cuantía ingiere al día. A partir de ese momento se proporciona a todos los animales esa misma cantidad de cada una de las dietas. Este sistema se ha denominado *pair feeding*. Si bien este procedimiento puede ser sencillo de llevar a cabo con pocos grupos de ratas, es mucho más complejo hacerlo cuando, como en nuestro caso, se utilizan ocho grupos de animales. Las dietas de Lieber-DeCarli están diseñadas para ser completas desde un punto de vista nutricional y además para contener idéntica cantidad de oligoelementos, como ya señalamos en el apartado correspondiente.

Una crítica inherente al sistema de *pair feeding* es que si los animales van perdiendo peso a lo largo del estudio –como es habitual en los grupos alimentados con dietas hipoproteicas, especialmente si se añade alcohol a las mismas– la cantidad calórica y de alcohol que reciben las ratas que más peso han perdido por unidad de peso es mayor que la del resto. Por eso en algunos casos como en este estudio, en el cual se pretende analizar los contenidos de oligoelementos en el hueso y su relación con diversos parámetros de metabolismo calcio-fosfórico, es incluso positivo que la cantidad de dieta aportada a los animales con menor peso haya sido menor. En efecto, como expusimos en la Gráfica 1 (pág. 108) cuando analizábamos la cuantía de dieta ingerida en relación al peso de los animales al final del estudio, observamos que no existían diferencias significativas entre los grupos analizados, lo que implica que el aporte total de hierro, cobre, manganeso y zinc por unidad de masa magra era similar en los cuatro grupos.

Como comentamos en la introducción de este trabajo, desde los clásicos estudios de Saville y Lieber, en 1965 (Saville, 1965), se sabe que la masa ósea del alcohólico de edad media es similar a la de ancianos no alcohólicos. En años posteriores y mediante procedimientos histológicos se constató que el alcoholismo provocaba descenso de la masa ósea –es decir, osteoporosis– (Diamond *et al.*, 1989), aunque algunos autores encontraron también osteomalacia en algunos de sus pacientes (Lalor *et al.*, 1986). Se conoce también que el descenso de la masa ósea obedece fundamentalmente a un efecto directo del alcohol sobre el osteoblasto (Feitelberg *et al.*, 1987), siendo más controvertido el efecto sobre la destrucción ósea, aunque al provocar el alcohol una defectuosa absorción de calcio, el hiperparatiroidismo secundario a la hipocalcemia puede sin duda jugar un papel. Pero no todos los autores encuentran exceso de PTH en los alcohólicos crónicos (Diamond *et al.*, 1989; Baran *et al.*, 1980), de tal manera que el exceso de reabsorción ósea en el alcohólico ha sido un tema debatido. Recientemente el descubrimiento del sistema osteoprotegerina-RANKL, y la activación de este último por citocinas proinflamatorias ha reavivado el interés por este aspecto del metabolismo del etanol, habiéndose descrito aumento de la actividad del RANKL –y por lo tanto del osteoclasto– con aumentos compensadores de la osteoprotegerina. En nuestro estudio se observa claramente que el alcohol y la malnutrición proteica provocan un descenso de masa ósea que es aditivo cuando ambos factores actúan conjuntamente, en concordancia con estudios previos realizados utilizando el mismo modelo (Molina-Pérez *et al.*, 2000).

El presunto efecto tóxico del alcohol sobre el osteoblasto no es conocido en sus detalles íntimos. Estudios llevados a cabo por Kim H. *et al.* (2006) demuestran que el alcohol potencia el efecto peroxidante lesivo del isofluorano sobre el ADN. Un mecanismo parecido –es decir, lesión del ADN por ROS– puede jugar un papel en el síndrome alcohólico fetal (Henderson *et al.*, 1999). Es decir, al menos teóricamente cabe la posibilidad de que la peroxidación del ADN afecte también al osteoblasto y altere así su función. En cualquier caso, como se comentó en la introducción, en el alcohólico crónico existe un aumento de permeabilidad intestinal que promueve el paso de endotoxina a la sangre portal y de ahí al hígado. Esta endotoxina activa a la

célula de Kupffer y provoca liberación de citocinas al tiempo que incremento de la peroxidación lipídica, que liberan más citocinas, formando un ciclo de retroalimentación positiva. Por lo tanto, independientemente de que el alcohol pueda ejercer un efecto directo tóxico sobre el ADN del osteoblasto, mediado por la lesión oxidante, lo que es cierto es que la lesión oxidante incrementa la producción de citocinas circulantes capaces de activar al RANKL. Existe por lo tanto un nexo de unión peroxidación lipídica-osteopenia que puede desdoblarse en un mecanismo dirigido al osteoblasto, es decir, reduciendo la síntesis, y otro, activando al osteoclasto vía RANKL y promoviendo la reabsorción.

El selenio es un potente antioxidante, ya que es el principal cofactor de la Glutación Peroxidasa (GPX), tanto que la actividad de esta enzima es dependiente de los niveles de selenio. En el alcohólico crónico se describen niveles bajos de selenio, que incluso tienen valor pronóstico en el análisis univariante de los datos. La patogenia del déficit de selenio en el alcohólico crónico no es bien conocida; muchos estudios apuntan a que es la malnutrición proteica concomitante la causante de este déficit (Cho *et al.*, 1991; Sempertegui *et al.*, 2003). Dadas estas premisas, es absolutamente pertinente analizar el efecto del selenio sobre la masa ósea en el modelo de Lieber-DeCarli que hemos elegido, ya que como sabemos, dicho modelo permite analizar los efectos del selenio tanto sobre ratas tratadas con alcohol como con malnutrición proteica. Hemos elegido para este estudio administrar una dosis de selenio relativamente alta, aunque en el rango de la utilizada por otros investigadores. El objetivo es, de acuerdo con Sieber *et al.* (2009), administrar una dosis que garantice el correcto funcionamiento de los sistemas antioxidantes modulados por el selenio.

Los resultados en lo que respecta a la masa ósea son sin embargo desalentadores. El selenio no parece ejercer efecto alguno sobre los cambios que inducen el alcohol y la malnutrición, ya que si observamos la Gráfica 4 (pág. 110) vemos que el comportamiento de las ratas tratadas con selenio en lo que respecta a la masa ósea es absolutamente superponible al de las ratas no tratadas con selenio. De manera parecida no observamos tampoco efectos sobre el osteoide. En contraste con observaciones previas no encontramos diferencias significativas en la cantidad de

osteóide entre los grupos analizados. Existió no obstante una relación entre osteóide y peso del animal. La situación de malnutrición proteica obliga al organismo a la utilización por parte del hígado de los aminoácidos disponibles, lo cual tiene sin duda un efecto sobre la síntesis de una matriz proteica como es el osteóide. Aún cuando el selenio no ejerció un efecto global significativo sí que puede apreciarse en la Gráfica 6 (pág. 113) que las ratas alcohólicas hipoproteicas alimentadas con selenio no presentaban la tendencia al descenso de osteóide que se apreciaba en las ratas no tratadas con selenio. Este resultado concuerda con lo obtenido con la osteocalcina, que, descendida en las ratas alcohólicas hipoproteicas, recuperaba valores normales en las ratas alimentadas de esta manera pero además tratadas con selenio.

La osteocalcina es un marcador de síntesis ósea, por lo que podría esperarse que guardara una relación significativa con la cantidad de osteóide. Esto no es así al considerar la totalidad de animales pero sí se observa cuando se analizan por separado las ratas tratadas con selenio y sin selenio. En el grupo tratado con selenio hay una relación significativa entre osteóide y osteocalcina, plenamente en concordancia con lo que se acaba de comentar.

En el grupo no tratado con selenio, la osteocalcina guarda relación directa con la variación de peso. Este resultado es absolutamente lógico, ya que si la osteocalcina refleja un proceso de síntesis, es normal que una rata que se desnutra tenga menores niveles de osteocalcina.

La IGF-1 –o somatomedina C– es una de las principales hormonas estimulantes del crecimiento óseo. Así por ejemplo, los enanismos hipofisarios dependen en gran parte del defectuoso crecimiento del cartílago, como consecuencia de una baja producción de IGF-1. También la IGF-1 juega un papel en la fase de síntesis del remodelado óseo. Múltiples trabajos, tanto en pacientes alcohólicos como en modelos experimentales, encuentran una clara relación entre el IGF-1 y la masa ósea (Ammann *et al.*, 2000; Bourrin *et al.*, 2000; Bourrin *et al.*, 2000; George *et al.*, 2009) y o parámetros de formación de hueso, tanto histológicos, como bioquímicos. La IGF-1 se inhibe en situaciones de malnutrición, por lo que son perfectamente explicables las

relaciones encontradas entre variación de peso e IGF-1. Como era de esperar, la IGF-1 estaba claramente descendida en los animales alimentados con dieta hipoproteica y alcohol, aunque el análisis multivariante identifica al alcohol –y no a la malnutrición– como el factor independiente de mayor significación estadística. También se explica de forma sencilla la relación entre IGF-1 –factor promotor de la síntesis ósea– y osteocalcina –producto que refleja la cuantía de esta síntesis.

Como hemos comentado a propósito de osteoide y osteocalcina, vuelve a observarse que el selenio ejerce un efecto modulador sobre las alteraciones de la IGF-1. Así las ratas tratadas con alcohol, dieta hipoproteica y además selenio presentan unos niveles de osteocalcina similares a las del grupo control alimentado con selenio, aunque hay que señalar que en ambos grupos los niveles de IGF-1 eran claramente inferiores a los del grupo control no tratado con selenio. El efecto del selenio sobre la IGF-1 ha sido estudiado en varios modelos animales y en seres humanos con resultados diversos. Así Karl *et al.* (2009) encuentra una relación directa en mujeres jóvenes entre niveles de selenio e IGF-1, resultado congruente con el referido por Moreno-Reyes *et al.* (2001) quienes observan que el déficit de selenio induce retraso en el crecimiento y disminución de los niveles de IGF-1. En cambio, Ward *et al.* (2008) encuentra que no se afecta la IGF-1 por la suplementación de la dieta con selenio, resultado similar al de Meltzer y Haugh (1995) quienes encuentran que la ingesta de selenio no modifica los niveles de IGF-1. Además de lo comentado, otros autores han observado que la adición de selenio reduce el crecimiento del cáncer de próstata (Lindshield *et al.*, 2010; Tolman *et al.*, 2008), asociándose este efecto a una reducción de los niveles de IGF-1 en ratas. Nuestros resultados concuerdan con esta última observación, a excepción del grupo de ratas tratadas con alcohol y con dieta pobre en proteínas en las que el selenio sí parece tener un efecto positivo. El selenio se acumula en los gránulos secretorios de las células hipofisarias productoras de GH. Por eso en animales intoxicados con selenio se observa un descenso de la IGF-1 y de la GH. Las dosis empleadas en nuestro estudio no son en absoluto tóxicas, estando en el rango de lo empleado por otros investigadores para garantizar un efecto antioxidante, pero no

podemos descartar un efecto como el descrito sobre la secreción de IGF-1, lo que explicaría por otra parte la aparente ausencia de eficacia sobre la masa ósea.

Lo que es cierto es que el efecto trófico de la IGF-1 sobre el hueso se aprecia también en nuestro estudio dado que globalmente encontramos una relación prácticamente significativa entre IGF-1 y masa ósea y además entre IGF-1 y osteocalcina.

Como antes comentamos el alcohol puede provocar hipocalcemia. Ésta puede estimular a la PTH y provocar un aumento de la reabsorción ósea. La lógica de este mecanismo no se ve refrendada sin embargo por los resultados obtenidos por la mayoría de los autores que han estudiado la osteopatía metabólica en el alcohólico. Así Baran *et al.* (1980) y Diamond *et al.* (1989) y Kim *et al.* (2003), entre otros, no encuentran variación en la PTH en pacientes alcohólicos. VanderJagt *et al.* (2007) encuentran un aumento de la destrucción ósea solamente en varones mientras que George *et al.* (2009) encuentran mayores niveles de deoxipiridinolina –marcador de destrucción ósea– en la mayoría (pero no en todos) de los pacientes afectados de hepatopatía crónica alcohólica. Crawford *et al.* (2003) encuentran una relación entre la intensidad de la reabsorción ósea y la función hepática. Pero sin embargo, Kim *et al.* (2003) no encuentran que difiera la intensidad de la reabsorción ósea entre pacientes y controles. No hemos encontrado en el presente trabajo alteraciones de la PTH en los grupos de animales estudiados, aunque hay que resaltar una tendencia del selenio a aumentar los valores de PTH tanto en ratas alcohólicas como en ratas no alcohólicas. Moreno-Reyes *et al.* (2001) en ratas con dieta pobre en selenio encontró un aumento al doble de los niveles de PTH, que los explica al haber encontrado hipocalcemia.

De la misma manera que la PTH no mostró diferencias significativas entre los distintos animales estudiados tampoco encontramos diferencias estadísticamente significativas en lo referente al telopéptido. No olvidemos que el telopéptido es un marcador de la destrucción de colágena, tanto ósea como hepática. Por eso la interpretación de sus niveles se complica cuando hay cirrosis hepática, hecho que no se produjo en nuestros animales. En las situaciones de malnutrición proteica es

frecuente que se observe una osteoporosis de bajo *turnover*, caracterizada por niveles bajos de osteocalcina y niveles bajos también de telopéptido. En nuestro estudio tampoco podemos colegir que exista una situación de este tipo, ya que el grupo de ratas control presentaba unos niveles de selenio similar a los del resto. Debemos señalar no obstante como hecho curioso, que la tendencia observada en ratas alcohólicas a un aumento del telopéptido desaparece en los animales tratados con selenio, volviendo a actuar este no metal como un elemento modulador de las alteraciones inducidas por el alcohol y la malnutrición.

HIERRO

Como antes comentamos el hierro es un elemento con capacidad oxidante, por lo que se ha involucrado en la lesión hepática –al menos como mecanismo coadyuvante– en el alcohólico crónico. El alcohol es un factor conocido que tiende a provocar sobrecarga de hierro en el hígado. Frente a la unanimidad de resultados relativos a la sobrecarga de hierro hepático, el comportamiento del hierro en el hueso de los animales alcohólicos ha sido mucho menos estudiado.

Una de las principales conclusiones en este sentido derivan de observaciones clínicas realizadas en procesos diferentes del alcoholismo, aunque Preedy *et al.* (1991) han estudiado en modelos murinos el contenido de hierro, encontrando que este se incrementa en un 15% tras 42 días de tratamiento con alcohol.

En nuestro estudio, aunque no observamos diferencias significativas, las ratas alimentadas con dieta hipoproteica y alcohol presentaban niveles más altos de hierro óseo. Actualmente se conoce el efecto de la hepcidina sobre el metabolismo del hierro, regulando la absorción de hierro en relación a las reservas corporales de hierro, habiéndose visto que con el consumo crónico de alcohol este mecanismo es imperfecto, lo que genera un aumento de la absorción de hierro pese a una eventual sobrecarga de hierro en el organismo. En este sentido el efecto es sinérgico con el de

la malnutrición proteica, habiéndose descrito un incremento de la sobrecarga hepática de hierro cuando malnutrición y alcoholismo coexisten.

La sobrecarga de hierro en hígado (que mejor valora las reservas corporales de hierro) tiende a producirse, como hemos comentado, en las ratas alimentadas con dieta alcohólica e hipoproteica, aunque tampoco aquí las diferencias son estadísticamente significativas. No obstante, este exceso de hierro puede ejercer un efecto deletéreo sobre la síntesis ósea, ya que en general el hierro es un elemento prooxidante y su sobrecarga se ha asociado a peroxidación lipídica y lesión de otras organelas por el exceso de radicales oxidantes (ROS). Así se ha descrito (Weinberg, 2008; Isomura *et al.*, 2004) mayor osteoporosis en individuos con sobrecarga férrica, constituyendo la hemocromatosis el paradigma de esta aseveración. Como es sabido, la osteoporosis es una constante en este proceso, que clásicamente se atribuía al hipogonadismo característico de dicha enfermedad. Recientemente Sinigaglia *et al.* (1997) demostraron mediante análisis de regresión logística que era la cantidad de hierro en hueso el principal factor relacionado de forma independiente con la osteopenia de estos pacientes. Estos resultados concuerdan con los estudios de Vernejoul *et al.* (1984), quien observa disminución de la síntesis ósea en cerdos tratados con hierro parenteral. Otras observaciones recientes en las que se encuentra también un descenso de la masa ósea en pacientes con sobrecarga férrica –como por ejemplo, afectos de beta-talasemia (Weinberg, 2008) – han respaldado la hipótesis de que la lesión ósea obedece a la activación de citocinas proinflamatorias derivadas del efecto oxidante del hierro. La presencia de ROS constituye un estímulo de primer orden para que los macrófagos secreten citocinas proinflamatorias como el TNF- α y la IL-6, quienes a su vez activan al RANKL y promueven por lo tanto la actividad del osteoclasto.

También el efecto prooxidante del hierro parece jugar un papel independiente de las citocinas sobre la diferenciación y función del osteoblasto por una parte, siendo inductor también de la apoptosis de estas células. Por lo tanto, si es la lesión oxidante la causante del descenso de la masa ósea que se observa en las situaciones de sobrecarga de hierro y si es el modelo de Lieber-DeCarli una situación en la que se

combinan alcoholismo y malnutrición proteica –ambos inductores de una sobrecarga férrica y de una pérdida de masa ósea– es lógico pensar que la adición de un antioxidante pueda revertir estos cambios. Aunque en nuestro estudio no hubo una relación significativa entre masa ósea y hierro óseo, conviene subrayar que la menor masa ósea se observó en las ratas alimentadas con alcohol y dieta hipoproteica, es decir, en aquellas que presentaban unos niveles de sobrecarga férrica más acentuados. No todos los autores han encontrado una relación entre osteoporosis y hierro óseo. Estudios preliminares de nuestro grupo (González-Reimers *et al.*, 2005b) no muestran relación, en concordancia con los estudios de Soliman *et al.* (1998) en niños afectados de β -talasemia. La adición de otros antioxidantes tampoco ha mostrado (Wolf *et al.*, 2005) mejoría de la osteoporosis en mujeres posmenopáusicas suplementadas con antioxidante.

Aún cuando carente de significación estadística, llama la atención el efecto del selenio sobre el hierro óseo. De manera similar a lo observado con otras variables analizadas en el presente trabajo la adición de selenio parece aminorar los cambios producidos por alcohol y dieta hipoproteica, tendiendo por lo general a disminuir la cantidad de hierro óseo en todos los grupos. Evidentemente esto tiene una base teórica. Se conoce que en situaciones de inflamación crónica, probablemente a través de la hepcidina, se produzca un secuestro del hierro en el Sistema Mononuclear Fagocítico (SMF); la hepcidina sería una vía final común del efecto de citocinas proinflamatorias liberadas en este tipo de situaciones. El consumo crónico de alcohol se acompaña de una liberación de citocinas que remeda en cierta forma lo que ocurre en una situación infamatoria crónica. Además, como se mencionó, los ROS promueven una síntesis aún mayor de citocinas proinflamatorias. Siendo el selenio un potente antioxidante no sería de extrañar que protegiera al hueso de la sobrecarga férrica como parece ocurrir en nuestro caso. Es llamativo en este sentido que en pacientes con hemoglobinopatías y sobrecarga férrica se encontrara hasta en un 75% de los casos déficit de selenio (Claster *et al.*, 2009). Otros autores encuentran que los pacientes con betatalasemia *major* y sobrecarga crónica de hierro presentan niveles más bajos de selenio (Bartfay y Bartfay, 2000).

Mención aparte merece la relación encontrada entre hierro óseo y tejido osteoide. Se ha descrito que el exceso de hierro dietético puede provocar osteomalacia, probablemente por interacción con el depósito de calcio a nivel del frente de mineralización. Lo cierto es que osteomalacia focal o difusa se ha descrito en numerosas situaciones caracterizadas por la sobrecarga de hierro (Matsushima *et al.*, 2003; Mahachoklertwattana *et al.*, 2003). Sorprende que en el grupo tratado con selenio la relación entre tejido osteoide y hierro óseo sea aún más estrecha, lo que permite sugerir que el eventual efecto antioxidante del selenio no juega en este caso un papel relevante, por lo que tal vez el mecanismo subyacente nada tenga que ver con los ROS.

Estos resultados tienen no obstante otra interpretación. Por ejemplo se sabe que el hierro es cofactor de la 1- α -hidroxilasa, por lo que el déficit de hierro disminuye también la mineralización del hueso. Además, el hierro es un cofactor necesario para la síntesis de la matriz colágena del tejido osteoide. Tal vez por esto se hayan descrito en ratas tratadas con una dieta pobre en hierro, descenso de la masa ósea y de la mineralización. De la misma manera se puede explicar que los niveles de hierro óseo guarden una relación significativa, en nuestro estudio, con el osteoide.

Es de resaltar que no existen en humanos datos concluyentes acerca de la relación entre ferropenia y osteoporosis. En un estudio en aproximadamente 354 mujeres jóvenes en crecimiento (Ilich-Ernst *et al.*, 1998) se observó únicamente una débil relación entre masa ósea a nivel del radio ($R=0,15$; $p=0,04$). Incluso recientemente se ha interpretado esta relación de manera diferente, al comprobarse que la *haptoglobina* puede presentar distintos fenotipos, algunos más ávidos por el hierro que otros. Esta mayor avidéz justifica que quede menor cantidad de hierro libre en sangre, relacionándose sin embargo con una mayor oxidación lipídica (medida mediante niveles de LDL oxidada). Como la *haptoglobina* es antioxidante, los autores de este estudio plantean la posibilidad de que los distintos fenotipos de *haptoglobina* tienen distinta capacidad anti-oxidante y que por lo tanto el vínculo ferropenia-osteoporosis obedezca también a una lesión oxidante, independientemente de los factores comentados (D'Amelio *et al.*, 2008). Esto daría máxima relevancia a la lesión

oxidante como causante de osteoporosis, hipótesis que desde luego no es avalada por los resultados de nuestro estudio.

COBRE

El déficit de cobre se ha asociado a osteoporosis, fundamentalmente debida a la defectuosa síntesis de matriz ósea, ya que el cobre es necesario para el *cross-linking* de la colágena. En nuestro estudio hemos encontrado una relación estadísticamente significativa entre cobre óseo y osteoide, lo que refuerza el efecto mencionado anteriormente. El efecto del cobre se realiza fundamentalmente por medio del enzima lisil-oxidasa y afecta a la síntesis de cualquier forma de colágeno, ya que se ha descrito también como factor profibrogénico en la hepatopatía alcohólica. Al igual que pasara con el hierro la adición de selenio da la impresión de aminorar los efectos causados por el alcohol y la dieta hipoproteica sobre el cobre óseo. En concordancia con otros resultados, tanto alcohol como dieta hipoproteica tendían a disminuir los niveles (González-Reimers *et al.*, 1998), observándose un efecto aditivo cuando ambos factores actuaban conjuntamente. En cambio no había diferencia alguna en las ratas alimentadas con selenio.

ZINC

Son muchos los estudios que concluyen que el alcohólico crónico es deficiente en zinc (Prasad, 1991). El zinc es necesario para la producción de muchas enzimas involucradas en la síntesis proteica, metabolismo de los ácidos nucleicos y función inmunitaria, pero juega también un importante papel en la transcripción genética (Hambidge, 2000) ya que muchos factores de transcripción contienen los así denominados *zinc-finger domains*, importantes en la interacción con estructuras nucleares (Dreosti, 2001). Existen varios estudios donde se demuestra que los suplementos de zinc ejercen un efecto positivo sobre el crecimiento longitudinal del hueso en humanos, destacan en este sentido los de Díaz-Gómez *et al.* (2003) y

Meriardi *et al.* (2004) en los que se aporta suplementos de zinc a madres gestantes observándose un incremento de talla en los recién nacidos (o suplementos de zinc en la dieta de los recién nacidos) observándose un incremento de talla posterior. Estos estudios vienen a confirmar observaciones previas en roedores o en monos, en los cuales se constataba que el déficit de zinc se asocia a retraso en el crecimiento y defectuosa osificación endocondral (Leek *et al.*, 1984; da Cunha Ferreira *et al.*, 1991). Datos experimentales sugieren que el zinc estimula la síntesis proteica y la formación ósea por medio de incrementar la actividad de la fosfatasa alcalina y otros enzimas clave del osteoblasto (Yamaguchi y Yamaguchi, 1986) En este sentido nuestros resultados son plenamente concordantes con esta observación ya que los niveles de zinc óseo muestran una relación altamente significativa con el IGF-1 que como hemos comentado es una hormona con un papel relevante en el crecimiento óseo. Es curioso no obstante que la relación entre zinc e IGF-1 se observe solo en las ratas no tratadas con selenio, como si el selenio, también aquí, aminorara los cambios inducidos por el alcohol y la dieta hipoproteica sobre el zinc. El zinc es un elemento ligado a proteínas. La restricción proteica, por tanto, se asocia a un déficit de zinc, fenómeno que hemos observado también en nuestro estudio, ya que los niveles más bajos de zinc óseo se observaron en las ratas alimentadas con dieta hipoproteica, siendo los resultados estadísticamente significativos. La importancia del hecho de que el zinc esté ligado a la nutrición proteica se ve avalado también por la relación significativa encontrada entre los niveles de zinc óseo y la albúmina sérica, aunque de nuevo es de destacar que esta relación fue más estrecha y altamente significativa solo en el grupo de ratas no tratadas con selenio, apoyando el efecto modulador del selenio sobre las alteraciones generadas por el alcohol y la dieta hipoproteica.

No encontramos relación entre los niveles de zinc y telopéptido. La mayoría de autores está de acuerdo en que el efecto del zinc sobre el hueso es estimulando la síntesis ósea aunque Kishi y Yamaguchi (1994) también demuestran una disminución de la reabsorción ósea. Sería esperable el haber hallado una relación significativa entre zinc y masa ósea y/o entre zinc y osteoide, a la luz de los mecanismos que hemos expuesto, pero tal relación, aunque positiva, no fue significativa. Puede influir en este

hecho el efecto modulador del selenio al que hemos aludido antes, ya que no concuerda con los resultados mencionados anteriormente, ni tampoco con los obtenidos por nuestro grupo en estudios preliminares (González-Reimers *et al.*, 2005b).

MANGANESO

El manganeso es otro elemento directamente involucrado en la lesión oxidante, ya que es cofactor de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD). También es un elemento ligado a la nutrición proteica por lo que puede verse afectado en el alcohólico crónico, en el cual la malnutrición es extraordinariamente frecuente. Siendo el selenio un potente antioxidante y habiéndose descrito déficit de manganeso en el alcohólico crónico (posiblemente por déficit nutricional asociado) es pertinente que hayamos estudiado el efecto del selenio sobre el manganeso óseo en nuestras ratas.

Los niveles óseos de manganeso han sido menos estudiados que los de otros elementos en parte porque sus concentraciones son mucho más reducidas y en parte también porque su metabolismo es menos conocido. Algunos estudios preliminares no encuentran diferencias significativas entre los niveles de manganeso en ratas alimentadas siguiendo el modelo de Lieber-DeCarli (González-Reimers *et al.*, 1998). Sin embargo otros estudios han relacionado el déficit de manganeso con la osteoporosis. Por ejemplo, Clegg *et al.* (1998) han encontrado un descenso de IGF-1 en situaciones de déficit de manganeso, relacionando este hecho con el retraso en el crecimiento óseo y la disminución de masa ósea observada en animales deficitarios en manganeso. Por otro lado, parece ser que el manganeso modula de forma directa la síntesis del osteoide por medio de la glicosil-transferasa, enzima manganeso dependiente que regula el contenido en mucopolisacáridos de la matriz osteoide (Leach, Jr. *et al.*, 1969). Así, algunos autores han encontrado relación entre el déficit de manganeso y la osteoporosis. Rico *et al.* (2000) encuentra hipomagnesemia en individuos con osteoporosis, resultado que sin embargo no concuerda con los de Preisinger *et al.*

(1995) ni Bureu *et al.* (2002) quienes no encuentran relación entre aporte de manganeso –Preisinger– y manganeso sérico –Bureu– y osteoporosis.

Los resultados del presente estudio son particularmente llamativos: Tanto las ratas alcohólicas como las alimentadas con dieta hipoproteica presentan un marcado descenso del manganeso óseo, de forma similar a los resultados encontrados previamente en el trabajo citado, pero es llamativo que la conjunción de alcohol y dieta hipoproteica anula el descenso provocado por cada uno de los dos factores por separado.

También es llamativo el efecto “modulador” del selenio sobre los cambios en el manganeso óseo producidos por el alcohol y la dieta hipoproteica. En efecto, pese a que al considerar los ocho grupos las diferencias son altamente significativas (KW=25,34; $p=0.001$), al considerar únicamente las ratas tratadas con selenio las diferencias desaparecen ($p=0,35$).

CONCLUSIONES

[CONCLUSIONES]

Conclusiones

1. Hemos encontrado que tanto alcohol como dieta hipoproteica provocan un descenso de masa ósea, particularmente acusado cuando ambos factores coexisten. La adición de selenio no modifica en absoluto estos resultados.

2. El descenso de la masa ósea observado parece obedecer a una defectuosa síntesis, ya que los niveles de osteocalcina están marcadamente descendidos en las ratas alimentadas con alcohol y dieta hipoproteica, al igual que los de IGF-1. Es de destacar que la adición de selenio aminora las diferencias señaladas.

3. Ni el alcohol ni la dieta hipoproteica alteran los niveles de selenio sérico, los cuales dependen únicamente de que se añada selenio o no a la dieta. No encontramos relación entre el selenio óseo y la masa ósea, ni tampoco entre los niveles de selenio y los parámetros bioquímicos implicados en la síntesis ósea, aunque sí en cambio, con aquéllos derivados de la reabsorción ósea

4. Los niveles de hierro óseo tienden a subir con la dieta hipoproteica y el etanol, mientras que los niveles de cobre tienden a descender, aunque ninguno de los dos guarda relación con la masa ósea. La adición de selenio eleva de forma significativa los niveles de cobre óseo y desciende los de hierro; es decir, tiende a aminorar los cambios inducidos por el alcohol y la dieta hipoproteica. Un efecto similar se observa con el manganeso óseo.

5. En cambio, el selenio disminuye significativamente los niveles óseos de zinc, que ya estaba más descendido en los grupos alimentados con dieta hipoproteica. No obstante, este efecto no tuvo repercusión sobre la masa ósea, que no guardó relación con los niveles de zinc.

BIBLIOGRAFÍA

[BIBLIOGRAFÍA]

Bibliografía

Aaseth J., Smith-Kielland A. y Thomassen Y. (1986). Selenium, alcohol and liver diseases. *Ann.Clin.Res.*, 18, 43-47.

Abbott L., Nadler J. y Rude R.K. (1994). Magnesium deficiency in alcoholism: possible contribution to osteoporosis and cardiovascular disease in alcoholics. *Alcohol Clin.Exp.Res.*, 18, 1076-1082.

Adachi T., Aonuma Y., Tanaka M., Hojo M., Takano-Yamamoto T. y Kamioka H. (2009). Calcium response in single osteocytes to locally applied mechanical stimulus: differences in cell process and cell body. *J.Biomech.*, 42, 1989-1995.

Adam C.J. y Askin G.N. (2009). Lateral bone density variations in the scoliotic spine. *Bone*, 45, 799-807.

Addolorato G., Capristo E., Greco A.V., Stefanini G.F. y Gasbarrini G. (1997). Energy expenditure, substrate oxidation, and body composition in subjects with chronic alcoholism: new findings from metabolic assessment. *Alcohol Clin.Exp.Res.*, 21, 962-967.

Aguirre J.I., Plotkin L.I., Stewart S.A., Weinstein R.S., Parfitt A.M., Manolagas S.C. *et al.* (2006). Osteocyte apoptosis is induced by weightlessness in mice and precedes osteoclast recruitment and bone loss. *J.Bone Miner.Res.*, 21, 605-615.

al-Rashid R.A. y Spangler J. (1971). Neonatal copper deficiency. *N.Engl.J.Med.*, 285, 841-843.

Ammann P., Bourrin S., Bonjour J.P., Meyer J.M. y Rizzoli R. (2000). Protein undernutrition-induced bone loss is associated with decreased IGF-I levels and estrogen deficiency. *J.Bone Miner.Res.*, 15, 683-690.

Auld D.S. y Bergman T. (2008). 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.

Bacon, B. R. (2008). Cirrosis y sus complicaciones. In Fauci, Braunwald, Kasper, Hauser, Longo, Jameson, & Loscalzo (Eds.), *Harrison. Principios de Medicina Interna* (17 ed., pp. 1971-1979). México D.F., México: McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A.

Bakker A.D., Klein-Nulend J., Tanck E., Albers G.H., Lips P. y Burger E.H. (2005). Additive effects of estrogen and mechanical stress on nitric oxide and prostaglandin E2 production by bone cells from osteoporotic donors. *Osteoporos.Int.*, 16, 983-989.

Baran D.T., Teitelbaum S.L., Bergfeld M.A., Parker G., Cruvant E.M. y Avioli L.V. (1980). Effect of alcohol ingestion on bone and mineral metabolism in rats. *Am.J.Physiol*, 238, E507-E510.

Baron J.A., Farahmand B.Y., Weiderpass E., Michaelsson K., Alberts A., Persson I. *et al.* (2001). Cigarette smoking, alcohol consumption, and risk of hip fracture in women. *Arch.Intern.Med.*, 161, 983-988.

Bartfay W.J. y Bartfay E. (2000). Systemic oxygen-free radical production in iron-loaded mice. *West J.Nurs.Res.*, 22, 927-935.

Bendavid E.J., Shan J. y Barrett-Connor E. (1996). Factors associated with bone mineral density in middle-aged men. *J.Bone Miner.Res.*, 11, 1185-1190.

Bianda T., Glatz Y., Bouillon R., Froesch E.R. y Schmid C. (1998). Effects of short-term insulin-like growth factor-I (IGF-I) or growth hormone (GH) treatment on bone metabolism and on production of 1,25-dihydroxycholecalciferol in GH-deficient adults. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, 83, 81-87.

Bikle D.D., Genant H.K., Cann C., Recker R.R., Halloran B.P. y Strewler G.J. (1985). Bone disease in alcohol abuse. *Ann.Intern.Med.*, 103, 42-48.

Bikle D.D., Stesin A., Halloran B., Steinbach L. y Recker R. (1993). Alcohol-induced bone disease: relationship to age and parathyroid hormone levels. *Alcohol Clin.Exp.Res.*, 17, 690-695.

Bogden J.D., Al-Rabiai S. y Gilani S.H. (1984). 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*, 14, 407-417.

Bonjour J.P., Ammann P., Chevalley T. y Rizzoli R. (2001). Protein intake and bone growth. *Can.J.Appl.Physiol*, 26 Suppl, S153-S166.

Bourrin S., Ammann P., Bonjour J.P. y Rizzoli R. (2000). Dietary protein restriction lowers plasma insulin-like growth factor I (IGF-I), impairs cortical bone formation, and induces osteoblastic resistance to IGF-I in adult female rats. *Endocrinology*, 141, 3149-3155.

Bourrin S., Toromanoff A., Ammann P., Bonjour J.P. y Rizzoli R. (2000). Dietary protein deficiency induces osteoporosis in aged male rats. *J.Bone Miner.Res.*, 15, 1555-1563.

Brauer M., Lu W. y Ling M. (1997). 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.

Bureau I., Anderson R.A., Arnaud J., Raysiguier Y., Favier A.E. y Roussel A.M. (2002). Trace mineral status in post menopausal women: impact of hormonal replacement therapy. *J.Trace Elem Med Biol.*, 16, 9-13.

Cederbaum A.I., Lu Y. y Wu D. (2009). Role of oxidative stress in alcohol-induced liver injury. *Arch.Toxicol.*, 83, 519-548.

Cemborain A., Castilla-Cortazar I., García M., Quiroga J., Muguerza B., Picardi A. *et al.* (1998). Osteopenia in rats with liver cirrhosis: beneficial effects of IGF-I treatment. *J.Hepatol.*, 28, 122-131.

Chai S.C., Wei C.I., Brummel-Smith K. y Arjmandi B.H. (2008). The role of vitamin E in reversing bone loss. *Aging Clin.Exp.Res.*, 20, 521-527.

Chen J.R., Lazarenko O.P., Shankar K., Blackburn M.L., Badger T.M. y Ronis M.J. (2010). A role for ethanol-induced oxidative stress in controlling lineage commitment of mesenchymal stromal cells through inhibition of Wnt / beta-catenin signaling. *J.Bone Miner.Res.*

Chen X., Deng Y., Zhou Z., Tao Q., Zhu J., Li X. *et al.* (2010). 17beta-estradiol combined with testosterone promotes chicken osteoblast proliferation and differentiation by accelerating the cell cycle and inhibiting apoptosis in vitro. *Vet.Res.Commun.*, 34, 143-152.

Cheng X.G., Yang D.Z., Zhou Q., Zhuo T.J., Zhang H.C., Xiang J. *et al.* (2007). Age-related bone mineral density, bone loss rate, prevalence of osteoporosis, and reference database of women at multiple centers in China. *J.Clin.Densitom.*, 10, 276-284.

Cho H.K., Yang F.L. y Snook J.T. (1991). Effect of chronic ethanol consumption on selenium status and utilization in rats. *Alcohol*, 8, 91-96.

Claster S., Wood J.C., Noetzli L., Carson S.M., Hofstra T.C., Khanna R. *et al.* (2009). Nutritional deficiencies in iron overloaded patients with hemoglobinopathies. *Am.J.Hematol.*, 84, 344-348.

Clegg M.S., Donovan S.M., Monaco M.H., Baly D.L., Ensunsa J.L. y Keen C.L. (1998). The influence of manganese deficiency on serum IGF-1 and IGF binding proteins in the male rat. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.*, 219, 41-47.

Collinge C.A., Lebus G., Gardner M.J. y Gehrig L. (2010). A comparison of quantitative ultrasound of the calcaneus with dual-energy x-ray absorptiometry in hospitalized orthopaedic trauma patients. *J.Orthop.Trauma*, 24, 176-180.

Conde A., González-Reimers E., González-Hernández T., Santolaria F., Martínez-Riera A., Romero-Pérez J.C. *et al.* (1992). Relative and combined roles of ethanol and protein malnutrition on skeletal muscle. *Alcohol Alcohol*, 27, 159-163.

Conlan D., Korula R. y Tallentire D. (1990). Serum copper levels in elderly patients with femoral-neck fractures. *Age Ageing*, 19, 212-214.

Crawford B.A., Kam C., Donaghy A.J. y McCaughan G.W. (2003). The heterogeneity of bone disease in cirrhosis: a multivariate analysis. *Osteoporos.Int.*, 14, 987-994.

Crews F.T., Bechara R., Brown L.A., Guidot D.M., Mandrekar P., Oak S. *et al.* (2006). Cytokines and alcohol. *Alcohol Clin.Exp.Res.*, 30, 720-730.

D'Amelio P., Cristofaro M.A., Tamone C., Morra E., Di B.S., Isaia G. *et al.* (2008). Role of iron metabolism and oxidative damage in postmenopausal bone loss. *Bone*, 43, 1010-1015.

da Cunha Ferreira R.M., Rodríguez González J.I., Monreal M., I y Villa E., I (1991). Changes in the fetal tibial growth plate secondary to maternal zinc deficiency in the rat: a histological and histochemical study. *Teratology*, 44, 441-451.

Dai J., Lin D., Zhang J., Habib P., Smith P., Murtha J. *et al.* (2000). Chronic alcohol ingestion induces osteoclastogenesis and bone loss through IL-6 in mice. *J.Clin.Invest*, 106, 887-895.

Danzeisen R., Araya M., Harrison B., Keen C., Solioz M., Thiele D. *et al.* (2007). How reliable and robust are current biomarkers for copper status? *Br.J.Nutr.*, 98, 676-683.

de Vernejoul M.C., Pointillart A., Golenzer C.C., Morieux C., Bielakoff J., Modrowski D. *et al.* (1984). Effects of iron overload on bone remodeling in pigs. *Am.J.Pathol.*, 116, 377-384.

Diamond T.H., Stiel D., Lunzer M., Wilkinson M. y Posen S. (1989). Ethanol reduces bone formation and may cause osteoporosis. *Am.J.Med.*, 86, 282-288.

Diamond T.H., Stiel D., Lunzer M., McDowall D., Eckstein R.P. y Posen S. (1989). Hepatic osteodystrophy. Static and dynamic bone histomorphometry and serum bone Gla-protein in 80 patients with chronic liver disease. *Gastroenterology*, 96, 213-221.

Diamond T.H., Stiel D. y Posen S. (1989). Osteoporosis in hemochromatosis: iron excess, gonadal deficiency, or other factors? *Ann.Intern.Med*, 110, 430-436.

Diez A., Puig J., Serrano S., Marinoso M.L., Bosch J., Marrugat J. *et al.* (1994). Alcohol-induced bone disease in the absence of severe chronic liver damage. *J.Bone Miner.Res.*, 9, 825-831.

Diez A., Serrano S., Cucurull J., Marinoso L., Bosch J., Puig J. *et al.* (1997). Acute effects of ethanol on mineral metabolism and trabecular bone in Sprague-Dawley rats. *Calcif.Tissue Int.*, 61, 168-171.

Dreosti I.E. (2001). Zinc and the gene. *Mutat.Res.*, 475, 161-167.

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

Duquenne M., Rohmer V., Legrand E., Chappard D., Wion B.N., Basle M.F. *et al.* (1996). Spontaneous multiple vertebral fractures revealed primary haemochromatosis. *Osteoporos.Int.*, 6, 338-340.

Dworkin B.M., Rosenthal W.S., Gordon G.G. y Jankowski R.H. (1984). Diminished blood selenium levels in alcoholics. *Alcohol Clin.Exp.Res.*, 8, 535-538.

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

Dyer S.A., Buckendahl P. y Sampson H.W. (1998). Alcohol consumption inhibits osteoblastic cell proliferation and activity in vivo. *Alcohol*, 16, 337-341.

Ellis H.A. y Peart K.M. (1972). Quantitative observations on mineralized and non-mineralized bone in the iliac crest. *J.Clin.Pathol.*, 25, 277-286.

Farley J.R., Fitzsimmons R., Taylor A.K., Jorch U.M. y Lau K.H. (1985). Direct effects of ethanol on bone resorption and formation in vitro. *Arch.Biochem.Biophys.*, 238, 305-314.

Feitelberg S., Epstein S., Ismail F. y D'Amanda C. (1987). Deranged bone mineral metabolism in chronic alcoholism. *Metabolism*, 36, 322-326.

Feldmann M. y Maini R.N. (2001). Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned? *Annu.Rev.Immunol.*, 19, 163-196.

Felson D.T., Zhang Y., Hannan M.T. y Anderson J.J. (1993). Effects of weight and body mass index on bone mineral density in men and women: the Framingham study. *J.Bone Miner.Res.*, 8, 567-573.

Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I., Alobera-Gracia M.A., del-Canto-Pingarrón M. y Blanco-Jerez L. (2006). Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med.Oral Patol.Oral Cir.Bucal.*, 11, E47-E51.

Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I., Alobera-Gracia M.A., del-Canto-Pingarrón M. y Blanco-Jerez L. (2006). Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process. *Med.Oral Patol.Oral Cir.Bucal.*, 11, E151-E157.

Feskanich D., Korrick S.A., Greenspan S.L., Rosen H.N. y Colditz G.A. (1999). Moderate alcohol consumption and bone density among postmenopausal women. *J.Womens Health*, 8, 65-73.

Firooznia H., Golimbu C., Rafii M., Schwartz M.S. y Alterman E.R. (1984). Quantitative computed tomography assessment of spinal trabecular bone. I. Age-related regression in normal men and women. *J.Comput.Tomogr.*, 8, 91-97.

Firooznia H., Golimbu C., Rafii M. y Schwartz M.S. (1986). Rate of spinal trabecular bone loss in normal perimenopausal women: CT measurement. *Radiology*, 161, 735-738.

Friday K.E. y Howard G.A. (1991). Ethanol inhibits human bone cell proliferation and function in vitro. *Metabolism*, 40, 562-565.

Frost M.L., Blake G.M. y Fogelman I. (2000). Can the WHO criteria for diagnosing osteoporosis be applied to calcaneal quantitative ultrasound? *Osteoporos.Int.*, 11, 321-330.

George J., Ganesh H.K., Acharya S., Bandgar T.R., Shivane V., Karvat A. *et al.* (2009). Bone mineral density and disorders of mineral metabolism in chronic liver disease. *World J.Gastroenterol.*, 15, 3516-3522.

Giouleme O.I., Vyzantiadis T.A., Nikolaidis N.L., Vasiliadis T.G., Papageorgiou A.A., Eugenidis N.P. *et al.* (2006). Pathogenesis of osteoporosis in liver cirrhosis. *Hepatogastroenterology*, 53, 938-943.

Girre C., Hispard E., Therond P., Guedj S., Bourdon R. y Dally S. (1990). Effect of abstinence from alcohol on the depression of glutathione peroxidase activity and selenium and vitamin E levels in chronic alcoholic patients. *Alcohol Clin.Exp.Res.*, 14, 909-912.

González-Reimers E., Durán-Castellón M.C., Martín-Olivera R., López-Lirola A., Santolaria-Fernández F., de la Vega-Prieto M.J. *et al.* (2005). Effect of zinc supplementation on ethanol-mediated bone alterations. *Food Chem.Toxicol.*, 43, 1497-1505.

González-Reimers E., Santolaria-Fernández F., Durán-Castellón M.C. y *et al.* (2005). Lack of relationship between bone iron overload and osteopenia in ethanol fed rats. *Trace elem and electrol*, 22, 57-61.

González-Reimers E., Galindo-Martín L., Santolaria-Fernández F., Sánchez-Pérez M.J., Alvisa-Negrín J., García-Valdecasas-Campelo E. *et al.* (2008). Prognostic value of serum selenium levels in alcoholics. *Biol.Trace Elem.Res.*, 125, 22-29.

Goral V., Simsek M. y Mete N. (2010). Hepatic osteodystrophy and liver cirrhosis. *World J.Gastroenterol.*, 16, 1639-1643.

Gropper, S. S., Smith, J. L., & Groff, J. L. (2008). Lipids. In *Advanced Nutrition and Human Metabolism* (5 ed., pp. 131-177). Belmont, USA: Wadsworth, Gengage Learning.

Haber P.S., Apte M.V., Moran C., Applegate T.L., Pirola R.C., Korsten M.A. *et al.* (2004). Non-oxidative metabolism of ethanol by rat pancreatic acini. *Pancreatology.*, 4, 82-89.

Hambidge M. (2000). Human zinc deficiency. *J.Nutr.*, 130, 1344S-1349S.

Harrison-Findik D.D., Schafer D., Klein E., Timchenko N.A., Kulaksiz H., Clemens D. *et al.* (2006). Alcohol metabolism-mediated oxidative stress down-regulates hepcidin transcription and leads to increased duodenal iron transporter expression. *J.Biol.Chem.*, 281, 22974-22982.

Hase H., Kanno Y., Kojima H., Sakurai D. y Kobata T. (2008). Coculture of osteoclast precursors with rheumatoid synovial fibroblasts induces osteoclastogenesis via transforming growth factor beta-mediated down-regulation of osteoprotegerin. *Arthritis Rheum.*, 58, 3356-3365.

Haseba T. (2009). 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.

Heimbürger, D. C. (2008). Malnutrición y evaluación nutricional. In Fauci, Braunwald, Kasper, Hauser, Longo, Jameson, & Loscalzo (Eds.), *Harrison. Principios de Medicina Interna* (17 ed., pp. 450-454). México D.F., México: McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A.

Heller, J. L. and Zieve, D. (10-5-2010). Intoxicación por cobre. Medline Plus. <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/002496.htm>

Henderson G.I., Chen J.J. y Schenker S. (1999). Ethanol, oxidative stress, reactive aldehydes, and the fetus. *Front Biosci.*, 4, D541-D550.

Hodgson S.F. (1990). Corticosteroid-induced osteoporosis. *Endocrinol.Metab Clin.North Am.*, 19, 95-111.

Hogan H.A., Argueta F., Moe L., Nguyen L.P. y Sampson H.W. (2001). Adult-onset alcohol consumption induces osteopenia in female rats. *Alcohol Clin.Exp.Res.*, 25, 746-754.

Hoidrup S., Prescott E., Sorensen T.I., Gottschau A., Lauritzen J.B., Schroll M. et al. (2000). Tobacco smoking and risk of hip fracture in men and women. *Int.J.Epidemiol.*, 29, 253-259.

Horowitz M.C. (1993). Cytokines and estrogen in bone: anti-osteoporotic effects. *Science*, 260, 626-627.

Horowitz, M. C. & Lorenzo, J. (1996). Local regulators of bone: IL-1, TNF, and lymphotoxin, interferon gamma, IL-8, IL-10, IL-4, the LIF/IL-6 family and additional cytokines. In J.Bilezikian, L. Raisz, & G. Rodan (Eds.), *Principals of bone biology* (1 ed., pp. 687-700). San Diego, California, USA: Academic Press.

Howard G., Andon M., Bracker M., Saltman P. y Strause L. (1992). Low serum copper, a risk factor additional to low dietary calcium in postmenopausal bone loss. *J.Trace Elem.Exp.Med.*, 5, 22-31.

Huang Y.L., Sheu J.Y. y Lin T.H. (1999). Association between oxidative stress and changes of trace elements in patients with breast cancer. *Clin.Biochem.*, 32, 131-136.

Hughes E.R., Leighton T.G., Petley G.W. y White P.R. (1999). Ultrasonic propagation in cancellous bone: a new stratified model. *Ultrasound Med.Biol.*, 25, 811-821.

Huuskonen J., Vaisanen S.B., Kroger H., Jurvelin C., Bouchard C., Alhava E. *et al.* (2000). Determinants of bone mineral density in middle aged men: a population-based study. *Osteoporos.Int.*, 11, 702-708.

Iannotti L.L., Zavaleta N., Leon Z., Shankar A.H. y Caulfield L.E. (2008). Maternal zinc supplementation and growth in Peruvian infants. *Am.J.Clin.Nutr.*, 88, 154-160.

Ilich-Ernst J.Z., McKenna A.A., Badenhop N.E., Clairmont A.C., Andon M.B., Nahhas R.W. *et al.* (1998). Iron status, menarche, and calcium supplementation in adolescent girls. *Am.J.Clin.Nutr.*, 68, 880-887.

Ip C. (1986). Interaction of vitamin C and selenium supplementation in the modification of mammary carcinogenesis in rats. *J.Natl.Cancer Inst.*, 77, 299-303.

Isaia G., Mussetta M., Pecchio F., Sciolla A., di S.M. y Molinatti G.M. (1992). Effect of testosterone on bone in hypogonadal males. *Maturitas*, 15, 47-51.

Isomura H., Fujie K., Shibata K., Inoue N., Iizuka T., Takebe G. *et al.* (2004). Bone metabolism and oxidative stress in postmenopausal rats with iron overload. *Toxicology*, 197, 93-100.

Johansson U., Johnsson F., Joelsson B., Berglund M. y Akesson B. (1986). Selenium status in patients with liver cirrhosis and alcoholism. *Br.J.Nutr.*, 55, 227-233.

Jonas J., Burns J., Abel E.W., Cresswell M.J., Strain J.J. y Paterson C.R. (1993). Impaired mechanical strength of bone in experimental copper deficiency. *Ann.Nutr.Metab*, 37, 245-252.

Joo S.S., Won T.J., Kang H.C. y Lee D.I. (2004). Isoflavones extracted from *Sophorae fructus* upregulate IGF-I and TGF-beta and inhibit osteoclastogenesis in rat bone marrow cells. *Arch.Pharm.Res.*, 27, 99-105.

Kaji T., Kawatani R., Takata M., Hoshino T., Miyahara T., Kozuka H. *et al.* (1988). The effects of cadmium, copper or zinc on formation of embryonic chick bone in tissue culture. *Toxicology*, 50, 303-316.

Kalea A.Z., Lamari F.N., Theocharis A.D., Schuschke D.A., Karamanos N.K. y Klimis-Zacas D.J. (2006). Dietary manganese affects the concentration, composition

and sulfation pattern of heparan sulfate glycosaminoglycans in Sprague-Dawley rat aorta. *Biometals*, 19, 535-546.

Kang X., Zhong W., Liu J., Song Z., McClain C.J., Kang Y.J. *et al.* (2009). Zinc supplementation reverses alcohol-induced steatosis in mice through reactivating hepatocyte nuclear factor-4 α and peroxisome proliferator-activated receptor- α . *Hepatology*, 50, 1241-1250.

Kanis J.A., Johnell O., Gullberg B., Allander E., Elffors L., Ranstam J. *et al.* (1999). Risk factors for hip fracture in men from southern Europe: the MEDOS study. Mediterranean Osteoporosis Study. *Osteoporos.Int.*, 9, 45-54.

Kanis J.A., Johnell O., Oden A., Johansson H., De L.C., Eisman J.A. *et al.* (2005). Smoking and fracture risk: a meta-analysis. *Osteoporos.Int.*, 16, 155-162.

Kanis J.A., Johansson H., Johnell O., Oden A., De L.C., Eisman J.A. *et al.* (2005). Alcohol intake as a risk factor for fracture. *Osteoporos.Int.*, 16, 737-742.

Karasik D., Rosen C.J., Hannan M.T., Broe K.E., Dawson-Hughes B., Gagnon D.R. *et al.* (2002). Insulin-like growth factor binding proteins 4 and 5 and bone mineral density in elderly men and women. *Calcif.Tissue Int.*, 71, 323-328.

Karcioglu, Z. A. (1980). Pathology of Zinc in Copper related disorders in humans and animals. In C.C.Thomas (Ed.), *Zinc and Copper in Medicine* (pp. 181-223). Springfield, Illi., USA.

Karl J.P., Alemany J.A., Koenig C., Kraemer W.J., Frystyk J., Flyvbjerg A. *et al.* (2009). Diet, body composition, and physical fitness influences on IGF-I bioactivity in women. *Growth Horm.IGF.Res.*, 19, 491-496.

Kato Y., Ishikawa-Takata K., Yasaku K., Okawa Y., Kawakami O. y Ohta T. (2005). Changes in metacarpal bone mineral density with age and menopause using computed X-ray densitometry in Japanese women: cross-sectional and longitudinal study. *Ann.Hum.Biol.*, 32, 760-772.

Keiver K. y Weinberg J. (2003). Effect of duration of alcohol consumption on calcium and bone metabolism during pregnancy in the rat. *Alcohol Clin.Exp.Res.*, 27, 1507-1519.

Keiver K., Duggal S. y Simpson M.E. (2005). Ethanol administration results in a prolonged decrease in blood ionized calcium levels in the rat. *Alcohol*, 37, 173-178.

Kim H., Oh E., Im H., Mun J., Yang M., Khim J.Y. *et al.* (2006). Oxidative damages in the DNA, lipids, and proteins of rats exposed to isofluranes and alcohols. *Toxicology*, 220, 169-178.

Kim M.J., Shim M.S., Kim M.K., Lee Y., Shin Y.G., Chung C.H. *et al.* (2003). Effect of chronic alcohol ingestion on bone mineral density in males without liver cirrhosis. *Korean J.Intern.Med.*, 18, 174-180.

Kirkman S. y Nelson D.H. (1988). Alcohol-induced pseudo-Cushing's disease: a study of prevalence with review of the literature. *Metabolism*, 37, 390-394.

Kishi S. y Yamaguchi M. (1994). Inhibitory effect of zinc compounds on osteoclast-like cell formation in mouse marrow cultures. *Biochem.Pharmacol.*, 48, 1225-1230.

Klein R.F. y Carlos A.S. (1995). Inhibition of osteoblastic cell proliferation and ornithine decarboxylase activity by ethanol. *Endocrinology*, 136, 3406-3411.

Klevay L.M. (1998). Lack of a recommended dietary allowance for copper may be hazardous to your health. *J.Am.Coll.Nutr.*, 17, 322-326.

Klevay L.M. y Wildman R.E. (2002). Meat diets and fragile bones: inferences about osteoporosis. *J.Trace Elem.Med.Biol.*, 16, 149-154.

Korpela H., Kumpulainen J., Luoma P.V., Arranto A.J. y Sotaniemi E.A. (1985). Decreased serum selenium in alcoholics as related to liver structure and function. *Am.J.Clin.Nutr.*, 42, 147-151.

Krall E.A. y Dawson-Hughes B. (1993). Heritable and life-style determinants of bone mineral density. *J.Bone Miner.Res.*, 8, 1-9.

Krishnamra N. y Limlomwongse L. (1983). The acute hypocalcaemic effect of ethanol and its mechanism of action in the rat. *Can.J.Physiol Pharmacol.*, 61, 388-394.

Kunitoh S., Tanaka T., Imaoka S., Funae Y. y Monna Y. (1993). 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. (2002). 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.

Lacey D.L., Timms E., Tan H.L., Kelley M.J., Dunstan C.R., Burgess T. *et al.* (1998). Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*, 93, 165-176.

Lai J., Zhou J. y Yin S. (2004). [Effect of selenium and zinc level in diet on bone development in rats exposed to lead]. *Wei Sheng Yan.Jiu.*, 33, 584-586.

Laitinen K. y Valimaki M. (1991). Alcohol and bone. *Calcif.Tissue Int.*, 49 Suppl, S70-S73.

Laitinen K., Karkkainen M., Lalla M., Lamberg-Allardt C., Tunninen R., Tahtela R. *et al.* (1993). Is alcohol an osteoporosis-inducing agent for young and middle-aged women? *Metabolism*, 42, 875-881.

Lalor B.C., France M.W., Powell D., Adams P.H. y Counihan T.B. (1986). Bone and mineral metabolism and chronic alcohol abuse. *Q.J.Med.*, 59, 497-511.

Langlois J.A., Rosen C.J., Visser M., Hannan M.T., Harris T., Wilson P.W. *et al.* (1998). Association between insulin-like growth factor I and bone mineral density in older women and men: the Framingham Heart Study. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, 83, 4257-4262.

Lanyon L.E. (1993). Osteocytes, strain detection, bone modeling and remodeling. *Calcif.Tissue Int.*, 53 Suppl 1, S102-S106.

Laposata E.A. y Lange L.G. (1986). Presence of nonoxidative ethanol metabolism in human organs commonly damaged by ethanol abuse. *Science*, 231, 497-499.

Lappalainen R., Knuutila M., Lammi S., Alhava E.M. y Olkkonen H. (1982). Zn and Cu content in human cancellous bone. *Acta Orthop.Scand.*, 53, 51-55.

Lasco A., Morabito N., Gaudio A., Crisafulli A., Meo A., Denuzzo G. *et al.* (2002). Osteoporosis and beta-thalassemia major: role of the IGF-I/IGFBP-III axis. *J.Endocrinol.Invest*, 25, 338-344.

Leach R.M., Jr., Muenster A.M. y Wien E.M. (1969). Studies on the role of manganese in bone formation. II. Effect upon chondroitin sulfate synthesis in chick epiphyseal cartilage. *Arch.Biochem.Biophys.*, 133, 22-28.

Lee J.H., Nguyen K.H., Mishra S. y Nyomba B.L. (2010). Prohibitin is expressed in pancreatic beta-cells and protects against oxidative and proapoptotic effects of ethanol. *FEBS J.*, 277, 488-500.

Leek J.C., Vogler J.B., Gershwin M.E., Golub M.S., Hurley L.S. y Hendrickx A.G. (1984). Studies of marginal zinc deprivation in rhesus monkeys. V. Fetal and infant skeletal effects. *Am.J.Clin.Nutr.*, 40, 1203-1212.

Lenora J., Ivaska K.K., Obrant K.J. y Gerdhem P. (2007). Prediction of bone loss using biochemical markers of bone turnover. *Osteoporos.Int.*, 18, 1297-1305.

Lieber C.S. y DeCarli L.M. (1989). Liquid diet technique of ethanol administration: 1989 update. *Alcohol Alcohol*, 24, 197-211.

Lieber C.S., DeCarli L.M. y Sorrell M.F. (1989). Experimental methods of ethanol administration. *Hepatology*, 10, 501-510.

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

Lieber C.S., Gentry R.T. y Baraona E. (1994). First pass metabolism of ethanol. *Alcohol Alcohol Suppl*, 2, 163-169.

Lieber C.S. (1997). Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. *Clin.Chim.Acta*, 257, 59-84.

Lindholm J., Steiniche T., Rasmussen E., Thamsborg G., Nielsen I.O., Brockstedt-Rasmussen H. *et al.* (1991). Bone disorder in men with chronic alcoholism: a reversible disease? *J.Clin.Endocrinol.Metab*, 73, 118-124.

Lindsell D.R., Wilson A.G. y Maxwell J.D. (1982). Fractures on the chest radiograph in detection of alcoholic liver disease. *Br.Med.J.(Clin.Res.Ed)*, 285, 597-599.

Lindshield B.L., Ford N.A., Canene-Adams K., Diamond A.M., Wallig M.A. y Erdman J.W., Jr. (2010). Selenium, but not lycopene or vitamin E, decreases growth of transplantable dunning R3327-H rat prostate tumors. *PLoS.One.*, 5, e10423.

Lips P. y van Schoor N.M. (2005). Quality of life in patients with osteoporosis. *Osteoporos.Int.*, 16, 447-455.

Liu S.Z., Yan H., Xu P., Li J.P., Zhuang G.H., Zhu B.F. *et al.* (2009). Correlation analysis between bone mineral density and serum element contents of postmenopausal women in Xi'an urban area. *Biol.Trace Elem.Res.*, 131, 205-214.

Llamas M.A., Aller M.A., Marquina D., Nava M.P. y Arias J. (2009). Bacterial Translocation to Mesenteric Lymph Nodes Increases in Chronic Portal Hypertensive Rats. *Dig.Dis.Sci.*

Lloyd T., Andon M.B., Rollings N., Martel J.K., Landis J.R., Demers L.M. *et al.* (1993). Calcium supplementation and bone mineral density in adolescent girls. *JAMA*, *270*, 841-844.

Lowe N.M., Lowe N.M., Fraser W.D. y Jackson M.J. (2002). Is there a potential therapeutic value of copper and zinc for osteoporosis? *Proc.Nutr.Soc.*, *61*, 181-185.

Mahachoklertwattana P., Sirikulchayanonta V., Chuansumrit A., Karnsombat P., Choubtum L., Sriphrapadang A. *et al.* (2003). Bone histomorphometry in children and adolescents with beta-thalassemia disease: iron-associated focal osteomalacia. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, *88*, 3966-3972.

Manari A.P., Preedy V.R. y Peters T.J. (2003). Nutritional intake of hazardous drinkers and dependent alcoholics in the UK. *Addict.Biol.*, *8*, 201-210.

Manautou J.E. y Carlson G.P. (1991). Ethanol-induced fatty acid ethyl ester formation in vivo and in vitro in rat lung. *Toxicology*, *70*, 303-312.

Manolagas S.C. y Jilka R.L. (1995). Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N.Engl.J.Med.*, *332*, 305-311.

Mansouri A., Gaou I., De K.C., Amsellem S., Haouzi D., Berson A. *et al.* (1999). An alcoholic binge causes massive degradation of hepatic mitochondrial DNA in mice. *Gastroenterology*, *117*, 181-190.

Maravic M., Le B.C., Landais P. y Fardellone P. (2005). Incidence and cost of osteoporotic fractures in France during 2001. A methodological approach by the national hospital database. *Osteoporos.Int.*, *16*, 1475-1480.

Marie P. (1997). Growth factors and bone formation in osteoporosis: roles for IGF-I and TGF-beta. *Rev.Rhum.Engl.Ed*, *64*, 44-53.

Maru B.S., Tobias J.H., Rivers C., Caunt C.J., Norman M.R. y McArdle C.A. (2009). Potential use of an estrogen-glucocorticoid receptor chimera as a drug screen for tissue selective estrogenic activity. *Bone*, *44*, 102-112.

Massardo, L. (14-6-2002). Enfermedades óseas metabólicas.
<http://escuela.med.puc.cl/publ/reumatologia/apuntes/16EnfermedadesOseas.html>

Matsushima S., Torii M., Ozaki K. y Narama I. (2003). Iron lactate-induced osteomalacia in association with osteoblast dynamics. *Toxicol.Pathol.*, *31*, 646-654.

Medline Plus (13-2-2009). Hemoglobina. Medline Plus.
<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/003645.htm>

Meltzer H.M. y Haug E. (1995). Oral intake of selenium has no effect on the serum concentrations of growth hormone, insulin-like growth factor-1, insulin-like growth factor-binding proteins 1 and 3 in healthy women.
Eur.J.Clin.Chem.Clin.Biochem., 33, 411-415.

Merialdi M., Caulfield L.E., Zavaleta N., Figueroa A., Costigan K.A., Dominici F. *et al.* (2004). Randomized controlled trial of prenatal zinc supplementation and fetal bone growth. *Am.J.Clin.Nutr.*, 79, 826-830.

Mesbah M., Nemere I., Papagerakis P., Nefussi J.R., Orestes-Cardoso S., Nessmann C. *et al.* (2002). Expression of a 1,25-dihydroxyvitamin D3 membrane-associated rapid-response steroid binding protein during human tooth and bone development and biomineralization. *J.Bone Miner.Res.*, 17, 1588-1596.

Milachowski K., Moschinski D. y Jaeschock R. (1980). [Significance of magnesium, copper and zinc in medial femur neck fractures in the aged]. *Z.Gerontol.*, 13, 524-529.

Mokuda O., Tanaka H., Hayashi T., Ooka H., Okazaki R. y Sakamoto Y. (2004). Ethanol stimulates glycogenolysis and inhibits both glycogenesis via gluconeogenesis and from exogenous glucose in perfused rat liver. *Ann.Nutr.Metab*, 48, 276-280.

Moreno-Reyes R., Egrise D., Neve J., Pasteels J.L. y Schoutens A. (2001). Selenium deficiency-induced growth retardation is associated with an impaired bone metabolism and osteopenia. *J.Bone Miner.Res.*, 16, 1556-1563.

Morinobu A., Biao W., Tanaka S., Horiuchi M., Jun L., Tsuji G. *et al.* (2008). Epigallocatechin-3-gallate suppresses osteoclast differentiation and ameliorates experimental arthritis in mice. *Arthritis Rheum.*, 58, 2012-2018.

Mutlu M., Argun M., Kilic E., Saraymen R. y Yazar S. (2007). Magnesium, zinc and copper status in osteoporotic, osteopenic and normal post-menopausal women. *J.Int.Med.Res.*, 35, 692-695.

Muzzo S., Leiva L., Lillo R., Pumarino H., Ernst R. y Burrows R. (1995). [Bone mineralization in adolescents suffering from postnatal malnutrition]. *Arch.Latinoam.Nutr.*, 45, 183-186.

Nakagawa N., Kinosaki M., Yamaguchi K., Shima N., Yasuda H., Yano K. *et al.* (1998). RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 253, 395-400.

Nakano A., Kanda T. y Abe H. (1996). Bone changes and mineral metabolism disorders in rats with experimental liver cirrhosis. *J.Gastroenterol.Hepatol.*, 11, 1143-1154.

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

NIH (2000). Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *NIH Consens.Statement*, 17, 1-45.

Noth R.H. y Walter R.M., Jr. (1984). The effects of alcohol on the endocrine system. *Med Clin.North Am.*, 68, 133-146.

Odabasi E., Turan M., Aydin A., Akay C. y Kutlu M. (2008). Magnesium, zinc, copper, manganese, and selenium levels in postmenopausal women with osteoporosis. Can magnesium play a key role in osteoporosis? *Ann.Acad.Med.Singapore*, 37, 564-567.

Oppenheim W.L. (1977). The "battered alcoholic syndrome". *J.Trauma*, 17, 850-856.

Peng T.C. y Gitelman H.J. (1974). Ethanol-induced hypocalcemia, hypermagnesemia and inhibition of the serum calcium-raising effect of parathyroid hormone in rats. *Endocrinology*, 94, 608-611.

Pettway G.J., Meganck J.A., Koh A.J., Keller E.T., Goldstein S.A. y McCauley L.K. (2008). Parathyroid hormone mediates bone growth through the regulation of osteoblast proliferation and differentiation. *Bone*, 42, 806-818.

Pietrapertosa A.C., Minenna G., Colella S.M., Santeramo T.M., Renni R. y D'Amore M. (2009). Osteoprotegerin and RANKL in the pathogenesis of osteoporosis in patients with thalassaemia major. *Panminerva Med.*, 51, 17-23.

Pitts T.O. y Van Thiel D.H. (1986). Disorders of divalent ions and vitamin D metabolism in chronic alcoholism. *Recent Dev.Alcohol*, 4, 357-377.

Prasad A.S. (1991). Discovery of human zinc deficiency and studies in an experimental human model. *Am.J.Clin.Nutr.*, 53, 403-412.

Preedy V.R., Baldwin D.R., Keating J.W. y Salisbury J.R. (1991). Bone collagen, mineral and trace element composition, histomorphometry and urinary hydroxyproline excretion in chronically-treated alcohol-fed rats. *Alcohol Alcohol*, 26, 39-46.

Preisinger E., Leitner G., Uher E., Alacamlioglu Y., Seidl G., Marktl W. *et al.* (1995). [Nutrition and osteoporosis: a nutritional analysis of women in postmenopause]. *Wien.Klin.Wochenschr.*, 107, 418-422.

Pumarino H., González P., Oviedo S., Lillo R. y Bustamante E. (1996). Assessment of bone status in intermittent and continuous alcoholics, without evidence of liver damage. *Rev.Med.Chil.*, 124, 423-430.

Purohit V. (2000). Can alcohol promote aromatization of androgens to estrogens? A review. *Alcohol*, 22, 123-127.

Purohit V. y Brenner D.A. (2006). Mechanisms of alcohol-induced hepatic fibrosis: a summary of the Ron Thurman Symposium. *Hepatology*, 43, 872-878.

Quitterer U., Hoffmann M., Freichel M. y Lohse M.J. (2001). Paradoxical block of parathormone secretion is mediated by increased activity of G alpha subunits. *J.Biol.Chem.*, 276, 6763-6769.

Ragab A.A., Nalepka J.L., Bi Y. y Greenfield E.M. (2002). Cytokines synergistically induce osteoclast differentiation: support by immortalized or normal calvarial cells. *Am.J.Physiol Cell Physiol*, 283, C679-C687.

Reed A.H., McCarty H.L., Evans G.L., Turner R.T. y Westerlind K.C. (2002). The effects of chronic alcohol consumption and exercise on the skeleton of adult male rats. *Alcohol Clin.Exp.Res.*, 26, 1269-1274.

Ren Y., Deng F., Zhu H., Wan W., Ye J. y Luo B. (2010). Effect of epigallocatechin-3-gallate on iron overload in mice with alcoholic liver disease. *Mol.Biol.Rep.*

Rico H. (1990). Alcohol and bone disease. *Alcohol Alcohol*, 25, 345-352.

Rico H., Gómez-Raso N., Revilla M., Hernández E.R., Seco C., Páez E. *et al.* (2000). Effects on bone loss of manganese alone or with copper supplement in ovariectomized rats. A morphometric and densitometric study. *Eur.J.Obstet.Gynecol.Reprod.Biol.*, 90, 97-101.

Rico H., Arribas I., Casanova F.J., Duce A.M., Hernández E.R. y Cortés-Prieto J. (2002). Bone mass, bone metabolism, gonadal status and body mass index. *Osteoporos.Int.*, 13, 379-387.

Riggs B.L., Melton L.J., Robb R.A., Camp J.J., Atkinson E.J., McDaniel L. *et al.* (2008). A population-based assessment of rates of bone loss at multiple skeletal sites: evidence for substantial trabecular bone loss in young adult women and men. *J.Bone Miner.Res.*, 23, 205-214.

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

Rubin J., Ackert-Bicknell C.L., Zhu L., Fan X., Murphy T.C., Nanes M.S. *et al.* (2002). IGF-I regulates osteoprotegerin (OPG) and receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand in vitro and OPG in vivo. *J.Clin.Endocrinol.Metab.*, 87, 4273-4279.

Sahni S., Hannan M.T., Blumberg J., Cupples L.A., Kiel D.P. y Tucker K.L. (2009). Protective effect of total carotenoid and lycopene intake on the risk of hip fracture: a 17-year follow-up from the Framingham Osteoporosis Study. *J.Bone Miner.Res.*, 24, 1086-1094.

Sahni S., Hannan M.T., Gagnon D., Blumberg J., Cupples L.A., Kiel D.P. *et al.* (2009). Protective effect of total and supplemental vitamin C intake on the risk of hip fracture--a 17-year follow-up from the Framingham Osteoporosis Study. *Osteoporos.Int.*, 20, 1853-1861.

Sampson H.W., Hebert V.A., Booe H.L. y Champney T.H. (1998). Effect of alcohol consumption on adult and aged bone: composition, morphology, and hormone levels of a rat animal model. *Alcohol Clin.Exp.Res.*, 22, 1746-1753.

Saville P.D. (1965). Changes in bone mass with age and alcoholism. *J.Bone Joint Surg.Am.*, 47, 492-499.

Scalbert A., Manach C., Morand C., Remesy C. y Jiménez L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev.Food Sci.Nutr.*, 45, 287-306.

Scalbert A., Johnson I.T. y Saltmarsh M. (2005). Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am.J.Clin.Nutr.*, 81, 215S-217S.

Schmidt H., Herwig J. y Greinacher I. (1991). [The skeletal changes in premature infants with a copper deficiency]. *Rofo*, 155, 38-42.

Schnitzler C.M. y Solomon L. (1984). Bone changes after alcohol abuse. *S.Afr.Med.J.*, 66, 730-734.

Schnitzler C.M., Schnaid E., MacPhail A.P., Mesquita J.M. y Robson H.J. (2005). Ascorbic acid deficiency, iron overload and alcohol abuse underlie the severe osteoporosis in black African patients with hip fractures--a bone histomorphometric study. *Calcif.Tissue Int.*, 76, 79-89.

Schnitzler C.M., Mesquita J.M. y Shires R. (2010). Cortical and trabecular bone microarchitecture and turnover in alcohol-induced chronic pancreatitis: a histomorphometric study. *J.Bone Miner.Metab.*

Schott A.M., Cormier C., Hans D., Favier F., Hausherr E., Dargent-Molina P. et al. (1998). How hip and whole-body bone mineral density predict hip fracture in elderly women: the EPIDOS Prospective Study. *Osteoporos.Int.*, 8, 247-254.

Schurch M.A., Rizzoli R., Slosman D., Vadas L., Vergnaud P. y Bonjour J.P. (1998). Protein supplements increase serum insulin-like growth factor-I levels and attenuate proximal femur bone loss in patients with recent hip fracture. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann.Intern.Med.*, 128, 801-809.

Sempertegui F., Estrella B., Vallejo W., Tapia L., Herrera D., Moscoso F. et al. (2003). Selenium serum concentrations in malnourished Ecuadorian children: a case-control study. *Int.J.Vitam.Nutr.Res.*, 73, 181-186.

Senoo H. (2004). Structure and function of hepatic stellate cells. *Med Electron Microsc.*, 37, 3-15.

Sergent O., Griffon B., Cillard P. y Cillard J. (2001). Alcohol and oxidative stress. *Pathol.Biol.(Paris)*, 49, 689-695.

Shankar K., Liu X., Singhal R., Chen J.R., Nagarajan S., Badger T.M. et al. (2008). Chronic ethanol consumption leads to disruption of vitamin D3 homeostasis associated with induction of renal 1,25 dihydroxyvitamin D3-24-hydroxylase (CYP24A1). *Endocrinology*, 149, 1748-1756.

Shimizu K. (2008). Mechanisms of pancreatic fibrosis and applications to the treatment of chronic pancreatitis. *J.Gastroenterol.*, 43, 823-832.

Sieber F., Muir S.A., Cohen E.P., North P.E., Fish B.L., Irving A.A. et al. (2009). High-dose selenium for the mitigation of radiation injury: a pilot study in a rat model. *Radiat.Res.*, 171, 368-373.

Sinigaglia L., Fargion S., Fracanzani A.L., Binelli L., Battafarano N., Varenna M. *et al.* (1997). Bone and joint involvement in genetic hemochromatosis: role of cirrhosis and iron overload. *J.Rheumatol.*, *24*, 1809-1813.

Slemenda C.W., Christian J.C., Williams C.J., Norton J.A. y Johnston C.C., Jr. (1991). Genetic determinants of bone mass in adult women: a reevaluation of the twin model and the potential importance of gene interaction on heritability estimates. *J.Bone Miner.Res.*, *6*, 561-567.

Smith A.M., Picciano M.F. y Milner J.A. (1982). Selenium intakes and status of human milk and formula fed infants. *Am.J.Clin.Nutr.*, *35*, 521-526.

Soliman A.T., El B.N., Abdel F.M., ElZalabani M.M. y Ansari B.M. (1998). Bone mineral density in prepubertal children with beta-thalassemia: correlation with growth and hormonal data. *Metabolism*, *47*, 541-548.

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

Somer L., Matavulj M., Hadzic B. y Vuckovic N. (1996). The hypophyseal-adrenal axis in chronic alcoholism. *Med Pregl.*, *49*, 349-355.

Sripanyakorn S., Jugdaohsingh R., Mander A., Davidson S.L., Thompson R.P. y Powell J.J. (2009). Moderate ingestion of alcohol is associated with acute ethanol-induced suppression of circulating CTX in a PTH-independent fashion. *J.Bone Miner.Res.*, *24*, 1380-1388.

Stewart P.M., Burra P., Shackleton C.H., Sheppard M.C. y Elias E. (1993). 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase deficiency and glucocorticoid status in patients with alcoholic and non-alcoholic chronic liver disease. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, *76*, 748-751.

Stewart S., Prince M., Bassendine M., Hudson M., James O., Jones D. *et al.* (2007). A randomized trial of antioxidant therapy alone or with corticosteroids in acute alcoholic hepatitis. *J.Hepatol.*, *47*, 277-283.

Strelitzki R., Nicholson P.H. y Paech V. (1998). A model for ultrasonic scattering in cancellous bone based on velocity fluctuations in a binary mixture. *Physiol Meas.*, *19*, 189-196.

Suh K.S., Koh G., Park C.Y., Woo J.T., Kim S.W., Kim J.W. *et al.* (2003). Soybean isoflavones inhibit tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis and the production

of interleukin-6 and prostaglandin E2 in osteoblastic cells. *Phytochemistry*, 63, 209-215.

Sullivan J.F. y Heaney R.P. (1970). Zinc metabolism in alcoholic liver disease. *Am.J.Clin.Nutr.*, 23, 170-177.

Swanson C., Lorentzon M., Conaway H.H. y Lerner U.H. (2006). Glucocorticoid regulation of osteoclast differentiation and expression of receptor activator of nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF-kappaB in mouse calvarial bones. *Endocrinology*, 147, 3613-3622.

Tang X.L., Meng H.X. y Zhang L. (2008). Effects of calcitriol on the expression of vitamin D receptor, RANKL and osteoprotegerin in human periodontal ligament cells. *Zhonghua Kou Qiang.Yi.Xue.Za Zhi.*, 43, 732-736.

Thomas S., Movsowitz C., Epstein S., Jowell P. y Ismail F. (1990). The response of circulating parameters of bone mineral metabolism to ethanol- and EDTA-induced hypocalcemia in the rat. *Bone Miner.*, 8, 1-6.

Thuluvath P.J. y Triger D.R. (1992). Selenium in chronic liver disease. *J.Hepatol.*, 14, 176-182.

Tirapegui J., Fukushima S.E. y Grimaldi G. (1993). Growth, somatomedin and nutrition. *Arch.Latinoam.Nutr.*, 43, 94-104.

Tolman J.R., Lephart E.D., Setchell K.D., Eggett D.L. y Christensen M.J. (2008). Timing of supplementation of selenium and isoflavones determines prostate cancer risk factor reduction in rats. *Nutr.Metab (Lond)*, 5, 31.

Tovar-Franco, J. A. (21-4-2005). S/T. <http://www.javeriana.edu.co>

Trombetti A., Herrmann F., Hoffmeyer P., Schurch M.A., Bonjour J.P. y Rizzoli R. (2002). Survival and potential years of life lost after hip fracture in men and age-matched women. *Osteoporos.Int.*, 13, 731-737.

Tsai K.S., Yang R.S. y Liu S.H. (2004). Benzo[a]pyrene regulates osteoblast proliferation through an estrogen receptor-related cyclooxygenase-2 pathway. *Chem.Res.Toxicol.*, 17, 679-684.

Tsukamoto H., Gaal K. y French S.W. (1990). Insights into the pathogenesis of alcoholic liver necrosis and fibrosis: status report. *Hepatology*, 12, 599-608.

Turan B., Bayari S., Balcik C., Severcan F. y Akkas N. (2000). A biomechanical and spectroscopic study of bone from rats with selenium deficiency and toxicity. *Biomaterials*, 13, 113-121.

Turan B., Can B. y Delilbasi E. (2003). Selenium combined with vitamin E and vitamin C restores structural alterations of bones in heparin-induced osteoporosis. *Clin.Rheumatol.*, 22, 432-436.

van Driel M., Koedam M., Buurman C.J., Roelse M., Weyts F., Chiba H. *et al.* (2006). Evidence that both 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 and 24-hydroxylated D3 enhance human osteoblast differentiation and mineralization. *J.Cell Biochem.*, 99, 922-935.

VanderJagt D.J., Okeke E., Calvin C., Troncoso C., Crossey M. y Glew R.H. (2007). Use of calcaneal ultrasound and biochemical markers to assess the density and metabolic state of the bones of adults with hepatic cirrhosis. *J.Natl.Med.Assoc.*, 99, 1024-1029.

Velin P., Dupont D. y Daoud A. (1989). [Nutritional copper deficiency. Apropos of a case]. *Ann.Pediatr.(Paris)*, 36, 269-274.

Visser M., Kiel D.P., Langlois J., Hannan M.T., Felson D.T., Wilson P.W. *et al.* (1998). Muscle mass and fat mass in relation to bone mineral density in very old men and women: the Framingham Heart Study. *Appl.Radiat.Isot.*, 49, 745-747.

Wakamatsu E. y Sissons H.A. (1969). The cancellous bone of the iliac crest. *Calcif.Tissue Res.*, 4, 147-161.

Wang Y., Li Y., Mao K., Li J., Cui Q. y Wang G.J. (2003). Alcohol-induced adipogenesis in bone and marrow: a possible mechanism for osteonecrosis. *Clin.Orthop.Relat Res.*, 213-224.

Ward M.A., Neville T.L., Reed J.J., Taylor J.B., Hallford D.M., Soto-Navarro S.A. *et al.* (2008). Effects of selenium supply and dietary restriction on maternal and fetal metabolic hormones in pregnant ewe lambs. *J.Anim Sci.*, 86, 1254-1262.

Weinberg E.D. (2008). Role of iron in osteoporosis. *Pediatr.Endocrinol.Rev.*, 6 Suppl 1, 81-85.

Wells S.A., Jr., Cooper C.W. y Ontjes D.A. (1975). Stimulation of thyrocalcitonin secretion by ethanol in patients with medullary thyroid carcinoma--an effect apparently not mediated by gastrin. *Metabolism*, 24, 1215-1219.

Werner J., Saghir M., Fernández-Del C.C., Warshaw A.L. y Laposata M. (2001). Linkage of oxidative and nonoxidative ethanol metabolism in the pancreas and toxicity of nonoxidative ethanol metabolites for pancreatic acinar cells. *Surgery*, 129, 736-744.

Werner J., Saghir M., Warshaw A.L., Lewandrowski K.B., Laposata M., Iozzo R.V. *et al.* (2002). Alcoholic pancreatitis in rats: injury from nonoxidative metabolites of ethanol. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol*, 283, G65-G73.

Wheater, P. R., Burkitt, H. G., & Daniels, V. G. (1987). *Functional Histology*. New York.

WHO (2004). *Scientific group on the assessment of osteoporosis at primary health care level*. World Health Organisation.

Wolf R.L., Cauley J.A., Pettinger M., Jackson R., Lacroix A., Leboff M.S. *et al.* (2005). Lack of a relation between vitamin and mineral antioxidants and bone mineral density: results from the Women's Health Initiative. *Am.J.Clin.Nutr.*, 82, 581-588.

Wu D. y Cederbaum A.I. (2009). Oxidative stress and alcoholic liver disease. *Semin.Liver Dis.*, 29, 141-154.

Yamaguchi M. y Yamaguchi R. (1986). Action of zinc on bone metabolism in rats. Increases in alkaline phosphatase activity and DNA content. *Biochem.Pharmacol.*, 35, 773-777.

Yamaguchi M. y Weitzmann M.N. (2009). The estrogen 17beta-estradiol and phytoestrogen genistein mediate differential effects on osteoblastic NF-kappaB activity. *Int.J.Mol.Med.*, 23, 297-301.

Yamaguchi M. (2010). Role of nutritional zinc in the prevention of osteoporosis. *Mol.Cell Biochem.*, 338, 241-254.

Yamasaki K. y Hagiwara H. (2009). Excess iron inhibits osteoblast metabolism. *Toxicol.Lett.*, 191, 211-215.

Yang G., Yin S., Zhou R., Gu L., Yan B., Liu Y. *et al.* (1989). Studies of safe maximal daily dietary Se-intake in a seleniferous area in China. Part II: Relation between Se-intake and the manifestation of clinical signs and certain biochemical alterations in blood and urine. *J.Trace Elem.Electrolytes Health Dis.*, 3, 123-130.

Yang G.Q. y Xia Y.M. (1995). Studies on human dietary requirements and safe range of dietary intakes of selenium in China and their application in the prevention of related endemic diseases. *Biomed.Enviro.Sci.*, 8, 187-201.

Yee C.D., Kubena K.S., Walker M., Champney T.H. y Sampson H.W. (1995). The relationship of nutritional copper to the development of postmenopausal osteoporosis in rats. *Biol.Trace Elem.Res.*, 48, 1-11.

Yin S.J., Chou C.F., Lai C.L., Lee S.L. y Han C.L. (2003). Human class IV alcohol dehydrogenase: kinetic mechanism, functional roles and medical relevance. *Chem.Biol.Interact.*, 143-144, 219-227.

Zelkowitz, M., Verghese, J. P., & Antel, J. (1980). Copper and Zinc in the Nervous System. In C.C.Thomas (Ed.), *Zinc and Copper in Medicine* (pp. 418-463). Springfield, Illi. USA.

Zhang J., Munger R.G., West N.A., Cutler D.R., Wengreen H.J. y Corcoran C.D. (2006). Antioxidant intake and risk of osteoporotic hip fracture in Utah: an effect modified by smoking status. *Am.J.Epidemiol.*, 163, 9-17.