
**NIVELES DE Se, Zn, Cu, Mg Y Ca
EN SUERO DE PACIENTES CON
CIRROSIS HEPÁTICA:
CORRELACIÓN CON EL
GRADO DE SEVERIDAD Y
COMPLICACIONES**

D. MANUEL MARTÍNEZ PEINADO

TESIS DOCTORAL

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Manuel Martínez Peinado
D.L.: GR 2889-2012
ISBN: 978-84-9028-224-3



NIVELES DE Se, Zn, Cu, Mg Y Ca EN SUERO DE PACIENTES CON CIRROSIS HEPÁTICA: CORRELACIÓN CON EL GRADO DE SEVERIDAD Y COMPLICACIONES

**Autor: Manuel Martínez Peinado
Directores: Miguel Navarro Alarcón
Flor Nogueras López**

**Departamento de Nutrición y Bromatología
Universidad de Granada
Granada 2012**

**Servicio de Aparato Digestivo de Hospital Universitario Virgen de las
Nieves, Granada**

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Nutrición y Bromatología

**NIVELES DE Se, Zn, Cu, Mg Y Ca EN
SUERO DE PACIENTES CON CIRROSIS
HEPÁTICA: CORRELACIÓN CON EL
GRADO DE SEVERIDAD Y
COMPLICACIONES**

MEMORIA que presenta para aspirar al
grado de Doctor en Farmacia, el Licenciado
Manuel Martínez Peinado

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Nutrición y Bromatología

Directora: María Dolores Ruiz López

Certifico, que el presente trabajo ha sido realizado por el Licenciado D. Manuel Martínez Peinado, en el laboratorio del Departamento de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Farmacia de Granada.

Granada, marzo de 2012

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Nutrición y Bromatología

DIRECTORES DE LA TESIS DOCTORAL

Prof. Dr. Miguel Navarro Alarcón

Dra. Flor Nogueras López

Licenciado: Manuel Martínez Peinado

Agradecimientos

Finalizado este trabajo, quiero agradecer en primer lugar a mi Director de Tesis Miguel Navarro Alarcón, todas las horas de su tiempo que me ha dedicado para poder llevar a buen puerto el proyecto, así como la oportunidad, en si misma de realizarlo, su consejo y su amistad. Al mismo tiempo quiero agradecer a la Doctora Flor Nogueras López su asesoramiento clínico en lo referente a la cirrosis hepática, y su trabajo en el diseño y muestreo realizado para el desarrollo del estudio.

Es indispensable agradecerse también al Departamento de Nutrición y Bromatología, a su Directora (María Dolores Ruiz López) y a sus profesores, por su simpatía y cariño. Y especialmente a las Dras. Marina Villalón Mir y Reyes Artacho Martín-Lagos que han tenido que ver perturbada en varias ocasiones la paz de su despacho por mis constantes irrupciones. Añádanse aquí no solo mi agradecimiento sino también mis disculpas.

Al Instituto Europeo de la Alimentación Mediterránea y su equipo, por darme su apoyo durante estos años.

Por supuesto a mi querido tío Fernando, por ser el impulsor no solo de esta tesis, sino del resto de mi carrera, primero como estudiante y después como profesional. Sin él, probablemente ni habría estudiado la carrera de Farmacia, ni habría hecho la mitad de las cosas que he hecho. Siempre te consideraré mi mentor.

A mis Padres, por su dedicación y apoyo constantes, por estar siempre ahí cuando más lo necesito y por preocuparse más que yo por todo lo que me interesa. Siempre seréis mi modelo a seguir.

A Clara, por todo lo demás, que no es poco. Contigo soy mejor.

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	13
I.1. DEFINICIÓN Y EVOLUCIÓN CONCEPTUAL DE LA CIRROSIS HEPÁTICA.....	14
I.2. ETIOPATOGENIA.....	15
I.2.1. FACTORES GENÉTICOS Y FAMILIARES	17
I.2.2. FACTORES AMBIENTALES	17
I.2.3. AGENTES INFECCIOSOS.....	19
I.2.4. FACTORES INMUNOLÓGICOS	20
I.3. DIAGNÓSTICO	21
I.3.1. SÍNTOMAS, SIGNOS Y COMPLICACIONES	21
I.3.2. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO.....	22
I.4. TRATAMIENTO.....	24
I.5. ASPECTOS NUTRICIONALES RELACIONADOS CON LA CH.....	29
I.5.1. PREVALENCIA DE MALNUTRICIÓN	29
I.5.2. MÉTODOS DE EVALUACIÓN DEL ESTADO NUTRICIONAL	31
I.5.3. FACTORES FISIOPATOLÓGICOS.....	33
I.5.4. OLIGOELEMENTOS	34
I.5.4.1. SELENIO (Se)	34
I.5.4.1.1. Introducción	34
I.5.4.1.2. Selenoproteínas.....	34
I.5.4.1.3. El Se y la salud.....	38
I.5.4.1.4. Absorción y biodisponibilidad.....	38
I.5.4.1.5. El Se y la nutrición.....	39
I.5.4.1.6. Deficiencia de Se.....	40
I.5.4.2. ZINC	41
I.5.4.2.1. Introducción	41
I.5.4.2.2. El Zn y la salud	41

I.5.4.2.3. Absorción y biodisponibilidad.....	42
I.5.4.2.4. Deficiencia de Zn	43
I.5.4.3. COBRE	44
I.5.4.3.1. Introducción	44
I.5.4.3.2. El Cu y la salud.....	45
I.5.4.3.3. Absorción y biodisponibilidad.....	46
I.5.4.3.4. Déficit de Cu	47
I.5.4.4. MAGNESIO	48
I.5.4.4.1. Introducción	48
I.5.4.4.2. El Mg y la salud	48
I.5.4.4.3. Absorción y biodisponibilidad.....	49
I.5.4.4.4. Déficit de Mg.....	50
I.5.4.5. CALCIO	51
I.5.4.5.1. Introducción	51
I.5.4.5.2. El Ca y la salud.....	52
I.5.4.5.3. Absorción y biodisponibilidad.....	54
I.5.4.5.4. Déficit de Ca	55
II. OBJETIVOS	57
III. PARTE EXPERIMENTAL.....	61
III.1. MATERIAL	62
III.1.1. APARATOS.....	62
III.1.2. MATERIAL.....	63
III.1.3. REACTIVOS Y DISOLUCIONES.....	63
III.1.3.1. REACTIVOS	63
III.1.3.2. DISOLUCIONES.....	64
III.1.4. MUESTREO	65
III.1.4.1. IDENTIFICACIÓN Y CODIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS	66
III.1.4.2. EXTRACCIÓN, CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE .	67
III.1.5. MATERIAL INFORMÁTICO.....	67
III.2. MÉTODOS	68

III.2.1. CALIBRACIÓN	68
III.2.1.1. PREPARACIÓN DE LAS RECTAS DE CALIBRADO..	69
III.2.1.2. APLICACIÓN DEL MÉTODO DE ADICIÓN DE PATRÓN	69
III.2.2. FASE PREINSTRUMENTAL.....	70
III.2.2.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE SUERO PARA EL ANÁLISIS DE SELENIO, ZINC, COBRE, MAGNESIO Y CALCIO	70
III.2.2.2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE SUERO PARA EL ANÁLISIS DE SELENIO	72
III.2.3. FASE EXPERIMENTAL	75
III.2.3.1. MEDIDA DEL SELENIO, ZINC, COBRE, MAGNESIO Y CALCIO POR EAA A LA LLAMA	75
III.2.3.2. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE SELENIO, ZINC, COBRE, MAGNESIO Y CALCIO.....	76
 III.3. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS.....	 85
 III.4 ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS SEGÚN LOS DIFERENTES FACTORES DE COMPARACIÓN CONSIDERADOS	 86
III.4.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA VARIANZA	89
III.4.1.1. CONTRASTE DE LAS CONCENTRACIONES DE SELENIO, ZINC, COBRE, MAGNESIO Y CALCIO DE LOS CONTROLES SANOS FRENTE A LOS PACIENTES CON CH.....	 89
III.4.1.2. ANOVA DE LOS NIVELES DE SELENIO, ZINC, COBRE, MAGNESIO Y CALCIO EN ENFERMOS DE CH SEGÚN HAYAN SIDO SOMETIDOS A TRASPLANTE O NO .	 91
III.4.1.3. ANOVA DE LOS NIVELES DE SELENIO, ZINC, COBRE, MAGNESIO Y CALCIO SEGÚN INFLUENCIA DE LA EDAD EN PACIENTES.....	 93

III.4.1.3.1. Influencia del grupo de edad en los niveles séricos de minerales.....	93
III.4.1.3.2. Análisis de regresión entre la edad de los enfermos y los niveles séricos de minerales	96
III.4.1.4. COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE SELENIO, ZINC, COBRE, MAGNESIO Y CALCIO SEGÚN EL SEXO EN PACIENTES.....	98
III.4.1.5. COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE SELENIO, ZINC, COBRE, MAGNESIO Y CALCIO SEGÚN SEGÚN INFLUENCIA DEL EXITUS (MUERTE) DE PACIENTES.....	99
III.4.1.6. COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE SELENIO, ZINC, COBRE, MAGNESIO Y CALCIO SEGÚN INFLUENCIA DE LAS COMPLICACIONES EN PACIENTES.....	101
III.4.1.7. COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE MINERALES SEGÚN SEVERIDAD DE LA PATOLOGÍA EN PACIENTES CON CIRROSIS ESTIMADA POR EL ÍNDICE CHILD-PUGH.....	103
III.4.1.7.1 Comparación de los niveles de minerales según severidad de la patología en pacientes con cirrosis estimada por el índice Child-Pugh	103
III.4.1.7.2. Análisis de regresión entre la severidad de la cirrosis y los niveles séricos de minerales	106
III.4.2. ANÁLISIS DE REGRESIÓN ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE LOS DIFERENTES MINERALES ANALIZADOS (Mg, Ca, Cu, Zn y Se) EN LOS PACIENTES CIRRÓTICOS.....	110
IV. DISCUSIÓN.....	115
IV.1. SELENIO	116
IV.2. ZINC	121
IV.3. COBRE.....	125
IV.4. MAGNESIO	127

IV.5. CALCIO	130
V. CONCLUSIONES	133
VI. BIBLIOGRAFÍA	137
VI. DIFUSIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	161

I. INTRODUCCIÓN

I.1. DEFINICIÓN Y EVOLUCIÓN CONCEPTUAL DE LA CIRROSIS HEPÁTICA

El término *cirrosis* fue acuñado por el francés René Laennec (inventor del estetoscopio) en el siglo XIX de una forma curiosa, ya que si bien no hizo ningún aporte importante acerca de esta patología, fue él, quien en una autopsia realizada a un caso de enfisema pulmonar, propuso el nombre de cirrosis (Kirrós-amarillo) en una nota a pie de página, para describir el hígado granular, indurado y amarillento que halló en el misma.

La cirrosis hepática (CH) se presenta como una alteración irreversible del hígado caracterizada por una fibrosis difusa del órgano con formación de nódulos por necrosis celular, regeneración de células con alteración de la arquitectura y fibrosis. Esta definición, es sin embargo cuestionable en lo referente a que considera la fibrosis hepática como un proceso pasivo e irreversible, sin embargo numerosas observaciones clínicas y experimentales indican que este concepto no es correcto (Bataller, 2006).

Como sintomatología característica cabe destacar su presentación con síntomas de hepatopatía como ictericia, hematemesis, hemorragias dispersas, edema, ascitis, astenia o impotencia sexual. También puede presentarse de forma asintomática pero con signos de hepatopatía como telangiectasias, eritema palmar, hipertrofia parótidea, ginecomastia o hepatoesplenomegalia.

Adicionalmente puede detectarse alteración hemática como anemia, leucopenia, trombocitopenia, aumento del T. de Protombina, descenso del fibrinógeno, aumento de transaminasas, hiponatremia, hipokalemia, hipoalbuminamia o hipergammaglobulinemia.

A pesar de todo lo indicado con anterioridad quizá la forma más sencilla de definir la cirrosis sea como el estadio último de la fibrósisis hepática (Stamoulis y col., 2007).

La CH es una enfermedad de distribución mundial existiendo zonas del planeta donde hay estrecha relación con la hepatitis viral, de modo que la prevalencia de cirrosis latente entre éstos se acerca al 50 - 60 % (Durang.org).

De acuerdo con los datos de la Organización Mundial de la salud (OMS) la enfermedad hepática crónica causa más de 1,4 millones de muertes cada año. Las tasas de mortalidad de la cirrosis hepática varían en Europa según los países, siguiendo una gradiente norte-sur, con las tasas más bajas en el norte (12,2% en el caso de hombres y de 4,8% en mujeres) y las más altas en el sur de Europa (33,7% para los hombres y 12,1% para las mujeres) (Rahelic y col., 2008).

En la Tabla 1 se recoge la clasificación de la función hepatocelular según el criterio establecido por Child-Pugh (Pugh, 1973).

TABLA 1. Clasificación de la función hepatocelular de Child – Pugh

PARÁMETRO	1 PUNTO	2 PUNTOS	3 PUNTOS
Bilirrubina	Menos de 2 mg/dL	2-3 mg/dL	Más de 3 mg/dL
Albúmina	> de 3.5 mg/dL	2.8-3.5 mg/dL	< de 2.8 mg/dL
Ascitis	No	Tratable	Rebelde
Encefalopatía	No	I –II	III –IV
T. Protombina	> de 50%	30-50%	< de 30%

I.2. ETIOPATOGENIA

Aunque la etiología de la enfermedad es variable las más frecuentes son la alcohólica (50 - 60 %) y las virales (20 - 30 %). La CH suele diagnosticarse entre los 40 y 60 años de edad, con mayor frecuencia entre los hombres. Muchas veces se diagnostica de forma casual (cirrosis compensada), pero

otras veces se manifiesta por alteraciones expresivas que traducen el fallo de una o más funciones del hígado (cirrosis descompensada) (Ginés y Arroyo, 1995). Otros autores definen la cirrosis compensada como aquella que no presenta ascitis o encefalopatía y la descompensada como aquella que si presenta estas patologías (Mesejo y col., 2008).

En los pacientes cirróticos existen diversos déficit nutricionales en referencia a las vitaminas y minerales, así como trastornos en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas ocasionados por la enfermedad, pero en la cirrosis de tipo alcohólica estos fenómenos son más evidentes y precoces, ya que los déficit nutricionales se manifiestan aún antes de haberse instaurado la enfermedad.

Uno de los avances más importantes en el conocimiento de la patogenia de la fibrosis hepática fue el descubrimiento de las células estrelladas hepáticas (HSC, hepatic stellate cells) como el principal tipo celular responsable del exceso de síntesis de colágeno en el hígado fibrótico (Bataller, 2006).

Las sustancias que regulan la transformación fenotípica y la proliferación de las HSC en los focos de reparación tisular derivan en su mayoría de los hepatocitos dañados, de las células de Kupffer activadas y del propio infiltrado inflamatorio. Así, diversos factores de crecimiento como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) o el factor de crecimiento transformador tipo β (TGF- β) y sustancias vasoactivas (trombina, angiotensina II y endotelina-1) contribuyen a la acumulación de HSC activadas y ejercen por tanto una acción profibrogénica en las hepatopatías crónicas. Por el contrario, diversas citocinas como el interferón- α y el factor de crecimiento hepatocitario (HGF) son potentes inhibidores de la activación de las HSC (Bataller, 2006).

I.2.1. FACTORES GENÉTICOS Y FAMILIARES

El curso de la infección crónica por (VHC) muestra variaciones importantes entre los individuos afectados. Mientras algunas personas eliminan el virus, otras progresan hacia la cronicidad desarrollando fibrosis y cirrosis hepática. La variabilidad genética del individuo involucra factores que estimulan la fibrogénesis. Entre los polimorfismos genéticos asociados al desarrollo y severidad de la infección del VHC se encuentran: la apolipoproteína E (apo E), genes involucrados en la respuesta inmune como el HLA-II, quimiocinas, así como ligandos; y el gen TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa), TGF- β (factor de transformación de crecimiento beta), entre otros (Vázquez y col., 2005).

La cirrosis suele ser el destino final de varias enfermedades con base genética, como es el caso de la enfermedad de Wilson (Educación Médica Continua, 2003), o la hemocromatosis.

La frecuente presencia de haplotipos HLA A1, B8, DR3, DR4 sugiere un componente genético importante en la hepatitis autoinmune. El haplotipo DR3 se encuentra en el 52% de los pacientes con hepatitis autoinmune tipo 1 y es más frecuente en pacientes jóvenes que responden menos al tratamiento y que evolucionan más rápido a la cirrosis (Vítorldrovo, 2000).

El haplotipo DR4 se asocia con hepatitis autoinmune tipo 1 en un 42% de los casos, y se caracteriza por un nivel más alto de inmunoglobulinas, relacionándose con otras enfermedades autoinmunes concomitantes y presentando una respuesta más favorable al tratamiento médico (Vítorldrovo, 2000).

I.2.2. FACTORES AMBIENTALES

Como es lógico, en la cirrosis hepática, existen además de factores genéticos, factores ambientales que sin bien no son causa directa, si facilitan la aparición de fibrosis en el tejido hepático. El estrés oxidativo parece estar

directamente implicado en la fibrogénesis, como muestra el efecto protector de la vitamina E en modelos nutricionales de esteatosis hepática (Farrel y col., 2006).

Se han publicado diversos estudios sobre el papel etiológico del alcohol y algunos tóxicos como fósforo, derivados petroquímicos, setas, así como la toxina procedente de *Bacillus cereus* en la etiología de la CH. Está suficientemente estudiado, que el consumo de alcohol incrementa la producción de radicales libres hepáticos y el estrés oxidativo, implicados en el proceso patológico, como muestran los resultados del estudio desarrollado por Pemberton y col. (2005) al evaluar marcadores de la peroxidación lipídica, estatus antioxidante, fibrogénesis hepática, inflamación y función hepática en 24 pacientes con cirrosis y 49 controles sanos.

En este sentido se ha propuesto que la esteatosis hepática no alcohólica es la manifestación hepática del Síndrome Metabólico (SM), que comprende resistencia insulínica e hiperinsulinemia, obesidad central, hipertensión arterial y dislipemia (triglicéridos [TG] >180 mg/dL o colesterol HDL < 40 mg/dL) (Alarcón, 2004).

También se ha observado que la edad superior a 45 años es un factor claramente relacionado con cirrosis, lo que parece reflejar que cuanto más tiempo dure la esteatosis hepática más probable es la aparición de fibrosis. Este concepto tiene un marcado interés por la creciente incidencia de la obesidad infantil, lo que podría indicar que la aparición de esteatosis hepática en fases tempranas de la vida podría favorecer la evolución a cirrosis en edades más jóvenes.

Otro factor implicado en la incidencia de cirrosis es la raza. Determinadas razas como hispano- latinos y con ascendencia asiática tienen mas probabilidades de progresión que los caucasianos, africanos y americanos (Alarcón, 2004).

En la actualidad está ampliamente probado que la obesidad es un importante factor de riesgo en la generación de patologías como la diabetes,

hipertensión, así como diferentes afecciones cardiovasculares, etc. Dichas patologías pueden estar a su vez vinculadas con los daños hepáticos que finalmente pueden desembocar en la cirrosis, caso por ejemplo de la diabetes mellitus, siendo por tanto el sobrepeso un factor de riesgo para el desarrollo de hepatopatías tanto directa como indirectamente.

Se han realizado estudios para demostrar la prevalencia de la cirrosis en obesos, de los cuales un estudio retrospectivo mostró una prevalencia del 30% de fibrosis y del 10% de cirrosis en biopsias hepáticas de pacientes con sobrepeso y obesos con alteraciones en las pruebas de funcionamiento hepático sin evidencia de enfermedad hepática adquirida, autoinmune o genética (Ratziu y col., 2000; Lizardi-Cervera y col., 2004).

Así mismo, la obesidad es uno de los principales factores de riesgo asociados a la esteato-hepatitis no alcohólica, debido principalmente a la resistencia periférica a la acción de la insulina, incremento del flujo portal de triglicéridos y la producción de citoquinas inflamatorias que afectan de forma deletérea a los hepatocitos (Méndez-Sánchez y col., 2004).

I.2.3. AGENTES INFECCIOSOS.

En lo relativo a los agentes infecciosos relacionados con esta patología, se observa que la cirrosis está estrechamente ligada a la infección de los virus de la hepatitis C, B y D. En este sentido, se ha comprobado que el virus de la hepatitis C es junto con el alcohol una de las mayores causas de patología crónica del hígado y cirrosis en los EEUU. La infección con este virus causa inflamación y daño hepático de carácter leve que tras décadas, puede desembocar en cirrosis.

Por otro lado también se sabe que el virus de la hepatitis B (VHB) es probablemente la causa más común de cirrosis en el mundo. La hepatitis B al igual que la C causa inflamación hepática y daños que tras varios años pueden llegar a producir cirrosis. Por su parte el de la hepatitis D es otro virus que

infecta el hígado, aunque solo en personas que ya lo estén de hepatitis B (NIH, 2003).

Por otro lado, Rios Blanc y col. (2003) han descrito que en los pacientes con infección crónica por VHC, la probabilidad de desarrollar cirrosis a los 20 años de la infección es del 5-25%. Una vez que la patología se ha establecido, las cifras de progresión anual a insuficiencia hepática son del 2 al 4%, y de evolución anual a carcinoma hepatocelular se sitúan entre el 1 y el 7%.

En los pacientes coinfectados por VHC y VIH se ha descrito una mayor morbi-mortalidad de causa hepática, mayor viremia por un VHC y una progresión más rápida a cirrosis, insuficiencia hepática y carcinoma hepatocelular.

I.2.4. FACTORES INMUNOLÓGICOS

Se ha observado que esta enfermedad en ciertas circunstancias, parece estar causada por la capacidad del sistema inmune de atacar el hígado causando inflamación, daño y eventualmente “scarring” y cirrosis (NIH, 2003). La hepatitis autoinmune es una inflamación hepatocelular que se presenta cuando el sistema inmunológico actúa frente a los hepatocitos y que se caracteriza por hallazgos histológicos (hepatitis de interfase con afectación periportal, infiltración de células plasmáticas y necrosis en sacabocados), bioquímicos (hipertransaminasemia e hipergammaglobulinemia) y autoinmunes (presencia de ciertos autoanticuerpos). Este trastorno es relativamente poco frecuente y suele afectar a mujeres de mediana edad (Orts y col., 2004). Aproximadamente un 20% de los pacientes con hepatitis autoinmune presentan inicialmente signos de descompensación cirrótica (Orts y col., 2004).

I.3. DIAGNÓSTICO

I.3.1. SÍNTOMAS, SIGNOS Y COMPLICACIONES

El principio de la cirrosis es por lo general silencioso siendo muy pocos los síntomas específicos. A medida que se acumula el daño en el hígado, pueden aparecer los siguientes síntomas (www.liverfoundation.org):

- Pérdida de apetito.
- Malestar general.
- Náusea y vómitos.
- Pérdida de peso.
- Agrandamiento del hígado.
- Vasos sanguíneos en forma de araña (angioma de araña)

A medida que avanza la enfermedad pueden surgir complicaciones debidas a la disminución progresiva de la función hepática: (Ronnenberg y Horn, 2007). Síntomas posteriores, algunos de los cuales se deben a complicaciones, incluyen:

- Palmas de las manos enrojecidas o con manchas
- Pérdida de vello corporal
- Alteraciones del sueño
- Resistencia a la insulina
- Úlceras
- Fiebre y otras señales de infección - debido a una función inmune alterada
- Heces fecales pálidas o del color de la arcilla - causadas por una reducción en pigmentos biliares excretados

- Sangrados nasales frecuentes, moretones en la piel, o encías sangrantes - como resultado de síntesis hepática reducida de factores de coagulación
- Ascitis - retención de agua e inflamación del abdomen causados por el flujo sanguíneo obstruido a través del hígado y por la síntesis reducida de la proteína albumina
- Peritonitis bacteriana - infección de ascitis que causa dolor abdominal y fiebre
- Comezón - causada por la deposición de productos biliares en la piel
- Ictericia - coloración amarillenta de la piel o de los ojos debido a la acumulación de pigmentos biliares (bilirrubina)
- Vomitar sangre - debido a las venas inflamadas en el esófago que se revientan
- Encefalopatía y coma - cambios mentales, incluyendo olvidar las cosas, dificultad para concentrarse, confusión, y agitación, causados por la acumulación de amoníaco en la sangre
- Producción reducida de orina y orina oscura - causadas por disfunción o insuficiencia renal
- Cáncer hepático

El diagnóstico de la cirrosis puede ser inesperado. Una persona puede presentarse al médico con síntomas que no aparezcan de enfermedad hepática y tras la realización del pertinente examen físico y análisis de sangre descubrir que tiene cirrosis. (www.liverfoundation.org)

I.3.2. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

La cirrosis hepática se diagnostica en base a los síntomas, tests de laboratorio, historia médica y examen físico. Es de destacar el hecho de que el hígado aparece más duro y grande de lo usual. Si es necesario un examen visual del hígado para buscar signos de patología, se utiliza una tomografía axial automatizada (CAT), una imagen por resonancia magnética (MRI), o un

escaneado del hígado a través de radioisótopo. También puede observarse el hígado a través de un laparoscópio, instrumento que se inserta a través del abdomen para obtener fotografías a través de ordenador (NIH, 2003).

Hasta hace poco, la biopsia hepática se empleaba para la confirmación del diagnóstico del cuadro de CH, determinando el estadio de la patología, sirviendo como herramienta pronóstica que proporcionaba la medición histológica de la inflamación y de la fibrosis. La técnica habitual era la vía percutánea (Brahm, 2006).

Así mismo, la obtención de tejido por punción del parénquima y aspiración simultánea puede ser difícil y exigir más de un intento, en especial en hígados con fibrosis extensa. La técnica transyugular permite, además, la determinación del GPVH (diferencia entre la presión suprahepática enclavada y libre, como índice de la presión portal).

De los resultados de un estudio realizado por Trejo y col. (1995), se deducía la existencia de una relación entre las dimensiones del espécimen de biopsia, el gradiente de presión portal y el diagnóstico histológico. La diferencia en el tamaño del fragmento mayor entre pacientes con cirrosis hepática y aquellos con enfermedades cuyo componente fibrótico es leve o nulo sugiere que la presencia de fibrosis favorece la fragmentación de la muestra y, por tanto, se asocia con especímenes de tamaño significativamente menor. En este sentido, la correlación inversa entre el tamaño del fragmento mayor y el gradiente de presión portal sugiere, así mismo, una relación de este último con el grado de fibrosis.

En pacientes con sospecha clínica de enfermedad hepática crónica la determinación del GPVH aportó importante información adicional: un GPVH ³ 10 mmHg se asoció con una alta frecuencia a la presencia de CH. Esta rentabilidad de la medición del GPVH es aún mayor en aquellos pacientes con sospecha de enfermedad hepática crónica en los que la biopsia no fue útil. Así, el hallazgo de un GPVH ³ 10 mmHg, aun con biopsia no diagnóstica, apoya fuertemente el diagnóstico de cirrosis hepática (Trejo y col., 1995).

No obstante, hoy día, existen métodos de análisis no invasivos para estimar el grado de fibrosis. Estos métodos comprenden: pruebas de imagen (p. ej.: FIBROTAC), marcadores bioquímicos simples (p. ej.: índice de Forns), marcadores de fibrogénesis (TGF β 1, TIMP1 [inhibidor tisular de metaloproteasas 1], PIIP [péptido aminoterminal del procolágeno III] y ácido hialurónico) y más recientemente la elastografía. Estos métodos, permiten estimar con una aceptable precisión el grado de fibrosis, aunque su utilidad para evaluar cambios moderados tras un tratamiento no está bien demostrada. En la actualidad, la biopsia hepática, sigue indicada cuando, además de querer determinar el grado de fibrosis, se tengan dudas diagnósticas y se precise de una información exacta del tipo de infiltrado inflamatorio (p. ej.: en pacientes transplantados) (Domínguez y col., 2009).

La Técnica de Ultrasonografía que venía utilizándose desde hace años como método de diagnóstico para detectar lesiones focales hepáticas difusas en pacientes con enfermedad del hígado, ha resultado ser un método muy interesante para el diagnóstico de CH, por ser un procedimiento no invasivo y relativamente barato (Ore, 2004).

El estudio comparativo entre ultrasonografía y diagnóstico histopatológico de la cirrosis, llevado a cabo en 236 historias clínicas por Ore y colaboradores entre 2000 y 2004 revela que en los casos de cirrosis por hepatitis B y C, pueden ser diagnosticadas por ultrasonografía con un 85,59% de exactitud empleando un solo signo ultrasonográfico.

I.4. TRATAMIENTO

El tratamiento de la cirrosis hepática es fundamentalmente un tratamiento sintomático y de sus complicaciones, tales como la ecefalopatía hepática, síndrome hepatorenal y el sangrado de las varices esofágicas.

Es especialmente importante, la prevención de la cirrosis, como evolución derivada de la enfermedad alcohólica del hígado. Numerosos estudios han tratado de abordar esta cuestión, retardando la progresión de la hepatopatía y previniendo sus complicaciones (Rahelic y col., 2008).

El único tratamiento efectivo para atenuar o revertir la fibrosis hepática es la eliminación del agente causal. En los casos en los que esto no es posible, se recomienda identificar y tratar factores profibrogénicos (como la resistencia a la insulina, la obesidad, el alcohol, etc.). En modelos experimentales de daño hepático crónico, se han descrito diversos agentes capaces de reducir la fibrosis hepática, pero apenas existen estudios clínicos controlados que evalúan su seguridad y eficacia, por lo que no existe suficiente evidencia científica para indicarlos como tratamiento antifibrogénico. La eficacia de los inhibidores del sistema renina-angiotensina se está evaluando en la actualidad. (Domínguez y col., 2009). En la Tabla 2, se recogen aquellos fármacos que actualmente tienen una utilidad potencial en el tratamiento de la fibrosis hepática

En cualquier caso y cuando está indicado, el transplante hepático es el mejor tratamiento para resolver la cirrosis hepática.

TABLA 2. Fármacos con una potencial utilidad en el tratamiento de la fibrosis hepática (Domínguez y col., 2009).

AGENTE FARMACOLÓGICO	EFFECTOS ANTIFIBRÓTICOS EN LAS CÉLULAS ESTRELLADAS HEPÁTICAS	EFFECTOS ANTIFIBRÓTICOS EN LA FIBROSIS EXPERIMENTAL	ESTUDIOS EN HUMANOS
Inhibidores de la angiotensina	Resultados consistentes positivos	Resultados consistentes positivos	Estudio retrospectivo
Colchicina	No probada	Resultados limitados	Resultados discrepantes
Corticosteroides	Resultados limitados	Resultados limitados	Efectivo en hepatitis autoinmune
Inhibidores de la endotelina	No probados	Resultados limitados	No probado
Interferon- α	Resultados consistentes positivos	Resultados consistentes positivos	Estudiado en hepatitis crónica C
Interleucina-10	Resultados limitados	Resultados consistentes positivos	Estudio único en la hepatitis crónica C
Pentoxifilina	Resultados consistentes positivos	Resultados consistentes positivos	No probado
Fosfatidilcolina	Resultados limitados	Resultados consistentes positivos	No eficaz en fibrosis inducida por alcohol
Antagonistas de PPAR	Resultados consistentes	Resultados consistentes positivos	Estudios aislados en EHNA
S-adenosil-metionina	No probados	No probados	Estudiado de la fibrosis inducida por alcohol
Sho-saiko-to (hierba asiática)	Resultados consistentes positivos	Resultados consistentes positivos	Estudios aislados en la hepatitis crónica C
Inhibidores de TGF β	Resultados consistentes positivos	Resultados consistentes positivos	No probado
Tocoferol	Resultados consistentes positivos	Resultados limitados	Estudios aislados en EHNA
Ghrelin	Resultados consistentes positivos	Resultados consistentes positivos	Datos epidemiológicos
Antagonistas CB1	Resultados consistentes positivos	Resultados consistentes positivos	Datos epidemiológicos

CB1; receptor cannabinoide tipo 1; EHNA: esteatohepatitis no alcohólica; PPAR: receptor activado del proliferador del peroxisoma; TGF β : factor de transformación del crecimiento beta.

La ascitis, es una de las complicaciones más frecuentes en la cirrosis hepática y se asocia a un peor pronóstico. Inicialmente, el tratamiento de la ascitis se basaba en la combinación de una dieta baja en sodio y el empleo de diuréticos. Sin embargo, este tratamiento tenía algunos

inconvenientes relevantes como que la pérdida de peso, excesivamente rápida se asociara con hipovolemia e insuficiencia renal, y que la administración de diuréticos se asociaba a su vez con un índice de complicaciones muy elevado. La paracéntesis terapéutica en los casos con ascitis a tensión y la infusión de albúmina cuando se moviliza un alto volumen de ascitis, es un tratamiento más adecuado como elección inicial debido a su facilidad de empleo, mayor eficacia clínica y menor índice de complicaciones (Rodés y col., 2003).

En los últimos años, también está resultando muy relevante el tratamiento a nivel nutricional de los pacientes cirróticos, ya que éstos, se encuentran en un estado de malnutrición calórico-proteica, hipercatabólico, con una disminuida utilización y capacidad de almacenamiento de carbohidratos y un aumento del catabolismo proteico y graso, que conduce a la depleción de las reservas proteicas y lipídicas (Venegas-Tresierra y col., 2002; Mesejo y col., 2008). Este tratamiento nutricional, debe realizarse atendiendo en primer lugar a que la cirrosis sea compensada o descompensada.

a) Tratamiento nutricional en cirrosis compensada

El cirrótico compensado puede tener un aceptable estado nutricional, por lo que con frecuencia puede recibir una dieta prácticamente normal, aunque se requiere cierta prudencia en la administración de ciertos elementos como el sodio (máximo 2,5 g/día), ya que este puede aumentar el riesgo de formación de ascitis o edemas. La suplementación oral con dietas líquidas es a menudo difícil debido a la anorexia y otros síntomas gastrointestinales, aunque ha demostrado ser beneficiosa en pacientes seleccionados (Mesejo y col., 2008).

b) Tratamiento nutricional en cirrosis descompensada

El tratamiento nutricional para los casos de cirrosis descompensada (aquella que presenta encefalopatía o ascitis) dependerá de cual sea la patología específica y cómo esté afectando al equilibrio nutricional del paciente.

En la encefalopatía aguda, debe corregirse de manera directa el posible factor precipitante. Durante los episodios agudos puede necesitarse una restricción proteica temporal que normalmente no supere las 48 horas ya que debe minimizarse lo máximo posible. Una vez restaurado el estado mental del paciente e identificada la causa de la encefalopatía, debe restaurarse el tratamiento dietético con aporte suficiente de proteínas (Mesejo y col., 2008)

Los requerimientos proteicos en pacientes cirróticos según los parámetros internacionales son de 1,00-1,15 g/Kg/día para cirróticos sin encefalopatía y de 1,00-1,20 g/Kg/día para aquellos con encefalopatía (Harrison 1998; Plevak y col., 1999; Venegas-Tresierra y col., 2002). Esta cantidad de proteínas, es bien tolerada por muchos pacientes y solo aquellos con encefalopatía crónica intratable podrían necesitar una restricción proteica de hasta 0,8 g/Kg/día (Mesejo y col., 2008).

Teniendo en cuenta que la tolerancia proteica depende también de su origen (lacteo, vegetal o cárnico) se recomienda también abordar la dieta con suplementación con fibra o dietas con aporte proteico de origen vegetal, que aportan un alto contenido en fibra y un contenido menor en aminoácidos aromáticos, cuya concentración en los casos de cirrosis suele estar elevada.

Pueden recomendarse alimentos ricos en carbohidratos, siempre y cuando no coexista una intolerancia hidratosada o aumento de la resistencia periférica a la acción de la insulina.

En el caso de existir ascitis e hiponatremia, la restricción hídrica estaría indicada en casos con hiponatremia dilucional importante.

Por último, en lo relativo a las alteraciones vitamínicas, los niveles de vitamina E suelen encontrarse reducidos en un 47% de los cirróticos y el 59% tiene enfermedad metabólica ósea. Puede coexistir un déficit de vitamina A y los niveles plasmáticos de vitamina B₁₂ están habitualmente altos debido a un aumento en las transcobalaminasas I y III; sin embargo, los niveles tisulares de

vitamina B₁₂ están reducidos, con un descenso en la transcobalamina II (Mesejo y col., 2008).

Por otro lado, constituye un grupo especial el paciente cirrótico obeso, debido a su difícil manejo dietético por encontrarse un exceso de masa grasa ligado a una desnutrición proteica en un alto porcentaje de los casos (Venegas-Tresierra y col., 2002)

Todos estos aspectos deberán tenerse en cuenta a la hora de programar el tratamiento dietético más óptimo.

I.5. ASPECTOS NUTRICIONALES RELACIONADOS CON LA CH

I.5.1. PREVALENCIA DE MALNUTRICIÓN

La malnutrición es muy común en los casos de patología hepática crónica y la cirrosis está asociada a la malnutrición en mayor o menor grado e independientemente de la etiología de la enfermedad, especialmente en los casos más avanzados, pudiendo señalar tres factores principales que contribuyen a esta malnutrición (Mesejo y col., 208):

- La limitación o disminución en la ingesta de alimentos.
- La alteración en la digestión y absorción de los nutrientes.
- Las alteraciones en el metabolismo de los nutrientes.

El hígado juega un papel fundamental en el metabolismo de la mayoría de los nutrientes; la asicitis y los procesos inflamatorios que se producen

causan una reducción del apetito del paciente. En el caso de las hepatitis debidas al alcohol, este causa cambios en el metabolismo hepático de algunas vitaminas. Por otro lado, los requerimientos de proteínas se ven también aumentados en los casos de pacientes estables clínicamente con cirrosis y son frecuentes los casos de intolerancia a la glucosa y la diabetes mellitus, así como alteraciones el metabolismo de los aminoácidos y la absorción de las grasas (Kondrup 2006). Esta desnutrición puede contribuir a la pobre resistencia a infecciones, retención de líquidos y a la insuficiencia en la regeneración de lesiones (Merli y col., 2002).

Algunos autores sitúan la prevalencia de desnutrición en los cirróticos entre el 50 al 100 % en pacientes con hepatopatía alcohólica y el 40 % en los no alcohólicos (Botelho de Carvalho, 1992).

El análisis dietético de un estudio realizado a 43 pacientes cirróticos (Venegas-Tresierra y col. 2002), mostró dietas hipoproteicas en 42 pacientes (98%), hipocalóricas en 38 pacientes (88%), hipograsa en 36 (83,7%); solo un paciente tuvo una dieta normoproteica y normocalórica; 15 pacientes (35%) no mostraron ningún grado de desnutrición; 24 pacientes (56%) mostraron desnutrición proteica aislada; y 4 pacientes (9,3%) desnutrición calórico – proteica. La prevalencia de malnutrición calórico-proteica varía entre el 34-82% para los casos de cirrosis alcohólica y 27-82% para los casos de cirrosis no alcohólica (Plevak y col.,1999; Kondrup 2006; Castellanos Fernández y col., 2008).

Otros estudios realizados al respecto, revelan como un alto porcentaje de los pacientes cirróticos (alrededor de un 75%) se hallan en un estado de malnutrición protéica con los niveles de albúmina sérica por debajo de los 3,5 g/dL (Fukushima y col., 2007).

También se ha hallado relación entre los índices de severidad de la patología (Child Pugh B y C) y el diagnóstico de desnutrición, hallándose que conforme se incrementa la severidad, se incrementa proporcionalmente la desnutrición (Merli y col., 2002; Venegas-Tresierra y col., 2002; Kondrup, 2006; Castellanos-Fernández y col., 2008). También se ha apreciado como la

prevalencia y la severidad de la malnutrición parecen estar relacionadas con el estado clínico de la hepatopatía crónica (Merli y col., 2002).

De igual forma, la enfermedad hepática produce una significativa alteración en las concentraciones séricas de los minerales, cuestión que se estudia en profundidad en este trabajo.

Algunos autores han afirmado que el estado nutricional en los pacientes con hepatopatías, influye en el desarrollo de la enfermedad ósea, siendo la obesidad protectora y la delgadez un factor que puede predisponer a poseer una menor masa ósea, sobre todo a nivel del hueso cortical. Sin embargo, la prevalencia de osteopatías en la cirrosis hepática y otras hepatopatías es variable y existen diferencias de opinión en lo concerniente a que realmente el estado nutricional como factor aislado, tenga influencia sobre la pérdida de masa ósea (Escalante-Boleas y col., 2002).

Tanto la desnutrición como la aplicación de dietas inadecuadas, son un problema común en los casos de cirrosis hepática y es sin duda importante la intervención a este nivel, para disminuir la morbilidad asociada a esta patología. Un estudio realizado en 2002 sugiere que la terapia nutricional puede mejorar el desarrollo clínico en pacientes cirróticos sometidos a cirugía general y/o transplante hepático (Merli y col., 2002).

I.5.2. MÉTODOS DE EVALUACIÓN DEL ESTADO NUTRICIONAL

Como señalamos en el capítulo anterior, la evaluación del estado nutricional de los pacientes cirróticos es fundamental tanto para evaluar el estado de la patología y su pronóstico, como para diseñar la estrategia dietética más adecuada a seguir.

Cabe señalar que en la cirrosis hepática, las alteraciones en la síntesis de proteínas, la función inmune y la composición corporal, pueden conducir a error al hacer uso de métodos convencionales para evaluar el estado nutricional (Merli y col., 1998)

Los métodos comunes de evaluación nutricional en pacientes cirróticos comprenden el análisis de masa magra y grasa a través de parámetros antropométricos (pliegue subcutáneo tricípital, circunferencia muscular del brazo, área muscular del brazo e índice de creatinina urinaria en 24 horas/talla), medición de proteínas viscerales (albúmina, transferrina) y bioimpedancia bioeléctrica (Venegas y col., 2002). El estatus inmunológico, que podría representar un test funcional de malnutrición, en pacientes con hepatopatía crónica está afectado por hiperesplenismo, reactividad inmunológica anormal y el abuso del alcohol, así como por el índice de creatinina, por lo que puede ser poco fiable cuando la función renal está comprometida (Merli y col., 2002). Los parámetros a tener en cuenta para el análisis del estado nutricional vienen recogidos en la tabla 3.

TABLA 3. Parámetros para el análisis nutricional

PARÁMETRO	INDICADORES
Índice de masa corporal	Peso / Talla²
Evaluación de la masa grasa	Impedanciometría y pliegue tricípital
Evaluación de masa magra	Impedanciometría
Evaluación del músculo	Circunferencia muscular del brazo, índice de creatinina / Talla, área muscular del brazo
Evaluación del compartimento proteico visceral	Valores de albúmina, transferrina y linfocitos

En la evaluación del estado nutricional también es importante el cotejo de los resultados en las tablas de valores normalizados para el pliegue cutáneo del tríceps, para la circunferencia muscular del brazo, para el área muscular del brazo y para el índice de creatinina / talla (Harrison 1998; Morata y col., 1997; Venegas y col., 2002).

Y por último, determinando que existe desnutrición proteica si se halla masa magra disminuida a través de la impedancia o si los valores antropométricos se encuentran por debajo del percentil 25, correlacionándose con la medición del compartimiento proteico visceral; y desnutrición calórica si se detecta masa magra disminuida en la impedancia o si la medida del pliegue del tríceps esta por debajo del percentil 25 (Venegas y col., 2002).

El análisis bioeléctrico de impedancia se ha hallado impreciso generalmente en pacientes cirróticos con ascitis y aquellos con retención de fluidos (Merli y col., 2002). Algunos estudios recientes, sugieren que el uso de la bioimpedancia con fórmulas no validadas para pacientes cirróticos es menos eficaz que el uso directo de los datos del análisis de bioimpedancia (resistencia y ángulo de fase) como una medida funcional de la masa y de la función celular, así como sugieren la importancia de validar los métodos de evaluación nutricional para los casos específicos de cirrosis hepática tal y como indica la *“Guía para la evaluación nutricional”* publicada por la *Sociedad Europea de Nutrición Clínica y Metabolismo (ESPEN)* (Kondrup 2006).

I.5.3. Factores fisiopatológicos

La CH se caracteriza por un reducción significativa de la masa muscular y grasa con redistribución del agua corporal (Figueiredo y col., 2005).

Desde el punto de vista histopatológico, la CH se define por la tríada necrosis celular, fibrosis y nódulos de regeneración, siendo las manifestaciones clínicas independientes de su etiología (Mesejo y col., 2008).

I.5.4. OLIGOELEMENTOS

I.5.4.1. SELENIO (Se)

I.5.4.1.1. Introducción

El selenio es un oligoelemento que se encuentra en la tierra, agua y algunos alimentos. Es un elemento esencial en varias vías metabólicas del ser humano (Medlineplus, 2008).

El Se esta relacionado con la protección de los tejidos frente al estrés oxidativo por su actuación como cofactor enzimático de la enzima glutatión peroxidasa (GSH-Px), el mantenimiento de las defensas contra la infección, y la modulación del crecimiento y desarrollo.

El contenido de selenio en un ser humano adulto puede variar desde valores de 3 mg en sujetos neo zelandeses hasta 14 mg en algunos americanos reflejando la profunda influencia del medio ambiente en las cantidades de este mineral. Aproximadamente un 30% del selenio tisular se encuentra en el hígado, un 15 % en el riñón, un 30% en el músculo y un 10% en plasma sanguíneo.

I.5.4.1.2. Selenoproteínas

La mayor parte del selenio tisular se encuentra en proteínas como seleno-análogos de sulfuro amino ácidos formado selenoproteínas. Se sabe de la existencia de múltiples selenoproteínas de las que hasta el momento se encuentran bien caracterizadas 15 según viene recogido en las tablas 4 y 5.

TABLA 4. Selección de algunas selenoproteínas caracterizadas (FAO, 2002)

SELENOPROTEINA	RESIDUOS DE SELENOCISTEINA	DISTRIBUCIÓN TISULAR
GSH-Px citosólica	1	Todos incluyendo el tiroides
GSHPx de los hidroperóxidos de los fosfolípidos	1	Todos incluyendo el tiroides
GSHPx gastrointestinal	1	Tracto gastrointestinal
GSHPx extracelular	1	Plasma y tiroides
Tioredoxina reductasa	1 or 2	Todos incluyendo el tiroides
Iodotironine-deiodinasa (tipo 1)	1	Liver, kidneys, and thyroid
Iodotironine-deiodinasa (tipo 2)	1	Sistema nervioso central (SNC) y pituitaria
Iodotironine-deiodinasa (tipo 3)	1	Tejido adipose marrón, SNC y placenta
Selenoproteina P	10	Plasma
Selenoproteina W	1	Músculo
Selenoproteina capsular del esperma	3	Cola del esperma

TABLA 5. Selenoproteínas y sus funciones fisiológicas

SELENOPROTEÍNAS	FUNCIONES
Glutación Peroxidasas GSH-Px1,2,4	Enzimas antioxidantes: eliminan el peróxido de hidrógeno, modulan la síntesis de eicosanoides modificando la inflamación y disminuyen el daño oxidativo de lípidos, lipoproteínas y DNA
Seleproteína de la cápsula mitocondrial del esperma	Forma de la GSH-Px4: protege el desarrollo de las células espermáticas de daño oxidativo, así como su madurez y estabilidad
Iodotironina-desiodinasa (tres isoformas)	Producción y regulación del nivel de T3 a partir de T4
Tioredoxina-reductasa (tres isoformas)	Reducción de los nucleótidos en la síntesis del DNA, control del estado redox intracelular; reguladoras de la expresión genética por control redox de la unión de factores de transcripción al DNA
Selenofosfato-sintetasa SPS2	Necesaria para la síntesis del selenofosfato precursor de la selenocisteína y, por tanto, de la síntesis de las selenoproteínas
Selenoproteína P (SePP)	Proteína plasmática que parece tener un efecto protector de las células endoteliales frente al ataque de peroxinitritos
Selenoproteína W	Necesaria para la función muscular
Selenoproteína del epetelio prostático, 15Kda	Localizada en las células epiteliales de la próstata ventral. Parece tener una función redox similar a la GPx4. Quizá posee acción protectora de las células secretoras frente al carcinoma
Selenoproteína unida al DNA de las espermatides, 34KDa	Actividad similar a la glutatión-peroxidasa. Producida en el estómago y núcleo de los espermatozoides. Puede proteger el desarrollo del esperma.
Selenoprotína de 18kDa	Producida en riñón y otros órganos. Conservada incluso en los estados de deficiencia en selenio

(selenio_intro/selenio/bibliografía)

Estudios realizados en ratas, sugieren que la selenoproteína P se une a células endoteliales, y los niveles plasmáticos de la proteína se correlacionan con la prevención de la peroxidación lipídica y el daño a células hepáticas endoteliales y representa un índice muy accesible del estatus nutricional de Se (Burk y Hill, 2005).

Funcionalmente, parecen existir al menos dos familias distintas de enzimas que contienen selenio. La primera incluye a las glutatión peroxidasas y tioredoxin reductasas, que están implicadas en el control de las concentraciones tisulares de metabolitos altamente reactivos del oxígeno. (FAO, 2002).

Sin embargo, la glutatión peroxidasa (isoforma GSH-Px3) y la selenoproteína P son las únicas selenoproteínas que han sido indentificadas en plasma. La glutatión peroxidasa supone alrededor de un 12% del selenio plasmático y la selenoproteína P alrededor de un 44%. El 44% restante se considera una fracción no específica la mayor parte de la cual parece ser selenometionína, un aminoácido sintetizado por las plantas y que es incorporado aleatoriamente en las proteínas animales como constituyente de la reserva de metionína (Burk y col.,1998).

La deficiencia de este oligoelemento puede ocurrir en áreas donde el contenido de selenio en la tierra es bajo, y puede afectar a las funciones tiroidales y causar afecciones como la enfermedad de Keshan (cardiomiopatía). La deficiencia de selenio se ha encontrado también comúnmente en pacientes que están recibiendo alimentación parenteral total como su única fuente de nutrición. Los trastornos gastrointestinales pueden disminuir su absorción dando como resultado el agotamiento o deficiencia. Así mismo, el Se puede ser destruido cuando los alimentos son refinados o procesados (Medlineplus, 2008).

I.5.4.1.3. El Se y la salud

Su relación con la prevención del cáncer está muy bien documentada. Diversos estudios epidemiológicos han establecido que existe una relación clara y directa entre un bajo nivel de selenio en sangre y el cáncer (Gil del Castillo, 2005).

En 1996 se publicaría el que podría ser el estudio de prevención del cáncer de mayor éxito en Estados Unidos hasta la fecha, realizado por el Instituto Nacional del Cáncer entre 1.312 voluntarios. A estos individuos se les administraron 200 µg de Se diarios y el resultado fue la disminución de un 49% en el índice de mortalidad de los tres cánceres más frecuentes (pulmón, próstata y colorrectal), resultado que puso de manifiesto que los sujetos estudiados requieren más Se que el administrado por la dieta.

I.5.4.1.4. Absorción y biodisponibilidad

La mayoría del Se ingerido, ya sea en forma orgánica o inorgánica, se convierte en el hígado en selenocisteína, la cual es usada en la biosíntesis de selenoproteínas. Existen evidencias de que la selenoproteína P (SePP) es el mayor transportador de Se desde la sangre a los tejidos, especialmente al cerebro y testículos. Sin embargo, aún no está del todo claro como se distribuye dentro de las células (Richelle y col., 2006).

El Se plasmático es transportado en un 60-70% en la SePP, un 30% en la GSH-Px y un 10% ligado a la albúmina y lipoproteínas de baja y muy baja densidad (LDL y VLDL, respectivamente). El Se es eliminado fundamentalmente por vía renal (dimetilselenol y trimetilselenol), aunque una pérdida significativa puede producirse por las heces, en tanto que menos del 5% se elimina por vía cutánea y pulmonar (trimetilselenol). Las concentraciones plasmáticas y séricas de Se son variables, existiendo diferentes valores medios según las diferentes regiones geográficas analizadas. Actualmente ha sido establecido que el nivel sérico de Se necesario para maximizar la actividad

plasmática de la GSH-Px es de 95 µg/L (rango 89 a 114 µg/L) (Manzanares Castro, 2007).

En general se puede afirmar que la absorción de los compuestos orgánicos de Se presentes en los alimentos aparentemente es buena (70 - 95%). Sin embargo, puede variar de acuerdo con la digestibilidad de las seleno-proteínas y otros compuestos contenidos en los alimentos (Suarez de Ronderos, 2004).

Algunos microorganismos poseen la capacidad de unir en superficie o acumular intracelularmente iones metálicos presentes en el medio ambiente. En suplementos alimentarios, se ha empleado esta propiedad con el fin de aportar minerales importantes para la salud. Ciertas especies del género bacteriano *Lactobacillus* y levaduras son capaces de concentrar el Se inorgánico del medio durante su crecimiento y producir Se orgánico, que posee mayor biodisponibilidad. Estos microorganismos ricos en Se se han comercializado como suplementos alimentarios ricos en este micronutriente (Collado y col., 2004).

I.5.4.1.5. El Se y la nutrición

En la mayoría de las dietas, las fuentes principales de Se son las carnes, los pescados y los cereales. Los productos lácteos y los huevos contribuyen con pequeñas cantidades de Se en la dieta. Los vegetales y las frutas contienen muy bajos niveles de Se (suponiendo menos del 8% del total de consumo). El análisis de dietas en la población de Estados Unidos, reveló que 5 alimentos (carne, pan blanco, cerdo, pollo y huevos) contribuían con el 50% del total de Se en la dieta típica y el 80% del total del Se dietario fue aportado por solamente 22 alimentos (Suarez de Ronderos, 2004).

En el área de la nutrición clínica, el Se está ubicado dentro del grupo de los micronutrientes, constituyendo un elemento traza o micronutriente esencial para todos los mamíferos (Manzanares Castro, 2007).

Se han descrito deficiencias de selenio hepático y sérico en pacientes con cirrosis no alcohólica y en alcohólicos con y sin enfermedad hepática secundaria. El Se es imprescindible para la actividad de la glutatión peroxidasa y, por lo tanto, su déficit conduce a un aumento de la peroxidación lipídica (Gómez y col., 2001).

I.5.4.1.6. Deficiencia de Se

Las manifestaciones clínicas de la deficiencia de Se en la dieta son poco comunes y se presentan normalmente en casos de nutrición parenteral inapropiada manifestándose con debilidad muscular e incluso fallo cardíaco en algunos casos. Un caso particular asociado a la deficiencia de selenio es la enfermedad de Keshan, cuya relación fue descrita por primera vez en China en 1935. Las manifestaciones clínicas son: fatiga tras realizar cualquier ejercicio simple, palpitaciones y arritmias cardíacas, pérdida de apetito, insuficiencia cardíaca y fallo cardíaco. Esta enfermedad tiene un origen multifactorial aunque las sospechas más importantes apuntan al desarrollo de una miocarditis viral atribuida probablemente al aumento de la virulencia del virus *Coxsackie* durante su paso a través de tejidos selenio-deficientes (FAO 2002).

En un estudio realizado sobre una población universitaria realizado por Oliveras López et al. (2006) se puso de manifiesto la existencia de un déficit en algunos micronutrientes como hierro, zinc calcio, yodo, cobre y selenio, tanto los hombres como las mujeres.

En la cirrosis hepática se han descrito deficiencias de Se hepático y sérico en pacientes con cirrosis no etílica y en alcohólicos con y sin enfermedad hepática secundaria. Es imprescindible para la actividad de la glutatión peroxidasa y, por tanto, su déficit conduce a un aumento de la peroxidación lipídica, por lo que se ha involucrado en la patogenia del daño hepático inducido por alcohol (Gómez, 2001). Otros estudios como el realizado por Burk y col. (1998) contradicen la afirmación anterior al indicar que la actividad de la GSH-Px se ve incrementada en los casos de CH, por lo que se necesitan investigaciones futuras con el objeto de clarificar esta controversia.

I.5.4.2. ZINC (Zn)

I.5.4.2.1. Introducción

El Zn es uno de los elementos más abundantes en el cuerpo humano, así como uno de los que interviene en más procesos. Dado que participa en muchas facetas diferentes de la biología humana, sus efectos son sutiles pero también muy significativos e importantes.

En España, según el panel de consumo de 2011 del Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Medio Marino, la mayor fuente dietética de Zn la constituyen los alimentos de origen animal (MARM, 2011). La ingesta recomendada para un adulto se estima entre 8 mg/día para las mujeres y 11 mg/día para los hombres (García-Gabarra, 2006; Rubio y col., 2007).

Al ser un ión intracelular, se encuentra en su mayoría en el citosol. Su cantidad en el individuo adulto oscila entre 1 y 2,5 g (Merck, 1980), constituyendo el segundo oligoelemento en relación a la cantidad total en el organismo, superado únicamente por el hierro (Kido y col., 1993). Suele encontrarse principalmente en hígado, páncreas, riñones, huesos y músculos, aunque también el ojo, próstata, espermatozoides, piel, pelo y uñas suelen contener concentraciones importantes (Rubio y col., 2007)

I.5.4.2.2. El Zn y la salud

Contribuye a la actividad de alrededor de 300 metaloenzimas. Es indispensable para el metabolismo de los ácidos nucleicos y proteínas (Mitsuhiko y col., 2006). Este elemento, es además un efectivo antiinflamatorio y antioxidante (Ananda y col., 2007). La más importante de las propiedades antioxidantes del Zn es la protección a través del antagonismo de la transición de metales redox-activos como el Cu y Fe y la protección de grupos proteicos sulfidrilo del daño oxidativo (Powell y col., 2000; Prasad y col. 2004).

También destaca por ser un ión estructural que participa en algunas membranas biológicas y en los ácidos nucleicos. Puede formar bases de los llamados “dedos de Zn”, que caracterizan algunas proteínas de transcripción. Así mismo, es necesario para la integridad de las histonas, proteínas íntimamente involucradas con el ADN, además de ser componente de las polimerasas del ADN y el ARN, por lo que varios estudios sostienen que puede jugar un papel central en el crecimiento celular (Rosado 1998; Salgueiro y col., 2004; Rubio y col., 2007).

Se sabe que el Zn es un nutriente esencial requerido para numerosas funciones fisiológicas, que incluyen el crecimiento, la reproducción y la actividad del sistema inmune (Sien-Sing y col., 2004); además juega un papel esencial en la síntesis de coenzimas que median a su vez en la de aminos biógenas y su metabolismo (Conde-Martel y col., 1992). También tiene un importante rol en el crecimiento y proliferación celulares (Tuluvath y col., 1992).

Junto con el cobre, ambos elementos se estudian combinados como indicadores bioquímicos, siendo incluso más importante clínicamente el conocido ratio cobre/zinc, que los valores plasmáticos independientes de cada mineral. Si este ratio se encuentra elevado, es un indicador de la existencia de un desequilibrio patológico en la regulación de los elementos traza del organismo. Varios estudios han obtenido resultados similares, con un elevado ratio cobre/zinc en casos de cirrosis hepática (Poo y col., 2003; Lin y col., 2006; Somi y col., 2009).

Estudios recientes, sugieren la incorporación de la metalotioneina como un tercer parámetro a dicho ratio, $(Cu/Zn)/MT$, consiguiendo mediante esta proteína, cuya concentración se encuentra más disminuida en los casos de cirrosis hepática o carcinoma hepatocelular que en los de hepatitis crónica, discriminar entre pacientes con patologías misceláneas, o hepatitis crónica y aquellos en estado de cirrosis hepática o carcinoma hepatocelular (Nakayama y col., 2002).

I.5.4.2.3. Absorción y biodisponibilidad

Este mineral, está ampliamente distribuido en la naturaleza. En general, los mariscos (ostras y crustáceos) son los alimentos más ricos en Zn, seguidos de las carnes rojas, los derivados lácteos, los huevos y los cereales integrales. En los alimentos, el Zn se halla asociado principalmente a proteínas y ácidos nucleicos (Passmore y col., 1975; Sandstead y col., 1984; Terrés y col., 2001; Rubio y col., 2007). Las proteínas de origen animal ejercen un efecto potenciador en la absorción del Zn, mientras que la fibra y el fitato la disminuyen, siendo este último su principal inhibidor, al formar un complejo fitato-Ca-Zn, extremadamente insoluble al pH de la parte superior del intestino delgado, donde se absorbe la mayor proporción del Zn (Weisstaub y col., 2008).

El hígado es muy importante para la regulación homeostática del Zn, así como el Zn es necesario para el correcto funcionamiento del hígado. Niveles bajos de Zn están implicados tanto en los estados agudos como crónicos de la hepatopatía y su deficiencia está asociada a la patogénesis de enfermedades del hígado e inducción de estrés oxidativo.

En un estudio realizado en el 2007 por Ioannis y col., se concluyó que el Zn puede proteger contra enfermedades hepáticas. En concreto la deficiencia de este mineral induce estrés oxidativo pues al actuar como cofactor enzimático de la enzima superóxido dismutasa (SOD), su deficiencia reduce la actividad antioxidante de la misma en el organismo.

La homeostasis del Zn, esta regulada principalmente a través de el tracto gastrointestinal mediante ajustes en la absorción de Zn desde el intestino y la excreción del Zn endógeno por las heces (Hambidge y col 2001).

1.5.4.2.4. Deficiencia de Zn

Las implicaciones clínicas de la deficiencia de Zn incluyen retardo del crecimiento, susceptibilidad a las infecciones, diarrea, infertilidad,

hipogonadismo, problemas mentales y neurológicos y deficiencias en la regeneración de heridas (Prasad y col., 2003; Black, 2003).

Una revisión realizada en 1998 (Rosado, 1998) sobre los estudios realizados con anterioridad en México sobre las deficiencias de zinc en niños de la población rural, demuestra la importancia de este mineral, principalmente en las primeras etapas de la vida. Deviniéndose de su deficiencia un aumento de enfermedades infecciosas, diarrea y posibles alteraciones en el desarrollo cognitivo. Llegándose incluso a postular la deficiencia de Zn, como un factor importante en la patogenia de la esquizofrenia (Kornhuber y col., 1994). En el caso concreto de los niños, un artículo publicado en *The Journal of Pediatrics*, concluía que la gran ventaja de la corrección de la deficiencia de Zn, es que normaliza la función celular en múltiples tejidos, mejorando la capacidad del niño para combatir estados infecciosos, y no sólo determinados microorganismos; siendo por tanto la corrección de su deficiencia más eficaz para la salud pública a nivel mundial, que las vacunas contra organismos específicos (Hambidge y col., 1999)

La carencia de este mineral, puede estar causada por diferentes factores, tales como: ingesta insuficiente, problemas en la absorción intestinal, o pérdidas corporales excesivamente elevadas, así como el padecimiento de diferentes enfermedades (Rubio y col., 2007).

I.5.4.3. COBRE (Cu)

I.5.4.3.1. Introducción

El Cu es un elemento traza indispensable para el correcto funcionamiento del organismo. Está presente en todos los tejidos del cuerpo humano en cantidades que oscilan entre 50 y 120 mg (Weisstaub y col., 2008) y generalmente formando parte de enzimas. Es particularmente importante para el equilibrio de otros minerales como el Zn o el molibdeno. En el

organismo desempeña diversas funciones entre las que destaca su papel protector del equilibrio redox evitando el estrés oxidativo, por su acción como cofactor enzimático de la enzima superóxido dismutasa (SOD) citoplasmática dependiente de Zn y Cu, así como su papel en el sistema inmune, sobre la expresión de numerosos genes y sobre la absorción de hierro. Es promotor de la formación de hemoglobina y glóbulos rojos y actúa a nivel del sistema cardiovascular manteniendo la integridad del corazón y como regulador del metabolismo del colesterol (Sáez y col., 2010). Es así mismo, el tercer elemento traza más abundante del cuerpo humano (Barceloux 1999).

I.5.4.3.2. El Cu y la salud

El Cu participa en la expresión de los genes, es cofactor de multitud de enzimas, como la superóxido dismutasa (CuZn-SOD), de gran importancia en las defensas antioxidantes, la enzima tirosinasa, necesaria para la síntesis de melanina en el organismo, así como de otras muchas enzimas (Rahelic y col., 2008). Sus funciones se han podido comprender al identificar cupro-proteínas (cupreínas) y enzimas cobredendientes como las anteriormente mencionadas, que intervienen en reacciones oxidativas relacionadas con el metabolismo del hierro, de los aminoácidos precursores de neurotransmisores, del tejido conectivo y con la destrucción de radicales libres (Weisstaub y col., 2008).

La toxicidad del Cu ha sido objeto de estudio durante décadas, en particular en el modelo de la metalotioneína saturada con Cu que al ingresar en los lisosomas y ser polimerizada de forma incompleta da lugar al Cu reactivo que junto con el Fe, activan la peroxidación lipídica en el lisosoma, lo que causa consecuentemente la necrosis del hepatocito. El Cu reactivo, participa por tanto en el daño hepático de forma directa o indirecta, a través de la estimulación de las células de Kupffer y otras (Klein y col., 1998; Rahelic y col., 2008); así mismo, es también muy importante en la fibrogénesis, ya que el Cu es cofactor de la lisiloxidasa, enzima involucrada en la formación de los puentes moleculares en el colágeno. Una acumulación excesiva en el hígado y un incremento en su concentración promueven la fibrosis hepática (Sato y col.,

2005; Rahelic y col., 2008). El exceso de Cu es por tanto altamente tóxico y suele resultar en daño celular y carcinoma hepatocelular (Eagon y col., 1999; Lin y col., 2005).

De entre las patologías asociadas a la acumulación del Cu, destaca la enfermedad de Wilson, un trastorno autosómico recesivo causado por mutaciones en el gen ATP7B que producen anomalía en el metabolismo del Cu, caracterizado por la acumulación de concentraciones tóxicas de este metal en muchos tejidos y órganos, especialmente en el hígado, cerebro, riñones y ojo. Las manifestaciones clínicas son heterogéneas, al igual que la presentación, aunque inicialmente prevalecen síntomas neuropsiquiátricos y hepáticos (López-Hernández y col., 2007; Espinoza-Herrera y col., 2010). Está asociada con deposición de Cu en los tejidos, incremento de la excreción urinaria de Cu y elevación del Cu libre. La manifestación neurológica es comúnmente a través de un desorden extrapiramidal (Thackeray y col., 2011).

I.5.4.3.3. Absorción y biodisponibilidad

El principal aporte de Cu en la dieta procede de cereales integrales, frutos secos, algunos derivados lácteos y leguminosas (Velasco-Reinold y col., 2008a). En menor cantidad puede encontrarse también en hígado, pescado y marisco (en las ostras en particular), fruta, verduras, setas y chocolate (Sáez y col., 2010). El agua de bebida contiene generalmente 0,1 mg/L y contribuye a la nutrición entre un 6-10% de las necesidades diarias de Cu habitualmente; no obstante se han encontrado niveles mucho más altos en algunas aguas, llegando a aportar hasta un 40% del total de los requerimientos (Jiménez-Serrano y col., 1994).

Los alimentos aportan aproximadamente unos 2 mg/día si la dieta es equilibrada. La ingesta media recomendada en la población adulta española es de 1,1 mg/día (Velasco-Reinold y col., 2008a,b; Sáez y col., 2010).

La absorción de Cu se produce en el estómago y duodeno, donde se une a la albúmina para ser transportado al hígado, ya que las células hepáticas

tienen una gran afinidad por esta proteína unida al Cu. Una vez que ingresa al hígado se incorpora con una globulina para formar la ceruloplasmina, considerada un elemento clave en la movilización de Cu en el organismo, ya que transporta entre un 90-95% del Cu total. Aunque la absorción es del orden del 30% del total ingerido, esta se ve disminuida en dietas con altas ingestas de hierro, molibdeno y zinc (Jiménez-Serrano y col., 1994; Rahelic y col., 2008; Velasco-Reinold y col., 2008b). El 60% del contenido total en el cuerpo humano se encuentra en músculo, piel y esqueleto, aunque los órganos con mayor concentración son hígado y cerebro (Weisstaub y col., 2008).

A la célula, el Cu ingresa mediante dos enzimas transportadoras de Cu, las ATPasas, ATP7A y ATP7B (Rahelic y col., 2008).

I.5.4.3.4. Déficit de Cu

El diagnóstico de la deficiencia de Cu suele efectuarse mediante su determinación en suero (Weisstaub y col., 2008), así como determinando los niveles de ceruloplasmina, superóxido dismutasa o citocromo C oxidasa (Sanz-París y col., 2010) y causa patologías como anemia hipocroma microcítica, neutropenia, hipercolesterolemia, alteraciones óseas, reducción de glóbulos rojos, mala cicatrización de las heridas, cirrosis hepática, raquitismo y otras alteraciones como hemorragias subperiósticas, despigmentación de la piel y de los cabellos y formación defectuosa de la elastina (Jiménez-Serrano y col., 1994; Sáez y col., 2010; Sanz-París y col., 2010; Thackeray y col., 2011).

La deficiencia de Cu adquirida causa una deficiencia secundaria de ceruloplasmina que puede resultar en sobrecarga hepática de hierro y/o cirrosis hepática (Thackeray y col., 2011)

Este déficit es relativamente poco frecuente. Se ha descrito en lactantes y niños que se recuperan de un estado de malnutrición con dieta exclusiva de leche ya que tienen unos depósitos hepáticos reducidos, así como en patologías que cursan con pérdidas crónicas de proteínas como la enfermedad

celíaca, enfermedad de Crohn, síndrome nefrótico o quemaduras intensas (Grungreiff y col., 2009; Sanz-París y col., 2010).

I.5.4.4. MAGNESIO (Mg)

I.5.4.4.1. Introducción

El Mg es el cuarto catión más abundante en el cuerpo humano y el segundo con más prevalencia a nivel intracelular (Elin, 1994; Jing y col., 1995; Koivisto y col. 2002; Turecky y col., 2006).

Más de la mitad del magnesio del cuerpo humano se concentra en los huesos y el restante en los músculos y tejidos blandos. El Mg sérico comprende menos del 1% del Mg total y su concentración se mantiene mediante un estrecho margen por el intestino delgado y el riñón que aumentan la fracción de Mg absorbido en casos de escasez de este elemento (Jing y col., 1995; Laires y col., 2004).

La concentración sérica de Mg es uno de los parámetros clínicos más comunes para la detección de desórdenes en el metabolismo de Mg (Jing y col., 1995).

I.5.4.4.2. El Mg y la salud

El Mg, sirve como cofactor a alrededor de 300 enzimas y además es esencial para la salud, participando en el metabolismo de glucidos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, en la síntesis de transportadores H_2 y particularmente en todas las reacciones envueltas en al formación y uso del Adenosin Trifosfato (ATP), molécula esencial en el metabolismo energético corporal (Rahelic y col., 2008).

El magnesio interviene también en el control de la bomba Na-K, en la transmisión neruoquímica, la contracción muscular, el metabolismo proteico y

el tono vascular (Ruiz-Magro y col., 1999). Este elemento, también actúa como antagonista del calcio. En el sistema neuromuscular reduce la excitabilidad eléctrica de las neuronas e inhibe la liberación de acetilcolina por las terminaciones nerviosas en el músculo y bloquea el efecto de el N-metil-D-aspartato, un neurotransmisor excitador del sistema nervioso central (Laires y col., 2004).

Así mismo, ha sido ampliamente constatado por numerosos estudios, que la insulina estimula la captación de Mg celular (Aikawa, 1960; Resnick y col., 1993).

La IRN (Ingesta Recomendada de Nutrientes) para el Mg según FAO/OMS es de 260 mg/día para adultos de sexo masculino y 220 mg/día para el sexo femenino (García-Gabarra, 2006), ingestas que fueron revisadas al alza por el Instituto de Medicina que fijó las ingestas dietéticas de referencia (DRIs) para los hombres y mujeres adultos sanos entre 400-420 y 310-320 mg/día, respectivamente (IOM, 1998).

I.5.4.4.3. Absorción y biodisponibilidad

La principal parte del Mg proviene de los alimentos ingeridos. Aproximadamente un tercio del Mg que se ingiere será absorbido (Velasco-Reinold y col., 2010). Las principales fuentes de Mg son los productos lácteos (20%), cereales (18%), vegetales (16%), pescado y productos cárnicos (15%), legumbres, nueces y productos derivados de la soja (13%) (Jodrál-Segado y col., 2003). El agua puede también llegar a contribuir hasta en un 27% del total del Mg ingerido en áreas donde el agua de consumo es fuerte y sin ablandar (Jing y col., 1995).

El Mg se excreta principalmente por vía urinaria. Alrededor del 30% está unido a las proteínas del suero, el 15% en complejos y un 50% se encuentra en forma ionizada. El Mg unido a proteínas está principalmente (75%) unido a la albúmina, globulinas α -1 y α -2. La regulación de sus concentraciones se realiza

fundamentalmente por la hormona paratiroidea a través de la regulación en su reabsorción tubular renal (Rahelic y col., 2008).

El cuerpo humano adulto contiene aproximadamente 24 g (1 mol) de Mg celular frente a los 280 mg presentes en fluidos extracelulares (Halpern, 1985). El esqueleto representa el mayor reservorio de Mg (alrededor del 60% del total) (Laires y col., 2004).

Varios estudios indican que además de la hormona paratiroidea, el glucagón, la calcitonina y la insulina incrementan la reabsorción de Mg en el asa de Henle y el túbulo proximal. Por el contrario, la hipercalcemia y la hipofosfatemia reducen su reabsorción tubular. La acidosis metabólica también produce un incremento de la excreción vía urinaria del Mg (Laires y col., 2004).

I.5.4.4. Déficit de Mg

La deficiencia de este elemento viene habitualmente provocada por problemas en su absorción, patologías renales, diuresis excesiva, alcoholismo crónico, diarrea severa, etc. En particular, el Mg también suele encontrarse deficitario en patologías como la diabetes mellitus tipo II, ya que se ha observado cómo la insulina estimula el consumo celular de este mineral (Resnik y col. 1993), así como en el hígado graso alcohólico y no-alcohólico (Turecky y col., 2006).

Más concretamente, el déficit primario de Mg se origina por dos mecanismos etiológicos: deficiencia y depleción. La deficiencia, se debe a una toma insuficiente y la depleción es debida a la desregulación de los factores que controlan el estatus del Mg como la hipoabsorción intestinal de Mg, la instilación urinaria, la reducida absorción y movilización ósea de Mg, hiperglucocorticismo, resistencia a la insulina e hiporeceptividad adrenérgica. El déficit secundario viene como resultado de las patologías anteriormente citadas (Laires y col., 2004).

Su principal consecuencia es una alteración de la excitabilidad muscular, que se ve aumentada por el incremento de la acetilcolina, razón por la cual la sintomatología de su deficiencia suele presentarse con síntomas neuromusculares. Así mismo, provoca desórdenes mentales que pueden incluir confusión y alucinación y desórdenes cardíacos tales como arritmias (Rahelic y col., 2008).

En el déficit crónico de Mg, éste se ve reducido a nivel plasmático y tejidos, y el Mg óseo es movilizado para restaurar la magneemia a niveles normales (Wallach, 1988; Laires y col., 2004).

1.5.4.5. CALCIO (Ca)

1.5.4.5.1. Introducción

El Ca, es un catión divalente vital en multitud de procesos biológicos, se encuentra presente en diferentes formas y está involucrado en numerosas funciones celulares y fisiológicas. Es además, el mineral más abundante en el cuerpo humano, representando un 40% del contenido mineral total (Palacios 2003). Un 90% del total del cuerpo humano aproximadamente, se encuentra en forma de moléculas cristalinas y es relativamente soluble, hallándose principalmente en el hueso y los dientes. El 10% restante, es soluble y se encuentra en el citoplasma celular y fluidos extracelulares (Rodríguez y col., 2002).

Se encuentra implicado en multitud de procesos fisiológicos tales como la transmisión nerviosa, la contracción muscular y la coagulación sanguínea. A nivel celular, el Ca desarrolla una importante función como segundo mensajero, con funciones tan fundamentales como el acople excitación-concentración en las fibras musculares, la comunicación intercelular, la secreción, el crecimiento e inclusive la muerte celular (Ulate-Montero y col., 2006).

Es considerado por muchos autores como el mineral más relevante en los procesos fisiológicos humanos, hasta el punto de que algunos autores lo consideran “el átomo detonante de los procesos biológicos”, deviniéndose esto de la importancia de los flujos iónicos de Ca en la activación de diversos sistemas enzimáticos que involucran incluso los fenómenos de fosforilación y autofosforilación, así como los procesos de transducción de la señal, decodificación y activación de distintos genes, procesos de neurotransmisión de naturaleza sensitiva y motora, integración de fenómenos tan complejos como los de recepción y percepción de estímulos conscientes e inconscientes, liberación de hormonas y parahormonas, etc.,(Mansilla-Olivares, 2004).

I.5.4.5.2. El Ca y la salud

El Ca tiene especial relevancia en la salud del ser humano, especialmente en etapas de crecimiento, debido a la importancia de su depósito a nivel óseo, así como a nivel bioquímico para la regulación de numerosas respuestas celulares. Siendo, junto al fósforo uno de los principales componentes del esqueleto (Cabo-Masip y col., 2008; Bellido y col., 2010).

Las recomendaciones en su ingesta durante la gestación difieren mucho entre los países, aún con poblaciones parecidas, con una ingesta relativa a la mujer que puede oscilar hasta en 1200 mg/día, debido principalmente a las diferencias en los promedios de la ingesta de Ca entre países donde la ingesta de lácteos es alta o baja, o si las dietas que proporcionan el Ca son principalmente de procedencia vegetal o animal, teniendo en cuenta que en el primer caso, existen sustancias que pueden interferir con su absorción (Herrera, 2002). La ingesta de nutrientes recomendada para adultos por FAO/OMS es de 1000 mg/día (García-Gabarra, 2006). Si bien, debe tenerse en cuenta que en los diversos ciclos vitales del ser humano hay distintas necesidades fisiológicas de Ca, sobretodo en la gestación y en la adolescencia donde los requerimientos son mayores, o en los ancianos con estados carenciales y riesgo de osteoporosis (Herrera, 2002).

Se han desarrollado numerosos estudios alrededor de la regulación que ejerce el Ca^{+2} a nivel mitocondrial como estimulador de la síntesis de ATP así como detonante de la apoptosis celular, en lo que puede considerarse un efecto positivo o negativo atendiendo a su estado; de forma que las variaciones en la distribución en los compartimentos intracelulares del Ca^{+2} puede producir una protección de la célula o su muerte fisiológica (Orrenius y col., 2003).

El rol del Ca^{+2} como desencadenante de la muerte celular fue sugerido por Fleckenstein y col. (1974), que propusieron que la entrada de un exceso de Ca^{+2} en los miocitos, podría ser el mecanismo subyacente tras la patología cardíaca que sucedía en la isquemia (Orrenius y col., 2003).

La desregulación de la homeostasis del Ca^{+2} mitocondrial está reconocida como un factor determinante de ciertas patologías. Por ejemplo, la sobrecarga de la matriz Ca^{+2} mitocondrial parece llevar a un aumento en la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS), desencadenando la activación del poro de transición permeable, la liberación del citocromo C y en última instancia la apoptosis. El mecanismo molecular por el cual el Ca^{+2} puede provocar la disfunción mitocondrial, es aún objeto de diversos estudios y está aún por dilucidar (Orrenius y col., 2003; Brookes y col., 2004).

En el miocardio, las modificaciones en la concentración citosólica del Ca^{+2} determinan, de manera directa o indirecta, diversas funciones esenciales como son la génesis y el desarrollo de los potenciales de acción, la regulación de la conducción de los impulsos así como la misma contracción, la integridad celular y la expresión genética, el crecimiento y desarrollo de los miocitos. Debido a ésto, la alteración en alguno de los procesos implicados en el manejo intracelular del calcio, suelen derivar en diversas patologías (Ulate-Montero y col., 2006).

En los últimos años ha sido importante objeto de estudio la relación del Ca con la obesidad, atendiendo a la variación de peso corporal que se ha observado en diferentes estudios, sobre la base del control que este ejerce sobre el metabolismo de la grasa. El mecanismo por el cual esto se produce,

radica en que una dieta baja en calcio conlleva a la disminución del calcio sérico, lo que produce un aumento del Ca intracelular en los adipocitos, resultando en un incremento de la lipogénesis y reducción de la lipólisis y por lo tanto en la acumulación lipídica en el adipocito. Por lo tanto, una dieta baja en Ca promueve la adiposidad mientras que una rica en Ca la reduce (Davies y col., 2000; Palacios, 2003; Zemel y col., 2004). Si bien, se requiere aún de más investigación al respecto, pues al ser la ganancia de peso multifactorial, son necesarios más estudios que aislen específicamente la importancia del Ca como factor diferencial en la ganancia de peso de otros factores de la dieta que pudieran estar implicados (Davies y col., 2000), además de que existe cierta controversia en lo referente a la relación ingesta de Ca – pérdida de peso, que algunos autores califican de inconsistente (Santamaría, 2011).

I.5.4.5.3. Absorción y biodisponibilidad

El consumo de Ca, varía según los países y su origen, que puede ser fundamentalmente animal (leche y derivados lácteos) o vegetal. En general, los productos lácteos son la principal fuente dietética de Ca (Jodral-Segado y col., 2003). Concretamente en los países europeos, el 60-70% de los aportes de Ca provienen de los lácteos y solamente unos 300 mg diarios provienen de otros alimentos (García-Vadillo, 2011).

La vitamina D es uno de los principales factores reguladores del metabolismo cálcico junto con la PTH (parathormona) (Bellido y col., 2010) y la calcitonina; la vitamina D puede ser tanto de origen endógeno como exógeno. En ambos casos, se trata de provitaminas metabólicamente inactivas que deben sufrir una serie de procesos de hidroxilación hasta llegar al producto metabólicamente activo, el calcitriol, esencial tanto en la absorción de Ca como la maduración de las fibras de colágeno de la matriz ósea, además de la calcificación del hueso (Masip y col., 2008). Esta vitamina, aumenta la absorción de Ca a nivel intestinal en un 30-40% (Payá, 2009).

Existen varios factores dietéticos que influyen en la absorción de Ca, que se produce a nivel intestinal. Así, por ejemplo existen controversias en cuanto

al efecto que tiene el fósforo sobre la absorción de Ca y durante años se ha recomendado que su ingestión, no exceda a la del Ca, intentando mantener una relación 1:1 (calcio : fósforo) (Herrera, 2002; Velasco-Reynold y col., 2010). En los casos de deficiencia de Ca, así como en lactantes, se recomienda aumentar la proporción, a 1,5:1 (Vasquez-Garibay, 2008). Las dietas que derivan el Ca de alimentos vegetales principalmente, pueden tener compuestos que interfieren con su absorción y reducen su biodisponibilidad (Herrera, 2002), como los fitatos que favorecen la formación de complejos insolubles de Ca impidiendo así su absorción, así como la fibra dietética que favorece su excrección fecal. Es por ello, que en las dietas ricas en vegetales y pobres en lácteos, como por ejemplo los modelos dietéticos de Sudamérica, suelen tener unos requerimientos mayores de Ca, al estar este disminuido en su absorción (Méndez y col., 2000).

I.5.4.5.4. Déficit de Ca

Durante la infancia, el déficit de Ca o hipocalcemia, definida como una disminución de Ca plasmático por debajo de 8,5 mg/dl (Santamaría, 2011), impide una correcta mineralización del esqueleto. Si este déficit progresa, se produce raquitismo en los niños y osteomalacia en adultos (Payá y col., 2009).

Este déficit, puede aparecer por varios motivos, como la insuficiencia renal, el cáncer de mama y próstata, el raquitismo o por el bajo aporte de la dieta (Santamaría, 2011). Estudios realizados con anterioridad, indican que un alto porcentaje de la población no alcanza los requerimientos de calcio con la dieta (Bischoff-Ferrari y col., 2009). Estos porcentajes se ven incrementados en ancianos, mujeres pos-menopáusicas y pacientes con fractura de cadera (García-Vadillo, 2011).

En definitiva, el Ca es un elemento esencial e insustituible en la salud ósea. La carencia aguda del mismo, ocasiona un balance metabólico negativo e indirectamente un incremento de la reabsorción ósea por aumento de la parathormona (Nordin, 1997; García-Vadillo, 2011). A este aumento de la reabsorción, si la carencia es acusada, se añade un retraso de la formación y

mineralización, produciéndose pérdidas de masa ósea del 1-3% (Nordin, 1997). En las personas con baja ingesta crónica de Ca el remodelado óseo permanece aumentado y la formación ósea disminuida por un aumento de la supervivencia de los osteoclastos y un descenso de la misma en los osteoblastos (García-Vadillo, 2011).

El tratamiento de este déficit se basa en la normalización de los niveles de Ca mediante el uso de suplementos de Ca en la mayoría de los casos, y en la corrección de la causa subyacente (Santamaría, 2011).

En la actualidad, no está recomendada la administración de suplementos de Ca a la población sana, debido a que se carece de evidencias que demuestren su eficacia preventiva de las fracturas y porque existe cierta controversia sobre si podrían aumentar el riesgo cardiovascular o por el contrario, ejercer un efecto protector sobre el mismo (García-Vadillo, 2011; Santamaría,2011).

II. OBJETIVOS

En los pacientes con CH se produce de forma asociada a la patología, bien como causa, o consecuencia derivadas de la misma, un desequilibrio que compromete el estado nutricional afectando a múltiples nutrientes. Se sabe que en la CH se produce un incremento de la peroxidación lipídica y una desregulación del metabolismo corporal al verse afectada una parte considerable de los hepatocitos cuya capacidad funcional se ve claramente mermada.

Por otro lado existen diferentes métodos de evaluación del grado de severidad de la patología cirrótica uno de los cuales, el índice de Child-Pugh, fue definido a partir de las investigaciones llevadas a cabo por 2 grupos de investigadores que le han conferido el nombre actual. Hasta el momento y según la información de la que disponemos no se han realizado estudios que correlacionen de forma específica la influencia del grado de severidad de la patología estimada a través del índice de Child-Pugh con los niveles séricos de Mg, Ca, Cu, Zn y Se como minerales cuya regulación homeostática corporal es muy estrecha dada su importante implicación en el equilibrio metabólico corporal así como en el metabolismo integral.

Por todo ello y como hipótesis de partida del estudio, estableciendo que la propia patología influye en los niveles séricos de estos minerales, pretendemos además demostrar que el aumento del grado de severidad determinado mediante el índice de Child-Pugh altera el equilibrio sérico y regulación homeostática en el mismo de los minerales ensayados (Mg, Ca, Cu, Zn y Se). Como segunda hipótesis se establece que las complicaciones asociadas a la CH, el éxitus, la edad, el sexo o el trasplante de hígado pueden alterar igualmente la regulación homeostática corporal de estos minerales en el suero sanguíneo en los pacientes con CH.

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

- 1.- Puesta a punto de las técnicas analíticas de espectrometría de absorción atómica (EAA) para la determinación de los niveles

séricos de Mg, Ca, Cu y Zn por atomización a la llama (EAA-LL) y de los de Se por atomización con generación de hidruros (EAA-GH).

- 2.- Determinación de los niveles séricos de Mg, Ca, Cu, Zn y Se en pacientes con cirrosis hepática y en los controles sanos seleccionados.
- 3.- Evaluación del índice de severidad de la CH en los enfermos mediante el índice de Child-Pugh a fin de determinar su influencia en los niveles séricos de Mg, Ca, Cu, Zn y Se.
- 4.- Diagnóstico y clasificación de las complicaciones asociadas a la cirrosis hepática en los enfermos.
- 5.- Evaluación de la influencia que las complicaciones asociadas a la CH, el éxitus, la edad, el sexo o el trasplante de hígado ejercen en la regulación homeostática corporal de Mg, Ca, Cu, Zn y Se en el suero sanguíneo de los pacientes con CH.

III. PARTE EXPERIMENTAL

En el estado actual de la totalidad de las técnicas analíticas, la espectrometría de absorción atómica es la que está reconocida como una de las más adecuadas (sensibilidad, rapidez, exactitud y precisión) para el análisis concreto de elementos traza (Caurant, 1994). Sin embargo, la detección y cuantificación de los elementos en cantidades traza son muy delicadas por los riesgos de contaminación secundarios o de pérdida existentes tanto durante el pretratamiento de la muestra, como durante el análisis (Navarro, 1991). Por todo ello, el analista debe esforzarse en minimizar los errores a todos los niveles y asegurarse de la calidad de sus análisis mediante el empleo de controles internos (muestras de referencia) y externos (ejercicios de calibración interlaboratorios). Así mismo, y en el propio laboratorio de análisis también deben ejercerse controles periódicos como por ejemplo a lo largo de días diferentes, para ver si como consecuencia de ellos se producen o no modificaciones en las medidas de las características analíticas del método.

III.1. MATERIAL

III.1.1. APARATOS

- Lámpara de cátodo hueco de Ca-Mg Perkin Elmer.
- Lámpara de cátodo hueco de Cu, Perking Elmer.
- Lámpara de cátodo hueco de Se, Perking Elmer.
- Lámpara de cátodo hueco de Zn Perking, Elmer.
- Sistema Milli-Q de obtención de agua de grado reactivo Waters, mod. R015 (Waters, Medford, USA).
- Espectofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer 1100 B equipado con un Generador de Hidruros Perkin-Elmer mod. MHS-10 (Alemania).
- Placa de mineralización Multiplaces Selecta (Barcelona, España).
- Balanza de precisión Mettler AE-200.
- Campaña de gases Burdinola.
- Estufa de desecación Selecta, mod.210.

- Congelador Ariston.
- Autoanalizador HITACHI 917 (Roche).
- Lipocaliper Lange (Cambridge Scientific Industries).
- Centrífuga Jovan, Mod. C312 (Saint Nazaire, Francia).

III.1.2. MATERIAL

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

Todo el material a emplear se lava varias veces con agua destilada, y posteriormente se mantiene en una disolución de ácido nítrico al 30% durante 24 horas. A continuación se enjuaga abundantemente con agua desionizada y se seca a temperatura ambiente en el caso del material aforado o de polietileno, o bien en estufa a 90-100°C, para el material de vidrio restante. Finalmente se almacena en lugar limpio, seco y apartado de posibles contaminaciones hasta su empleo (Jiménez y col., 1984; Laserna, 1985).

El agua empleada, que debe tener una resistividad inferior a 18 megaohms/cm, debe estar constantemente monitorizada. En todo momento se deben usar guantes desechables (Savoir y Wills, 1992).

III.1.3. REACTIVOS Y DISOLUCIONES

III.1.3.1. REACTIVOS

Todos los reactivos utilizados han sido de calidad analítica:

- Agua bidestilada de grado reactivo (Milli-Q).

- Ácido clorhídrico 25% p/v. Merck.
- Ácido nítrico 65% p/v. Merck.
- Ácido perclórico 60% p/v. Merck.
- Óxido de lantano 99.99% (para absorción atómica), AA (USA). Patrón de referencia estándar con un contenido certificado en Se [Trace Metal Serum Control A level II CRM 0148, Kaulson Laboratories Inc. Contox® (New Jersey, USA)].
- Patrón de referencia certificado en Zn y Cu [Contox Trace Serum Metal Control A Level I, Kaulson Laboratories Inc. (NJ, USA)].
- Patrón de referencia estándar con un contenido certificado en Ca, Mg, Zn y Cu (Certified Reference Material Human Serum Chengdu Shuyang Medition Factory, Chengdu, China; National Research Center for CRM´1, Beijing, China, United Analysis and Measurement enter of Sichnan, Chengdu, China).

III.1.3.2. DISOLUCIONES

- Disolución estándar de Ca de 1000 mg/l (Tritisol, Merck).
- Disolución estándar de Mg de 1000 mg/l (Tritisol, Merck).
- Disolución estándar de Zn de 1000 mg/l (Tritisol, Merck).
- Disolución estándar de Cu de 1000 mg/l (Tritisol, Merck).
- Disolución estándar Se de 1000 mg/l (Tritisol, Merck).

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

- Disolución de HNO₃-HClO₄ (4:1).
- Disolución de cloruro de lantano (LaCl₃ 1% p/v): se pesó una cantidad determinada de La₂O₃, y tras adicionar unos ml de HCL 25% se diluyó con agua bidestilada.

III.1.4. MUESTREO

Las muestras de sangre y los sueros correspondientes fueron recogidas en un número de 93 pacientes con cirrosis hepática (39 mujeres y 54 hombres, con una edad media de $41,6 \pm 16,6$ años) y contrastada frente a las de 30 adultos sanos (13 mujeres y 17 hombres, con una edad media de $40,7 \pm 18,8$ años) como controles, por el Servicio de Análisis Clínicos en colaboración con el Servicio de Digestivo del Hospital Virgen de las Nieves de Granada. Previamente se informó al Comité de Ética del Hospital de la realización del estudio, que procedió a la concesión del permiso necesario para la ejecución del mismo. Con antelación se obtuvo, previa información de los objetivos y características del estudio, un consentimiento firmado por los participantes en el mismo.

Las muestras de sangre obtenidas para los enfermos con la patología objeto de este estudio (CH) fueron recogidas previa revisión de los diagnósticos clínicos de los pacientes de ambos sexos, que acuden al Servicio de Digestivo de este Hospital.

De forma global en la siguiente tabla (tabla 6) se detallan adicionalmente al tipo de CH los distintos factores considerados en el presente trabajo, a fin de estudiar su posible influencia en los niveles de los diferentes minerales (Se, Ca, Mg, Cu y Zn) determinados en las muestras séricas de los enfermos considerados en el presente estudio.

TABLA 6. Factores y unidades incluidas en éstos, cuya influencia sobre las variables consideradas (niveles séricos de Mg, Ca, Cu, Zn y Se) hemos estudiado en el presente trabajo.

FACTORES	UNIDADES
Sexo	Hombre (1), mujer (2)
Trasplante hepático	Si (1), No (2)
Exitus	Si (1), No (2)
Grupo de edad (años)	≥30 (1 A), 31-50 (2 B), ≥51 (3 C)
Complicaciones	<p><u>En el pasado:</u> HDA (varices)(1), ascitis(2), encefalopatía(3), bacteriemia-sepsis(4).</p> <p><u>En el ingreso actual:</u> HDA (varices)(1), ascitis(2), encefalopatía(3), bacteriemia-sepsis(4).</p>
Severidad de la patología según el índice Child-Pugh (ICP)	ICP A/1 (pacientes con la cirrosis bien equilibrada, con un valor de ICP entre 5-6); ICP B/2 (pacientes con cirrosis severa con alteración funcional significativa, con un valor de ICP entre 7-9); ICP C/3 (pacientes con la cirrosis muy desequilibrada, con un valor de ICP entre 10-15).

III.1.4.1. IDENTIFICACIÓN Y CODIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS

Para la identificación y posterior cuantificación de las muestras de los individuos con CH, se confeccionó una ficha en una base de datos, en la que cada muestra tenía un código único que contaba de 10 dígitos en función de la información disponible.

III.1.4.2. EXTRACCIÓN, CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE

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

III.1.5. MATERIAL INFORMÁTICO

Se ha usado el procesador de textos Word en su versión Windows 2000 y XP.

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

III.2. MÉTODOS

III.2.1. CALIBRACIÓN

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

En el presente trabajo, se han percibido interferencias de matriz en la determinación de selenio y calcio, por lo que se ha empleado el procedimiento de adición de patrón (adición-calibración) en la medida de cada una de estos minerales. Se ha comprobado que las pendientes de las ecuaciones de la recta correspondientes, eran distintas a las de la recta de calibración lineal obtenida de las disoluciones estándares de ambos elementos (Tabla 7).

TABLA 7. Valores de los parámetros de las ecuaciones de las rectas de calibración lineal y de adición calibración para la determinación de Se, Ca, Mg, Zn y Cu en muestras de suero: comparación estadística de las pendientes (Absorbancia= a + b [Elemento])

ELEMENTO	RECTA DE CALIBRACIÓN LINEAL		RECTA DE ADICIÓN CALIBRACIÓN		P
	a (ordenada en el origen)	b (pendiente)	a (ordenada en el origen)	b (pendiente)	
Calcio (ppm)	-0,0028	0,0728	0,1015	0,0976	<0,05 (SS) ^a
Selenio (ppb)	-0,0008	0,0256	0,0137	0,0008	<0,05 (SS) ^a
Magnesio (ppm)	0,0030	0,984	0,220	0,988	>0,05 (SS) ^b
Cobre (ppm)	-0,0012	0,0685	0,0138	0,0660	>0,05 (SS) ^b
Zinc (ppm)	-0,0024	0,2618	0,0533	0,2615	>0,05 (SS) ^b

a: Existen diferencias estadísticamente significativas

b: No existen diferencias estadísticamente significativas

Para la medida del Mg, Cu y Zn, y una vez comprobado que no existían interferencias de matriz en las muestras de suero, se utilizó el procedimiento de

calibración lineal mediante el establecimiento de las correspondientes rectas patrón de Mg, Cu y Zn, resultantes de la correlación de las lecturas de absorbancia obtenidas en el espectrofotómetro con las concentraciones de estos elementos en las disoluciones estándar preparadas respectivamente.

III.2.1.1. PREPARACIÓN DE LAS RECTAS DE CALIBRADO

A partir de las disoluciones estándar de 1000 ppm de los distintos elementos determinados (Se, Mg, Zn, Ca y Cu) se prepararon por disoluciones sucesivas con agua bidestilada o HCl al 0,5% en agua bidestilada para el Se, las disoluciones de diferentes concentraciones en estos elementos.

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

En este procedimiento de calibración se representa la medida espectrofotométrica de la absorbancia expresada en altura de pico frente a la concentración del analito representado por cada uno de los minerales analizados en las disoluciones seriadas para éstos.

III.2.1.2. APLICACIÓN DEL MÉTODO DE ADICIÓN DE PATRÓN

Para comprobar el efecto de la matriz sobre las señales correspondientes al Se, Mg, Zn, Ca y Cu, se aplicó el método de adición de patrón. A continuación se señalan las condiciones en las que se llevó a cabo este método.

En el caso del Mg y Ca se tomaron 5 alícuotas del mismo volumen de suero de 0,025 ml, y se dispusieron en tubos de ensayo de 2 ml ubicados en diferentes gradillas. A continuación se adicionaron 0,200 ml de LaCl_3 a cada

una de dichas alícuotas, con cantidades crecientes de las disoluciones patrón de estos elementos, procediendo de la siguiente forma: a la primera no se le agregó disolución patrón de Ca o Mg, mientras que a las 2^a, 3^a, 4^a y 5^a alícuotas se les fueron añadiendo cantidades crecientes de disoluciones patrón de Mg (1 ppm) y de Ca (10 ppm). Previa dilución con H₂O bidestilada hasta un volumen final de 2 ml, se procedió a la determinación del contenido de Mg o Ca utilizando la técnica correspondiente.

Las concentraciones de Mg y Ca que se adicionaron a cada muestra estuvieron en función de los niveles presentes de dichos elementos en las mismas.

Para el Cu y el Zn se procedió de igual forma, tomándose 5 alícuotas de 0,400 ml de suero, a las que más tarde se adicionaron cantidades crecientes de las disoluciones patrón de Cu (1ppm) y Zn (1 ppm) comprendidas entre 0,100-0,400 ppm para ambos elementos, antes de diluir con H₂O bidestilada hasta el volumen final.

En el caso del selenio, se tomaron las 5 alícuotas de 0,200 ml de suero, a las que tras ser sometidas al procedimiento de mineralización y reducción se les adicionaron cantidades crecientes de la disolución patrón de Se (100 ppb) comprendidas entre 1,0-4,0 ppb antes de diluir hasta el volumen final y determinar el contenido de selenio mediante la técnica de EAA-GH.

III.2.2. FASE PREINSTRUMENTAL

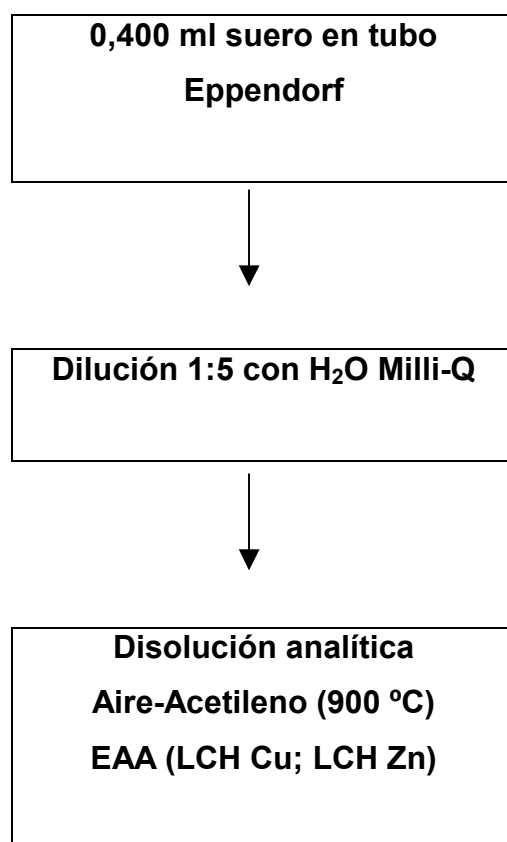
III.2.2.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE SUERO PARA EL ANÁLISIS DE SELENIO, ZINC, COBRE, MAGNESIO Y CALCIO

Para el Mg y Ca, se tomaron 0,025 ml de suero homogeneizado que fueron diluidos a 2 ml con H₂O Milli-Q previa adición de LaCl₂ para modificar la matriz (Gámez y col., 1997). La disolución analítica con los analitos disueltos

(Mg y Ca), fue aspirada directamente en la llama de aire acetileno del espectrofotómetro facilitando de esta forma la atomización de los compuestos de los que forman parte el Mg y Ca en la matriz biológica, para la obtención de estos elementos en su estado fundamental (Mg^0 y Ca^0), los cuales se sitúan por encima de la cabeza del mechero absorbiendo parte de la radiación de la lámpara de cátodo hueco de estos elementos. Tras este paso se midieron las absorbancias, que fueron función de las concentraciones existentes en las muestras. Las absorbancias medidas se contrastaron frente a la recta de calibración lineal para el Mg (con patrones comprendidos entre 0,050-0,500 ppm) y la recta de adición calibración por el efecto de matriz observado por el Ca (con patrones comprendidos entre 0,250-1,000 ppm).

Para el Cu y el Zn (Figura 1), se tomaron 0,400 ml de suero en un tubo Eppendorf (Reyes-Pérez, 2001) que fueron diluidos en una proporción (1:5) con agua Milli-Q. Las diluciones analíticas obtenidas fueron aspiradas de forma directa a las llama de aire-acetileno de EAA. Las absorbancias que se obtuvieron fueron contrastadas frente a las curvas de calibración lineales para ambos elementos, obtenidas para diluciones patrón distintas de estos elementos comprendidas entre 0,050-0,700 ppm para el Cu, y 0,100-0,800 ppm para el Zn y, diluidas en glicerina al 5% en agua Milli-Q.

FIGURA 1. Modelo operatorio para la determinación de Cu y Zn en muestras de suero



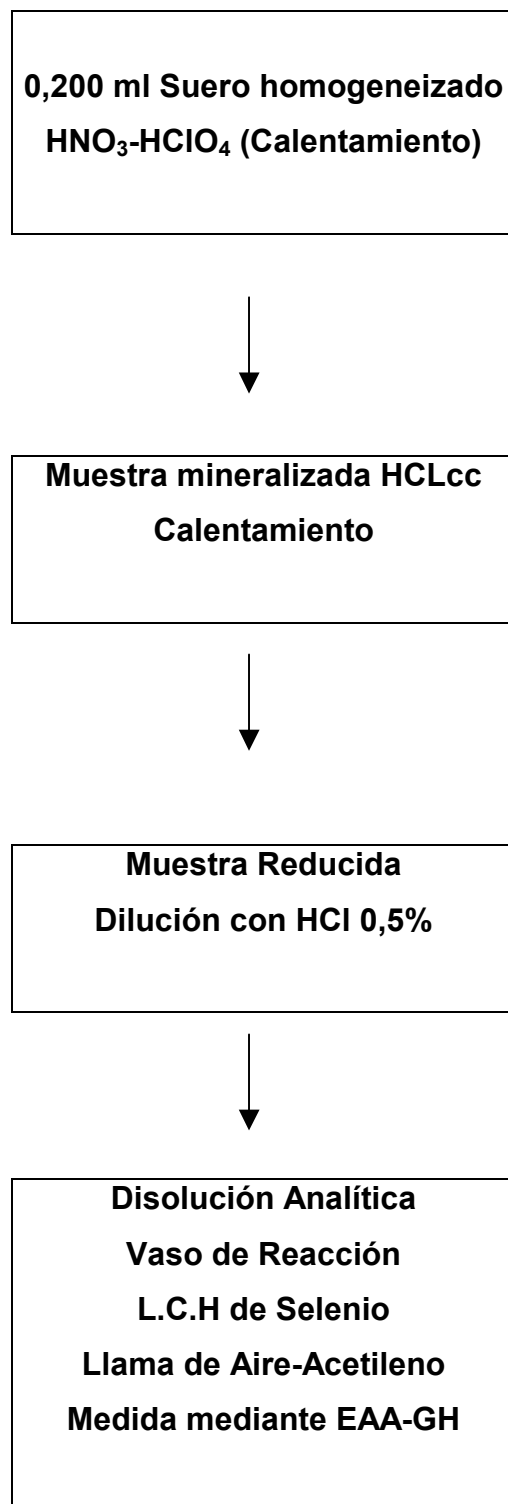
III.2.2.2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE SUERO PARA EL ANÁLISIS DE SELENIO

Para la determinación de selenio la técnica que se empleó (Figura 2) (Navarro y col., 1995) consistió en una mineralización de la muestra de suero con 1,00 ml de una solución de HNO₃ concentrado y HClO₄ concentrado (4:1) y calentamiento a 110°C. Posteriormente, tras enfriar la muestra así obtenida y adicionar HCl concentrado, se calentó a 80°C, para la reducción del Se⁶⁺ a Se⁴⁺. Tras este paso previo, la muestra reducida se diluyó con una disolución de HCl al 0,5% (v/v) obteniéndose la disolución analítica con el analito disuelto (Se⁴⁺).

Para la determinación del contenido de Se en la muestra de suero, se dispusieron los 10 ml de disolución analítica en el vaso de reacción. Tras la

disposición de éste en el sistema de generación de hidruros del espectrofotómetro, se hizo pasar a través de la disolución analítica el gas portador (argón), el cual, previamente había pasado por el recipiente que contiene la disolución reductora de NaBH_4 al 3% (p/v) en NaOH al 1% (p/v). Este reductor facilitó la reducción de Se^{4+} a Se^{2-} para así formar el seleniuro de hidrógeno (H_2Se), el cual, dado su carácter volátil, fue transportado por la corriente gaseosa hasta la célula de cuarzo, calentada sobre una llama de aire-acetileno. A 900°C se garantiza la ruptura de los enlaces de la molécula (H_2Se) liberándose el Se al estado elemental (Se^0), el cual se interpone en la radiación procedente de la lámpara de cátodo hueco (LCH) de Se de la que va a absorber una cantidad proporcional a la población atómica existente en la célula de cuarzo, que a su vez es proporcional a la concentración del analito en la muestra problema (Figura 2). Esta absorbancia, se correlaciona con la concentración de selenio en la muestra problema a través del método de adición patrón.

FIGURA 2. Modelo operatorio empleado en la determinación del contenido en selenio en muestras de suero humano



III.2.3. FASE EXPERIMENTAL.

III.2.3.1. MEDIDA DEL SELENIO, ZINC, COBRE, MAGNESIO Y CALCIO POR EAA A LA LLAMA.

A continuación se detallan las condiciones instrumentales de medida del Mg, Ca, Cu, Zn y Se según se recoge en la tabla 8.

TABLA 8. Condiciones instrumentales de medida del Mg, Ca, Cu y Zn mediante EAA-LL y del Se por EAA-GH

PARÁMETROS	Mg	Ca	Cu	Zn	Se
Técnica (EAA)	EAA-LL	EAA-LL	EAA-LL	EAA-LL	EAA-GH
Fuente radiación (LCH)	Ca-Mg	Ca-Mg	Cu-Ni-Mn-Cr	Zn	Se
Longitud de onda	285,2 nm	422,7 nm	324,7 nm	213,9 nm	196,0 nm
Resolución de rendija	0,7 nm	0,7 nm	1,0 nm	1,0 nm	2,0 nm
Intensidad corriente	10 mA	10 mA	5 mA	3 mA	11 mA
Nº determinaciones	4	4	4	4	3
Retraso de señal	0,0 s	0,0 s	0,0 s	0,0 s	4 s
Tiempo de integración	1,0 s	1,0 s	1,0 s	1,0 s	8 s
Llama: aire-etileno	Si	Si	Si	Si	Si
Flujo de aire	8,0 l/min.	8,0 l/min.	8,0 l/min.	8,0 l/min.	11,5 l/min.
Flujo de acetileno	2,5 l/min.	2,5 l/min.	2,5 l/min.	2,5 l/min.	2,5 l/min.
Tª de atomización	900° C	900° C	900° C	900° C	900° C
Reductor	-	-	-	-	NaBH ₄ al 3% en NaOH 1%

III.2.3.2. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DEL MÉTODO DE DETERMINACIÓN DE SELENIO, ZINC, COBRE, MAGNESIO Y CALCIO

El estudio de las características analíticas permite una evaluación de la validez de los métodos empleados y su puesta a punto para la matriz problema. Incluyendo:

- A. Sensibilidad.
- B. Selectividad.
- C. Límite de detección.
- D. Exactitud.
- E. Precisión.

A) SENSIBILIDAD

Puede definirse como la concentración absoluta del elemento que produce un 1% de absorción y equivale a 0,0044 unidades de absorbancia. También se la denomina “concentración característica” y delimita la zona de trabajo al preparar la línea de calibrado. Se deduce a partir de medidas repetitivas de la absorbancia producida por un patrón de concentración determinada.

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

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

Siendo:

V: volumen de la alícuota.

C: concentración de analito en la solución.

A: medida de absorbancia obtenida.

En la tabla 9., se indican los valores de sensibilidad obtenidos en el presente estudio.

TABLA 9. Valores de sensibilidad para las determinaciones de Mg, Ca, Cu, Zn y Se en suero humano

ELEMENTO	SENSIBILIDAD COMO M_C
Magnesio	55 ng
Calcio	48 ng
Cobre	77 ng
Zinc	15 ng
Selenio	2,09 ng

B) SELECTIVIDAD

La selectividad de los métodos de determinación de Mg, Ca, Cu, Zn y Se fue comprobada mediante el método de adición de patrón (método de adición-calibración).

Para la determinación del Mg, Cu y Zn, las ecuaciones de la recta correspondientes a la adición de estos elementos en las muestras problema y las obtenidas para los correspondientes patrones en medio acuoso, determinan que los valores de las pendientes son muy próximos y no son estadísticamente diferentes entre sí. Esto establece la no existencia de interferencias de matriz (Tabla 7). Contrariamente, para el Se y el Ca si se observa la existencia de interferencias matriz

C) LÍMITE DE DETECCIÓN

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

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

Donde:

m = Sensibilidad analítica (pendiente de la recta de calibrado)

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

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

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

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

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

TABLA 10. Valores del límite de detección para las determinaciones de Mg, Ca, Cu, Zn y Se en suero humano

ELEMENTO	LIMITE DE DETECCIÓN
Magnesio	9,42 ppb
Calcio	110,0 ppb
Zinc	11,6 ppb
Cobre	3,1 ppb
Selenio	0,143 ppb

D) ESTUDIO DE LA EXACTITUD DEL MÉTODO

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

- a. El empleo de **patrones con contenidos de analitos (Mg y Ca) certificados** por estudios de calibración interlaboratorios.
- b. **Estudios de porcentaje de recuperación** de muestras tras la adición de cantidades conocidas del elemento a determinar desde una disolución patrón de mineral, a varias fracciones iguales de una misma muestra y posterior sometimiento al procedimiento analítico completo. De esta manera, las cantidades del elemento determinadas en las muestras adicionadas se comparan con los valores resultantes de la suma de los niveles medios del mismo en la muestra sin adicionar y de las cantidades absolutas añadidas. Por tanto:

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

Donde:

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

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

- c. La comparación de métodos, herramienta eficaz para la investigación de la exactitud, donde los análisis de muestras independientes se comparan entre un método y otro considerado de referencia (Poppe y Baklok, 1989).

a) Contraste con patrón certificado

En el presente trabajo se realizaron estudios con tres materiales de referencia, certificados en Mg, Ca, Cu, Zn y Se.

Una vez reconstituidos los sueros, se prepararon 10 fracciones de igual volumen de los estándares certificados, y se sometieron a los procedimientos analíticos de mineralización y determinación de Mg, Ca, Cu, Zn y Se. El valor medio que se obtuvo para cada determinación, se comparó con el correspondiente valor certificado (Tabla 11).

TABLA 11. Evaluación de la exactitud del método mediante el empleo de diversos patrones certificados para la determinación de Mg, Ca, Cu, Zn y Se en suero

ELEMENTO	MATERIAL DE REFERENCIA		
	Contox trace serum metal CRM 0148	Serum metal control A level 1	CRM human serum Chengdu Suyang China
Magnesio			
Determinado	-	-	21,1 ± 0,7
Certificado	-	-	20,4 ± 0,8
Calcio (mg/l)			
Determinado	-	-	84,6 ± 6,5
Certificado	-	-	85,5 ± 5,3
Cobre (mg/l)			
Determinado	-	0,916 +/- 0,016	1,032 ± 0,075
Certificado	-	0,900 +/- 0,075	1,050 ± 0,090
Zinc (mg/l)			
Determinado	-	0,789 +/- 0,042	1,028 ± 0,283
Certificado	-	0,800 +/- 0,060	1,030 ± 0,230
Selenio (µg/l)			
Determinado	156,0 ± 11,9	-	-
Certificado	150,0 ± 6,0	-	-

b) Cálculo del porcentaje de recuperación

Para su realización se eligieron al azar dos muestras para cada uno de los minerales. Se adicionaron cantidades crecientes de los elementos desde las soluciones patrón de trabajo y se sometieron al procedimiento analítico empleado. Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 12 y 13.

TABLA 12. Cálculo del porcentaje de recuperación para la determinación de Mg, Ca, Cu y Zn en dos muestras de suero humano.

ELEMENTO	CANTIDAD PRESENTE (mg)	CANTIDAD ADICIONADA (mg)	CANTIDAD ENCONTRADA (mg)	% RECUPER. MEDIO +/- DE
Magnesio	0,448	0,000-0,325	0,448-0,773	100,26 +/- 0,61
	0,392	0,000-0,325	0,392-0,708	99,35 +/- 0,83
Calcio	2,243	0,000-2,400	2,243-4,944	101,10 +/- 3,64
	1,603	0,000-2,500	1,603-4,107	98,98 +/- 1,03
Cobre	0,253	0,000-0,200	0,253-0,450	99,35 +/- 0,63
	0,288	0,000-0,200	0,286-0,495	98,87 +/- 0,85
Zinc	0,422	0,000-0,600	0,422-1,026	100,18 +/- 0,21
	0,334	0,000-1,000	0,334-1,412	102,6 +/- 4,30

TABLA 13. Cálculo del porcentaje de recuperación para la determinación de Se en dos muestras de suero humano

ELEMENTO	CANTIDAD PRESENTE (µg)	CANTIDAD ADICIONADA (µg)	CANTIDAD ENCONTRADA (µg)	% RECUPER. MEDIO +/- DE
Selenio	19,28	0,00-20,00	19,28-48,85	99,33 +/- 1,01
	27,37	0,00-20,00	27,37-47,35	100,35 +/- 0,95

E) ESTUDIO DE PRECISIÓN DEL MÉTODO

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

a) Evaluación de la *repetibilidad* o precisión intralaboratorio

Para evaluar la repetibilidad se eligieron al azar dos muestras de suero y se efectuaron 7 preparaciones con 300 mg de cada una de ellas, siendo sometidas al procedimiento de mineralización y a los procedimientos de medida descritos para los minerales estudiados.

Los datos obtenidos en cada serie de observaciones fueron sometidos a un tratamiento estadístico (Reyes Castañeda, 1980; Martín y Luna, 1989), a fin de establecer la media (\bar{X}_m) y la desviación estándar (S) correspondientes a cada una de las muestras y para cada una de las determinaciones realizadas.

Gracias a este procedimiento, se calculó el coeficiente de variación (CV) o desviación estándar relativa (RSD) y el intervalo del 95% de confianza, que significa que el verdadero valor medio con un 95% de probabilidad se encontrará comprendido entre sus límites.

También se calculó la desviación estándar media (S_m), y a partir de esta, el correspondiente error relativo ($E.R.$), mediante las siguientes expresiones matemáticas:

Desviación estándar media:
$$S_m = \frac{S}{\sqrt{n}}$$

Coeficiente de variación:
$$C.V. = \frac{S}{X_m} \times 100$$

Error Relativo:
$$E.R. = \frac{S_m \cdot t}{X_m} \times 100$$

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

$$X_m \pm S_m \cdot t$$

Para $n = 10$

$\alpha = 0,05$

el coeficiente "t" (Student) tiene un valor de 2,262.

Los resultados obtenidos en este estudio para las 10 medidas efectuadas en las diferentes muestras elegidas, se indican para los elementos estudiados en la tabla 14.

TABLA 14. Cálculo de la repetibilidad del método en la determinación de Mg, Ca, Cu, Zn y Se en 2 muestras de suero humano.

ELEMENTO	MUESTRA 1		MUESTRA 2	
	X ± D.E.	C.V.	X ± D.E.	C.V.
Mg (ppm)	23,16 ± 0,97	4,19	14,84 ± 0,92	6,20
Ca (ppm)	83,70 ± 3,42	4,09	81,90 ± 6,14	7,50
Cu (ppm)	1,129 ± 0,020	1,77	0,915 ± 0,015	1,64
Zn (ppm)	1,050 ± 0,027	2,57	0,788 ± 0,041	5,20
Se (ppb)	68,75 ± 5,22	7,59	55,23 ± 3,05	5,52

III.3. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

En la tabla siguiente (tabla 15) se recogen los valores de concentración de Mg, Ca, Cu, Zn y Se y los de índice de severidad de los enfermos con CH analizados en el presente estudio.

TABLA 15. Valores correspondientes a los parámetros evaluados (concentraciones séricas de Ca, Mg, Cu, Zn y Se e índice de severidad de la patología) en sujetos enfermos con CH

PARÁMETRO	N	X ± D.E.	RANGO
Mg (ppm)	93	21,19 ± 3,73	12,0-38,3
Ca (ppm)	93	87,69 ± 14,84	39,0-151,0
Zn (ppm)	93	0,880 ± 0,198	0,400-1,65
Cu (ppm)	93	1,26 ± 0,325	0,430-2,45
Se (ppb)	93	57,63 ± 19,97	12,40-111,8
Grado severidad	93	6,91 ± 1,66	1,00-15,0

En la tabla 16 se recogen los valores de concentración de Mg, Ca, Cu, Zn y Se de los controles sanos evaluados en el presente estudio.

TABLA 16. Concentraciones séricas de Ca, Mg, Cu, Zn y Se en controles sanos

PARÁMETRO	N	X ± D.E.	RANGO
Mg (ppm)	30	23,99 ± 2,22	19,06-28,88
Ca (ppm)	30	109,64 ± 11,19	86,0-130,0
Zn (ppm)	30	0,847 ± 0,125	0,590-1,23
Cu (ppm)	30	1,0,78 ± 0,096	0,780-1,240
Se (ppb)	30	73,09 ± 19,02	38,55-108,1

III.4 ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS SEGÚN LOS DIFERENTES FACTORES DE COMPARACIÓN CONSIDERADOS

En el presente trabajo, el estudio estadístico fue establecido a partir de los valores de las concentraciones de Mg, Ca, Cu, Zn y Se determinados en sueros de los pacientes de CH y controles sanos, con la intención de determinar la existencia o no, de diferencias significativas para los distintos factores considerados (enfermedad, grado de severidad, sexo, grupo de edad, éxitus, trasplante y complicaciones) sobre dichas variables.

Para realizar dicho estudio estadístico, se empleó el programa SPSS 15.0 para Windows, del que se usó el test de la “t” de Student para los métodos paramétricos, con un nivel de significancia del 95% (P < 0,05) y el test de Kruskal-Wallis para los no paramétricos, con un nivel de significancia igual al anterior del 95% (P < 0,05).

Con el objeto de establecer las características de los resultados experimentales obtenidos para la variable de respuesta y previo a la aplicación

de un modelo paramétrico o no paramétrico para realizar el análisis de la varianza se comprobó:

- a. La normalidad de la distribución de datos por el test de Kolmogorov-Smirnov
- b. La homogeneidad en las varianzas por el test de Levene.

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

En el test de Kolmogorov-Smirnov (Tabla 17) se dedujo que el nivel de significancia para el Ca y Se era ($P < 0,05$), siendo para este caso necesaria la aplicación de un modelo no paramétrico de Kruskal-Wallis para el posterior análisis de la varianza. En los minerales restantes (Mg, Cu y Zn) el $P > 0,05$.

El test de Levene empleado para la medida de la homogeneidad de las varianzas, mostró que no existía homogeneidad ($P < 0,05$) para el caso del Zn y el Cu (Tabla 18) siendo para estos dos casos necesaria la aplicación de un test no paramétrico de Kruskal-Wallis al igual que para el Se.

TABLA 17. Prueba de Kolmogorov-Smirnov para los niveles de Ca, Mg, Zn, Cu y Se determinados en pacientes con CH y controles sanos.

		Ca (ppm)	Mg (ppm)	Zn (ppm)	Cu (ppm)	Se (ppb)
Parámetros Normales	Media	92,59	21,86	0,873	1,22	61,17
	Desviación Típica	16,79	3,62	0,185	0,301	20,73
Diferencias más extremas	Absoluta	0,112	0,082	0,068	0,096	0,138
	Positiva	0,075	0,082	0,068	0,096	0,138
	Negativa	-0,112	-0,082	-0,062	-0,059	-0,105
Z de Kolmogorov-Smirnov		1,184	0,856	0,755	1,063	1,58
Sig. asintót.(bilateral)		0,031 (P < 0,05)	0,456	0,618	0,208	0,014 P < 0,05)

TABLA 18. Prueba de homogeneidad de las varianzas. Mediante el test de Levene de las concentraciones de Ca, Mg, Zn, Cu y Se determinados en pacientes con CH y en los controles sanos.

PARÁMETRO	ESTADÍSTICO DE LEVENE	GL1	GL2	SIGNIFICANCIA (P)
Ca (ppm)	0,354	1	121	0,553
Mg (ppm)	2,43	1	121	0,122
Zn (ppm)	5,51	1	121	0,021 (P < 0,05)
Cu(ppm)	17,12	1	121	0,000 (P < 0,05)
Se (ppb)	0,345	1	121	0,558

III.4.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA VARIANZA

III.4.1.1. CONTRASTE DE LAS CONCENTRACIONES DE SELENIO, ZINC, COBRE, MAGNESIO Y CALCIO DE LOS CONTROLES SANOS FRENTE A LOS PACIENTES CON CH

Una vez realizados el test de Kolmogorov-Smirnov y el test de Levene en relación a la normalidad de la distribución de los resultados y la homogeneidad de las varianzas, respectivamente, se aplicó el análisis de la varianza correspondiente a los niveles séricos de los minerales estudiados en función de la presencia de la enfermedad, la CH, frente a los sujetos sanos mediante:

- Métodos paramétricos en el caso del Mg a través del test de la t de Student.
- Métodos no paramétricos para el Ca, Cu, Zn y Se mediante el test de Kruskal Wallis.

Para los niveles de Ca y Mg se obtuvieron unos niveles significativamente inferiores en los enfermos, con un P < 0,001 (Tabla 19). Este resultado indica que la cirrosis desequilibra el estrecho control homeostático

que el organismo ejerce sobre los niveles séricos de Ca y Mg, produciéndose en los enfermos un descenso significativo respecto a los controles sanos.

Para el Zn, el test de Kruskal Wallis dio un nivel de significancia de $P = 0,196$ (Tabla 15) mayor que 0,05; este resultado nos indica la no existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de Zn de controles y enfermos, lo cual puede apreciarse comparando las medias y desviaciones (Tabla 19).

En los niveles séricos de Cu el test de Kruskal-Wallis dio un valor de $P = 0,001$ (Tabla 19) que expresa que los niveles de Cu en el suero de los enfermos cirróticos son significativamente superiores ($1,263 \pm 0,3250$ en enfermos frente a $1,078 \pm 0,097$ ppm en adultos sanos).

Para el Se, el test de Kruskal – Wallis estableció con un nivel de significancia menor de 0,001 (Tabla 19), que los niveles séricos de Se en los individuos enfermos son significativamente inferiores ($57,6 \pm 20,0$ vs. $73,1 \pm 19,0$ ppb) (Tabla 19) .

TABLA 19. Nivel de significancia, tipo de test en análisis de la varianza y niveles medios \pm desviación estándar (DE) al comparar los niveles séricos medios de Mg, Ca, Cu, Zn y Se analizados en pacientes con CH frente a los determinados en adultos sanos usados como controles

ELEMENTO	P	TIPO DE TEST	PACIENTES		CONTROLES	
			n	MEDIA \pm DE	n	MEDIA \pm DE
Ca (ppm)	0,000	NP	93	87,7 \pm 14,84	30	109,6 \pm 11,19
Mg(ppm)	0,000	P	93	21,2 \pm 3,73	30	24,0 \pm 2,22
Zn (ppm)	0,196	NP	93	0,880 \pm 0,198	30	0,847 \pm 0,12
Cu (ppm)	0,001	NP	93	1,263 \pm 0,3250	30	1,078 \pm 0,097
Se (ppb)	0,000	NP	93	57,6 \pm 20,0	30	73,1 \pm 19,0

III.4.1.2. ANOVA DE LOS NIVELES DE SELENIO, ZINC, COBRE, MAGNESIO Y CALCIO EN ENFERMOS DE CH SEGÚN HAYAN SIDO SOMETIDOS A TRASPLANTE O NO

Según los datos reflejados en la tabla 17 (Test de Kolmogorov-Smirnov), comprobamos que el Ca y Se requieren de test de tipo no paramétrico. Sin embargo, el test de Levene sobre la homogeneidad de las varianzas arrojó un valor de $P > 0,05$ para todos los minerales, existiendo por lo tanto homogeneidad para todas los valores de todos los minerales.

Por tanto en el ANOVA de los niveles séricos de Mg, Cu y Zn en enfermos denota la no existencia de diferencias estadísticamente significativas en estos según haya habido o no trasplante en los enfermos.

Para realizar el ANOVA para los niveles de Ca y Se en suero de pacientes según hayan o no sido sometidos a trasplante, observamos que:

- Para el Se, los niveles en sujetos trasplantados resultaron ser significativamente inferiores (Tabla 20) ($P = 0,044$).
- Para el Ca, no se encontraron diferencias significativas según se hubiera realizado o no trasplante de hígado.

TABLA 20. Niveles séricos medios \pm DE y nivel de significancia para el Ca, Mg, Zn, Cu y Se medidos en enfermos con CH según hayan o no sido sometidos a un trasplante de hígado.

ELEMENTO	n	GRUPO	MEDIA \pm DE	P
Ca (ppm)	4	Trasplantados	96,04 \pm 19,36	0,265
	89	No Trasplantados	88,32 \pm 13,16	
Mg (ppm)	4	Trasplantados	23,14 \pm 1,76	0,312
	89	No Trasplantados	21,31 \pm 3,56	
Zn (ppm)	4	Trasplantados	0,74 \pm 0,16	0,084
	89	No Trasplantados	0,89 \pm 0,20	
Cu (ppm)	4	Trasplantados	1,18 \pm 0,26	0,485
	89	No Trasplantados	1,28 \pm 0,33	
Se (ppb)	4	Trasplantados	40,53 \pm 11,50	0,044
	89	No Trasplantados	57,63 \pm 18,47	

Resulta relevante que para los tres minerales relacionados con la regulación del estrés oxidativo (Cu, Zn y Se) los niveles séricos en los sujetos trasplantados es menor, aunque significativamente solo para el Se. A pesar de ello el bajo número de muestras séricas de pacientes que han recibido un trasplante limita la validez de este tipo de comparación.

III.4.3.1. ANOVA DE LOS NIVELES DE SELENIO, ZINC, COBRE, MAGNESIO Y CALCIO SEGÚN INFLUENCIA DE LA EDAD EN PACIENTES

III.4.1.3.1. Influencia del grupo de edad en los niveles séricos de minerales

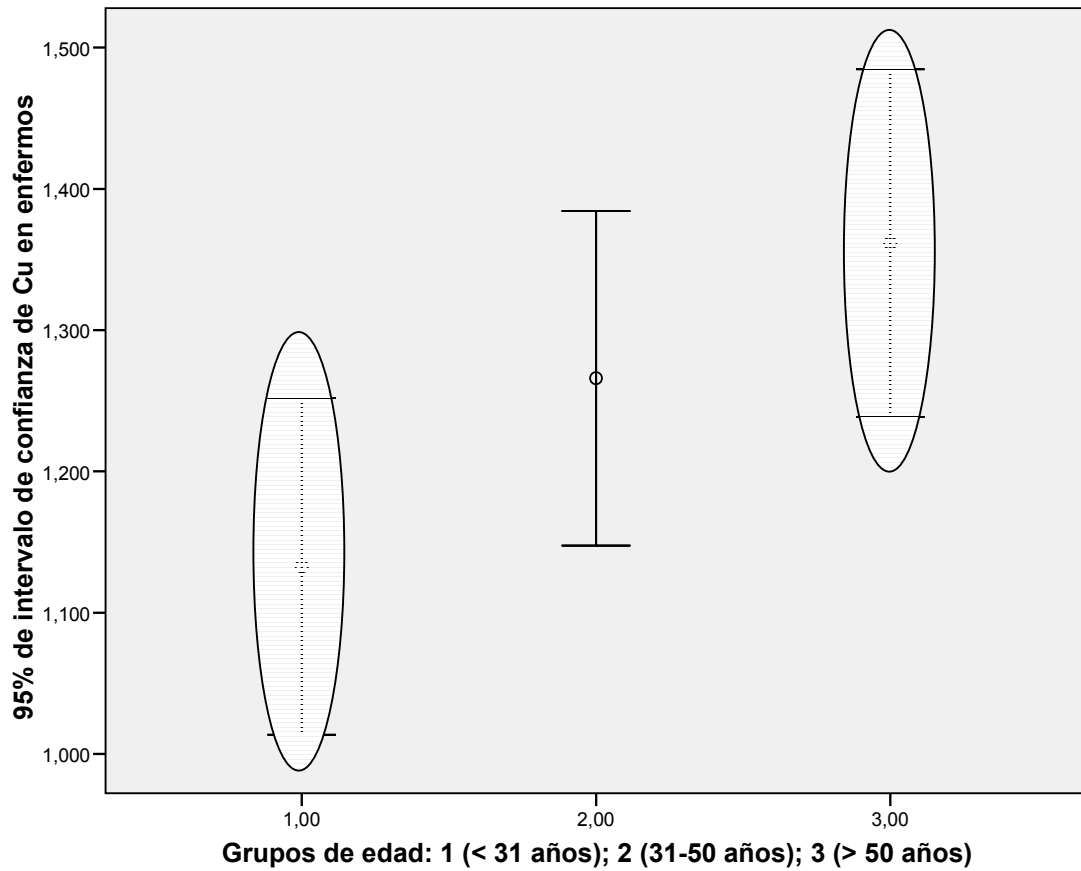
El Test de Kolmogorov Smirnov mostró que el Ca y Se (Tabla 17) requieren un test no paramétrico ya que no sigue una distribución normal. La homogeneidad de las varianzas se observó para los niveles de séricos de todos los minerales ensayados.

El ANOVA mostró la existencia de diferencias significativas en la concentración sérica de Se y Cu según el grupo de edad considerado (≥ 30 , 31- ≤ 50 , > 50 años) con un $P = 0,008$ y $P = 0,043$ (Tabla 21), respectivamente. Sin embargo, no se apreció esta influencia en el caso del resto de minerales estudiados (Mg, Ca y Zn). Concretamente se observó la existencia de niveles significativamente superiores de Cu en el grupo de más de 50 años respecto al grupo de ≥ 30 años (Figura 3).

TABLA 21. Niveles séricos medios \pm DE y nivel de significancia para el Ca, Mg, Zn, Cu y Se medidos en enfermos de CH según grupo de edad

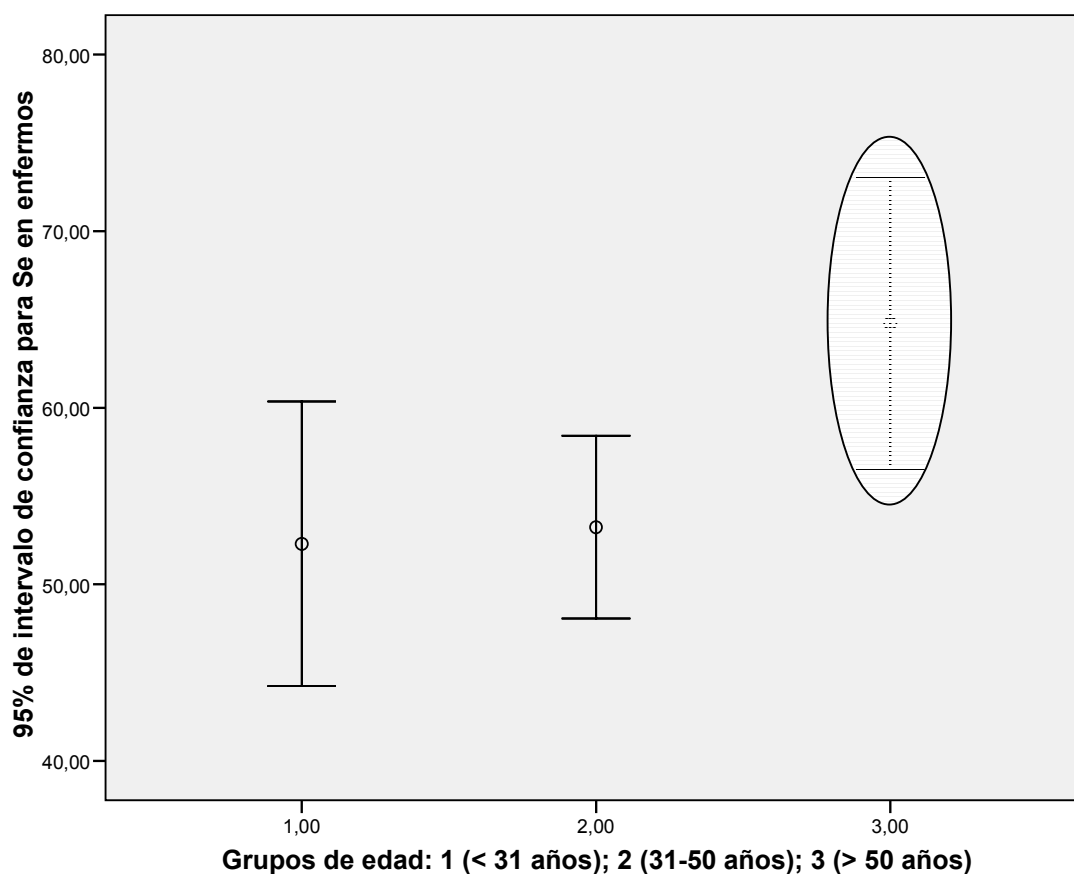
ELEMENTO	<i>n</i>	GRUPO EDAD	MEDIA \pm DE	P
Zn (ppb)	23	≥ 30	$0,865 \pm 0,22$	0,704
	38	31- \leq 50	$0,862 \pm 0,167$	
	32	> 50	$0,903 \pm 0,234$	
Cu (ppm)	23	≥ 30	$1,13 \pm 0,28$	0,043
	38	31- \leq 50	$1,27 \pm 0,34$	
	32	> 50	$1,36 \pm 0,32$	
Se (ppb)	23	≥ 30	36,93	0,008
	38	31- \leq 50	40,62	
	32	> 50	56,98	
Ca (ppm)	23	≥ 30	44,59	0,621
	38	31- \leq 50	39,23	
	32	> 50	38,60	
Mg (ppm)	23	≥ 30	$21,24 \pm 2,70$	0,951
	38	31- \leq 50	$20,99 \pm 2,84$	
	32	> 50	$20,96 \pm 3,93$	

FIGURA 3. Representación por diagramas de barras de los niveles séricos de Cu en sus intervalos de confianza al 95% en pacientes con CH según el grupo de edad considerado (≥ 30 , $31- \leq 50$, > 50 años)



En el caso del Se tras realizar el test de Kruskal-Wallis, tal y como podemos apreciar en la Figura 4, se encontró que los niveles séricos en pacientes con CH con edad superior a 50 años fueron significativamente superiores a los de los otros 2 grupos de edad considerados.

FIGURA 4. Representación por diagramas de barras de los niveles séricos de Se en sus intervalos de confianza al 95% en pacientes con CH según el grupo de edad considerado (≥ 30 , $31- \leq 50$, > 50 años)



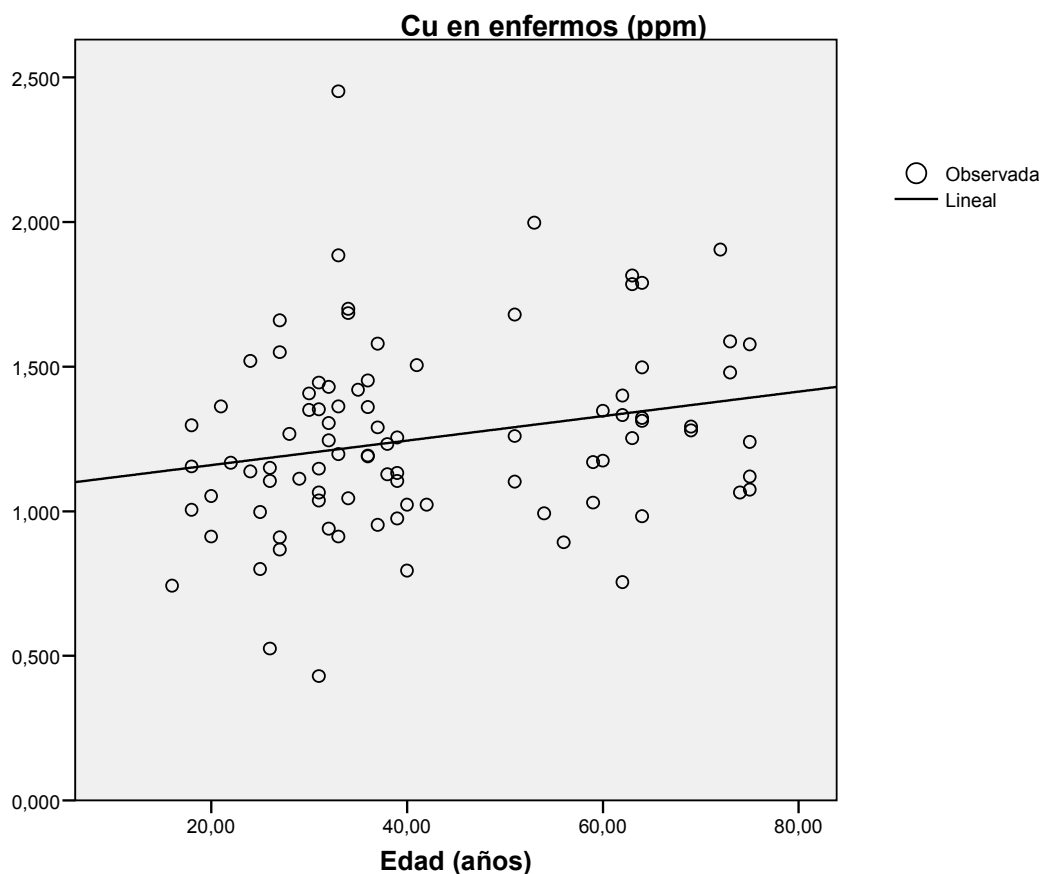
III.4.1.3.2. Análisis de regresión entre la edad de los enfermos y los niveles séricos de minerales

El test de Kolmogorov-Smirnov para la variable edad, manifestó que no hay distribución normal de los resultados para el Ca ($P = 0,031$) y el Se ($P = 0,017$), motivo por el cual el análisis de regresión lineal entre las concentraciones séricas de dichos minerales y la edad de los enfermos se realizó mediante el test de Spearman.

En el caso del Cu y Se, las concentraciones séricas están estadísticamente correlacionadas con la edad de los pacientes; concretamente el Cu está correlacionado linealmente con la edad que sigue la siguiente

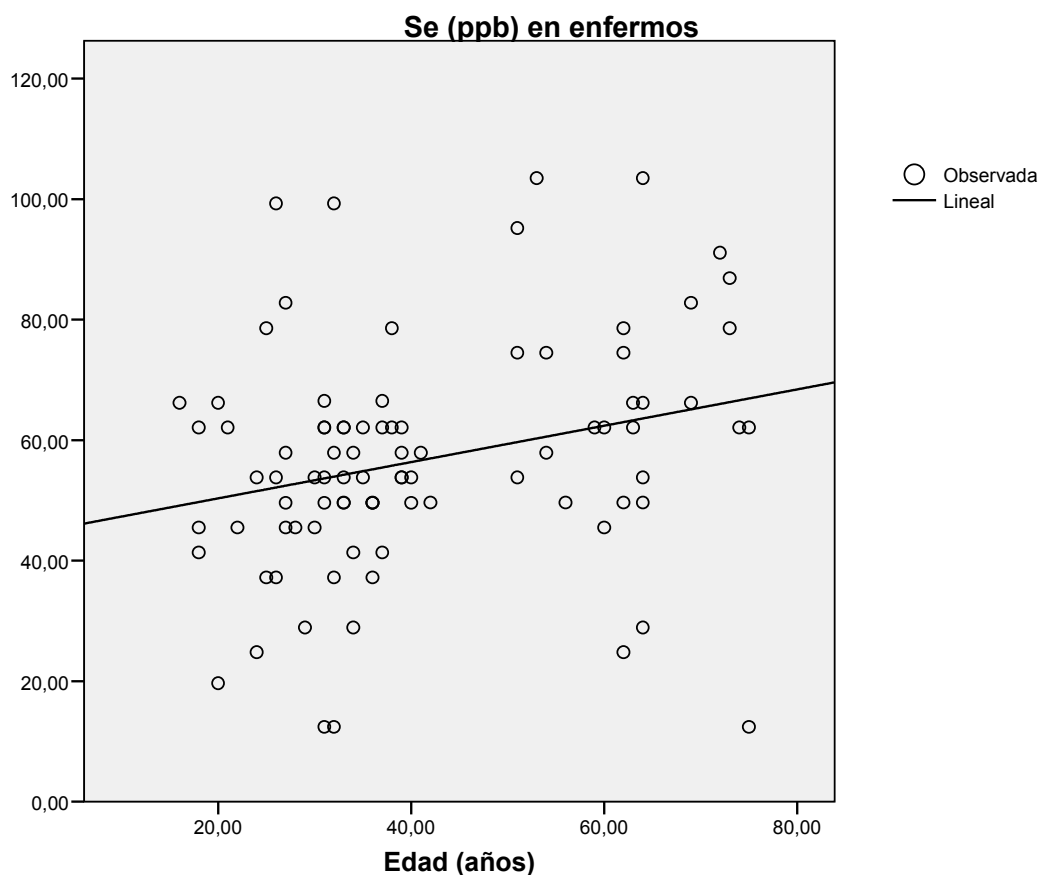
fórmula con un coeficiente de correlación ($r= 0,226$) y una ecuación de recta (Edad, años) = $1,075 + 0,04 \times [\text{Cu, ppm}]$ (Figura 5).

FIGURA 5. Representación gráfica de la correlación lineal existente entre los niveles séricos de Cu (ppm) y la edad de enfermos con CH



Igualmente para el Se se encontró la existencia de un correlación lineal estadísticamente significativa con la edad; el coeficiente de correlación obtenido ($r= 0,260$) y la ecuación de recta (edad, años)= $44,297 + 0,302 \times [\text{Se ppb}]$ (Figura 6).

FIGURA 6. Representación gráfica de la correlación lineal existente entre los niveles séricos de Se (ppb) y la edad de enfermos con CH.



III.4.1.4. COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE SELENIO, ZINC, COBRE, MAGNESIO Y CALCIO SEGÚN EL SEXO EN PACIENTES

El Test de Kolmogorov Smirnov mostró que el Ca y Se (Tabla 17) requieren test no paramétricos ya que no siguen una distribución normal de los resultados. El Test de Levene manifestó la existencia de homogeneidad de varianzas en todos los minerales.

El resultado de los test paramétricos para los casos del Mg, Ca, Zn y Cu reveló que el sexo no influye significativamente en su nivel sérico, ni en los pacientes ni en los controles sanos ($P > 0,05$). Es de reseñar que en el caso del Cu, el valor de P obtenido ($P = 0,074$), manifiesta la existencia de una tendencia a la significancia, concretamente expresa que los niveles séricos de

este mineral en las mujeres tienden a ser estadísticamente superiores (Tabla 22).

El test de Kruskal-Wallis realizado para los niveles del Se mostró que eran significativamente superiores en los pacientes de sexo masculino. Sin embargo, para el Ca no se apreció la existencia de influencia del sexo de los sujetos en las concentraciones séricas de este elemento.

TABLA 22. Niveles séricos medios \pm DE y nivel de significancia para el Ca, Mg, Zn, Cu y Se medidos en enfermos de CH según el sexo

ELEMENTO	<i>n</i>	SEXO	MEDIA \pm DE	SIGNIFICANCIA
Se (ppb)	54	H	59,94 \pm 19,97	0,029
	39	M	52,16 \pm 15,47	
Ca (ppm)	54	H	87,58 \pm 11,69	0,556
	39	M	90,27 \pm 15,70	
Mg (ppm)	54	H	21,50 \pm 3,02	0,747
	39	M	21,24 \pm 4,20	
Zn (ppm)	54	H	0,905 \pm 0,208	0,305
	39	M	0,862 \pm 0,180	
Cu (ppm)	54	H	1,225 \pm 0,317	0,074
	39	M	1,349 \pm 0,327	

III.4.1.5. COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE SELENIO, ZINC, COBRE, MAGNESIO Y CALCIO SEGÚN INFLUENCIA DEL EXITUS (MUERTE) DE PACIENTES

El Test de Kolmogorov Smirnov mostró que el Ca y Se (Tabla 17) requieren test no paramétricos ya que no siguen una distribución normal. El

Test de Levene manifestó la existencia de homogeneidad de varianzas en todos los minerales.

El análisis de la varianza mediante el test paramétrico del test de la t de Student reveló un valor para el Zn de $P = 0,002$, lo que denota que el nivel sérico de este mineral es significativamente más alto en pacientes que han alcanzado el éxito.

la pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis realizadas demostraron que para el Se sus niveles séricos resultaron ser significativamente mayores en pacientes que habían alcanzado el éxito; por el contrario los niveles séricos de Ca resultaron ser estadísticamente más bajos en los pacientes que habían fallecido ($P < 0,05$) (Tabla 23).

TABLA 23. Niveles séricos medios \pm DE y nivel de significancia para el Ca, Mg, Zn, Cu y Se medidos en enfermos de CH según el éxito

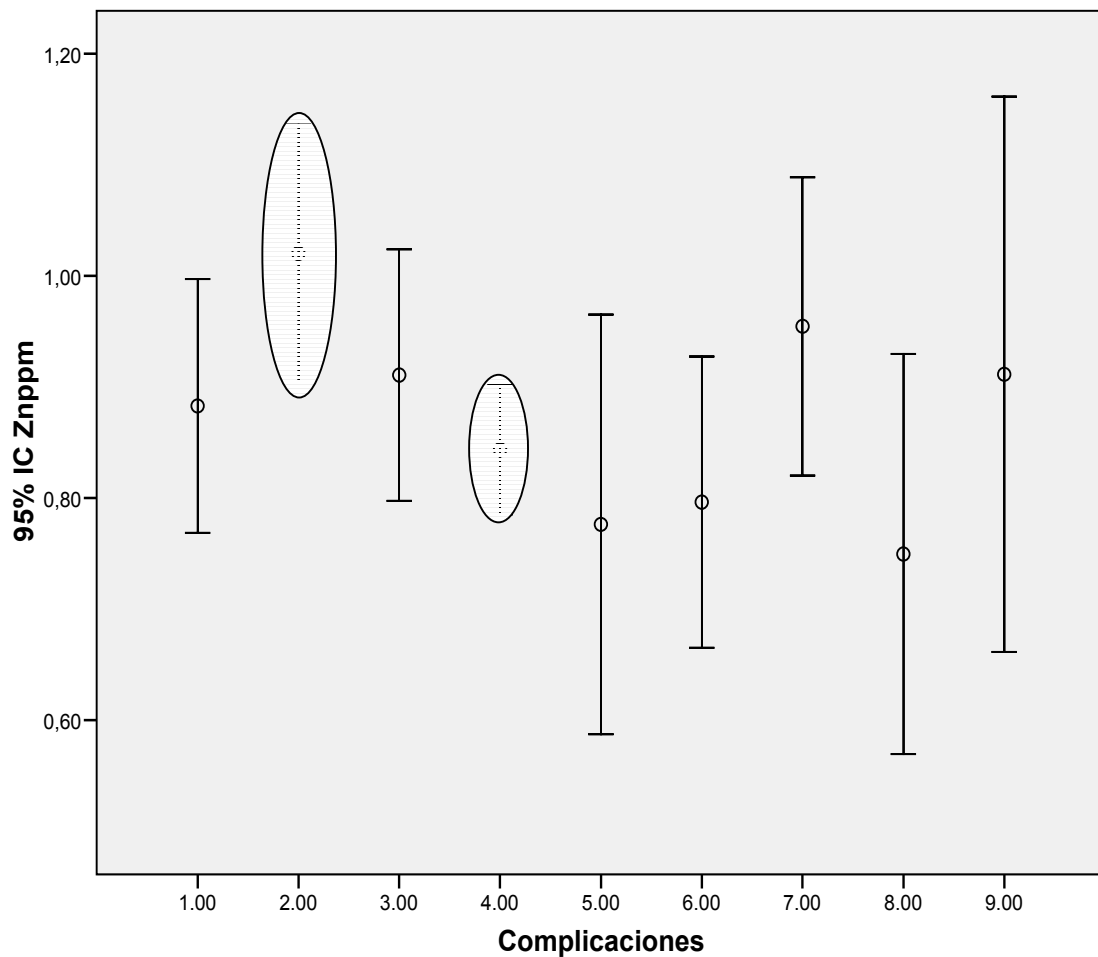
ELEMENTO	<i>n</i>	ÉXITUS	MEDIA \pm DE	SIGNIFICANCIA
Se (ppb)	43	Si	60,05 \pm 18,45	0,041
	47	No	53,41 \pm 18,38	
Ca (ppm)	41	Si	84,82 \pm 13,63	0,025
	44	No	92,28 \pm 12,39	
Mg (ppm)	37	Si	20,97 \pm 4,27	0,295
	42	No	21,81 \pm 2,71	
Zn (ppm)	43	Si	0,955 \pm 0,205	0,002
	48	No	0,826 \pm 0,171	
Cu (ppm)	43	Si	1,274 \pm 0,300	0,955
	48	No	1,278 \pm 0,352	

III.4.1.6. COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE SELENIO, ZINC, COBRE, MAGNESIO Y CALCIO SEGÚN INFLUENCIA DE LAS COMPLICACIONES EN PACIENTES

El Test de Kolmogorov Smirnov mostró que el Ca y Se (Tabla 17) requieren test no paramétricos ya que no siguen sus valores una distribución normal. En cuanto al Test de Levene, éste manifestó la existencia de homogeneidad de varianzas en todos los minerales.

Para el Mg, Cu, Ca y Se no se encontró influencia alguna en los niveles séricos según el tipo de complicación presentada por los pacientes. Sin embargo en el caso del Zn, se detectó una variación significativa en los pacientes con ascitis en comparación a los que presentaban la complicación de bacteremia-sepsis en el pasado, tal y como puede observarse tras la aplicación del test de rango múltiple (Figura 7).

FIGURA 7. Representación por diagramas de barras de los niveles séricos de Zn en sus intervalos de confianza al 95% en pacientes con CH según las complicaciones asociadas a la patología [en el pasado: HDA (varices)(1), ascitis(2), encefalopatía(3), bacteriemia-sepsis(4); en el ingreso actual: HDA (varices) (1), ascitis (2), encefalopatía (3), bacteriemia-sepsis(4)]



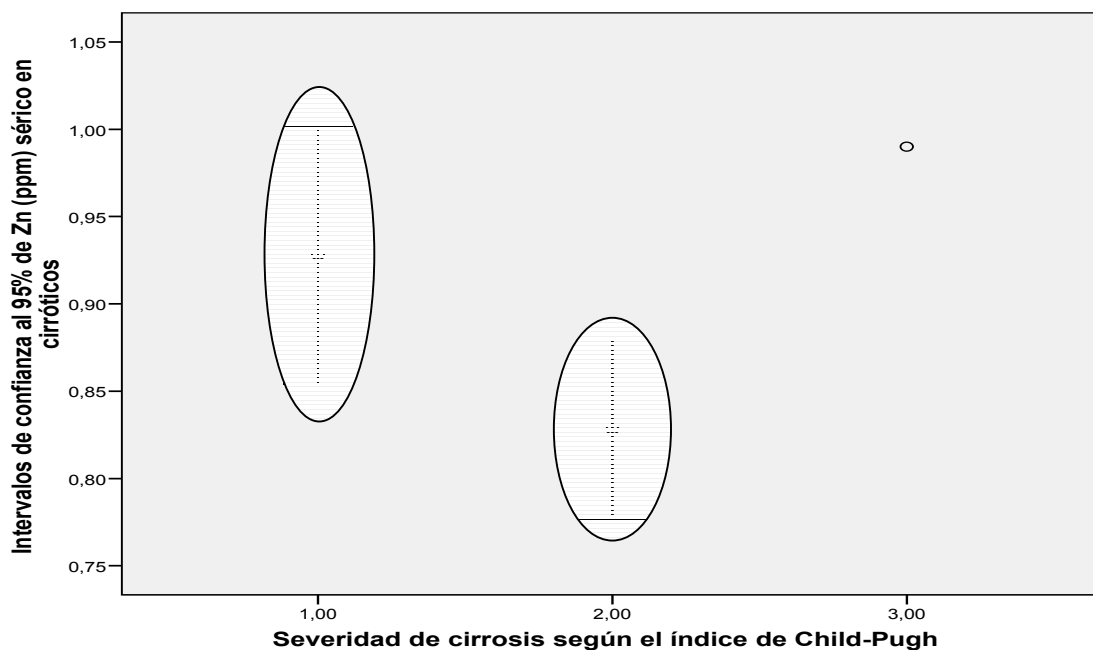
III.4.1.7. COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE MINERALES SEGÚN SEVERIDAD DE LA PATOLOGÍA EN PACIENTES CON CIRROSIS ESTIMADA POR EL ÍNDICE CHILD-PUGH

III.4.1.7.1 Comparación de los niveles de minerales según severidad de la patología en pacientes con cirrosis estimada por el índice Child-Pugh

El Test de Kolmogorov Smirnov mostró que sólo para los niveles séricos de Ca y Se no se sigue una distribución normal de los resultados. El Test de Levene manifestó la existencia de homogeneidad de varianzas en todos los minerales analizados dependiendo del grado de severidad de la patología ($P > 0.05$). Como consecuencia sólo para el Mg, Cu y Zn se aplicó el test de la t de Student.

En el análisis de la influencia del grado de severidad en los niveles séricos de Zn por el test de la t de Student se determinó un valor de significancia de $P = 0,068$, que demuestra la clara tendencia a la existencia de diferencias estadísticamente significativas, tal y como viene recogido en la figura 8, que manifiesta que los sujetos con mayor índice de severidad cirrótica (Child-Pugh 2) tienen tendencia a disminuir significativamente los niveles de Zn sérico.

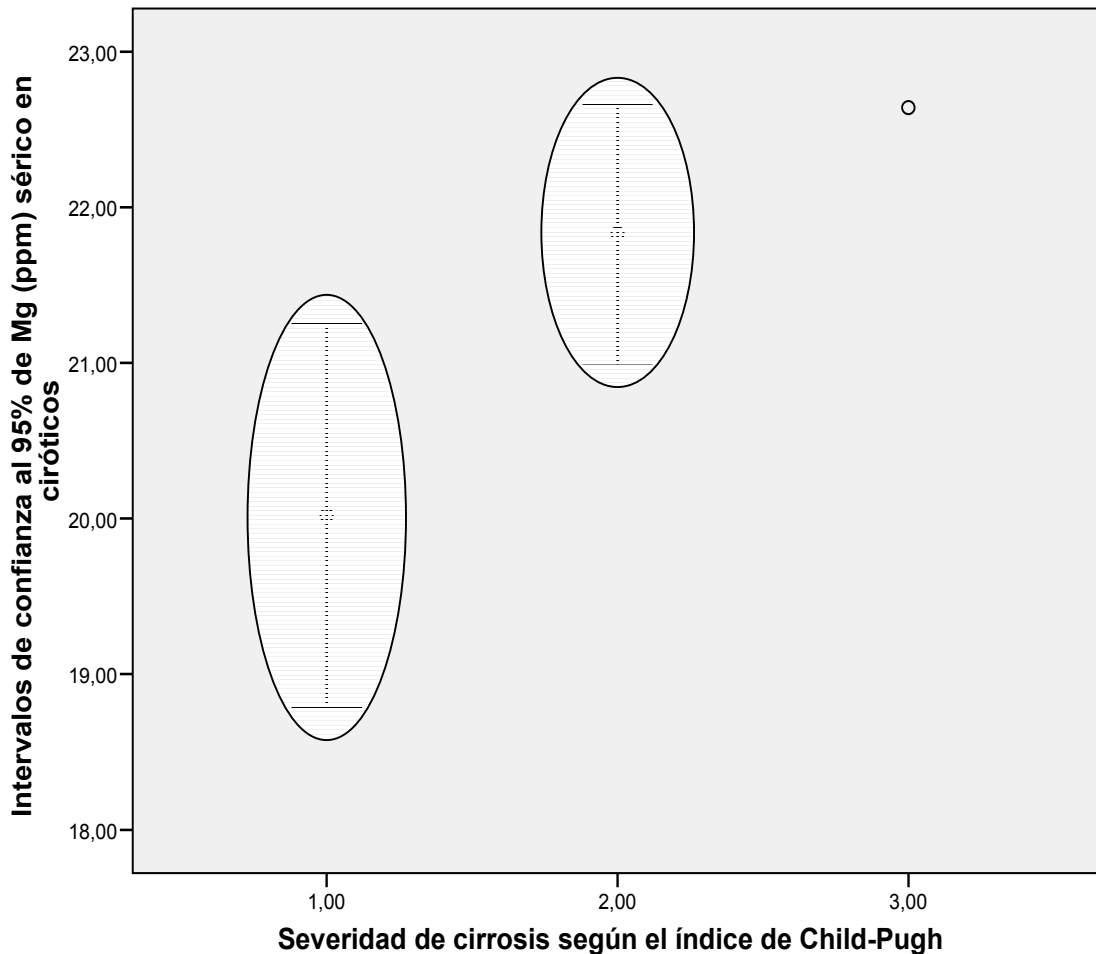
FIGURA 8. Distribución por barras de error de los niveles de Zn (ppm) y sus intervalos de confianza del 95% en enfermos cirróticos dependiendo del grado de severidad de la patología



Para el Cu, el análisis de la influencia del grado de severidad en sus niveles séricos dio un valor de significancia de $P = 0,853$, que demuestra la no existencia de diferencias estadísticamente significativas.

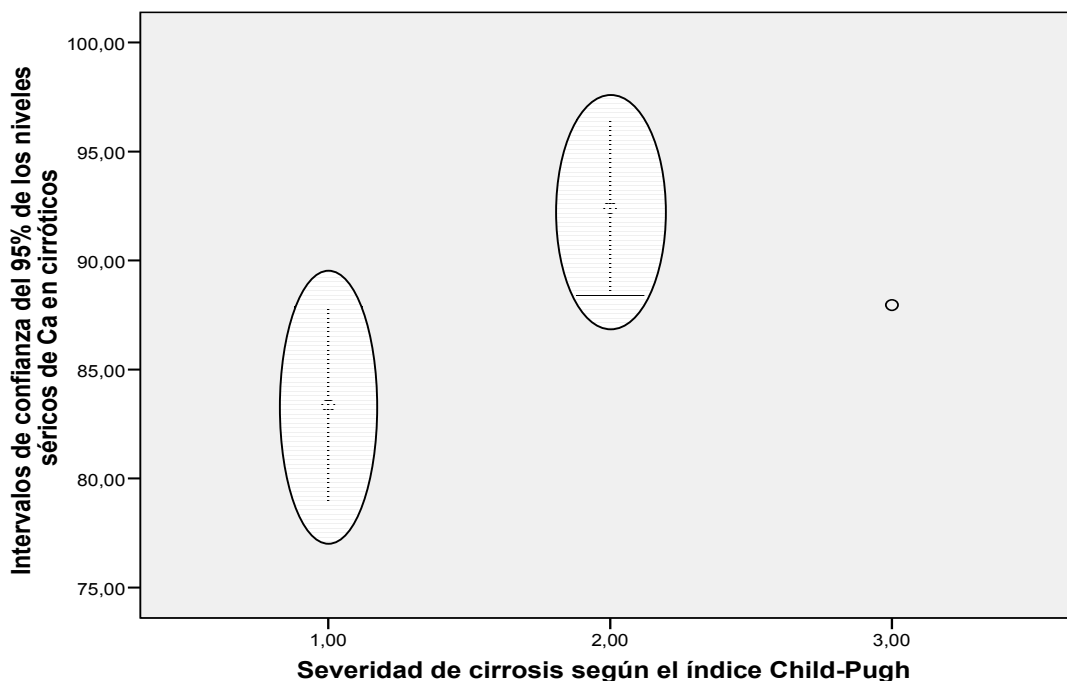
En el caso del Mg, el análisis de la influencia del grado de severidad en sus niveles séricos dió un valor de significancia de $p = 0,040$, que expresa que los sujetos con mayor índice de severidad cirrótica (Child-Pugh 2) tienen niveles significativamente menores de Mg sérico (Figura 9).

FIGURA 9. Distribución por barras de error de los niveles de Mg (ppm) y sus intervalos de confianza del 95% en enfermos cirróticos dependiendo del grado de severidad de la patología



Para el Se y Ca se realizó el test no paramétrico de Kruskal Wallis resultando una $P = 0,131$ para el Se y de $P = 0,014$ para el Ca, indicando que si bien para el Se no existen diferencias estadísticamente significativas en los cambios en su concentración de acuerdo con la severidad de la cirrosis, no ocurre así para el Ca, donde encontramos que los pacientes cirróticos con mayor grado de severidad tienen unos niveles de Ca en suero significativamente más elevados (Figura 10).

FIGURA 10. Distribución por barras de error de los niveles de Ca (ppm) y sus intervalos de confianza del 95% en enfermos cirróticos dependiendo del grado de severidad de la patología.

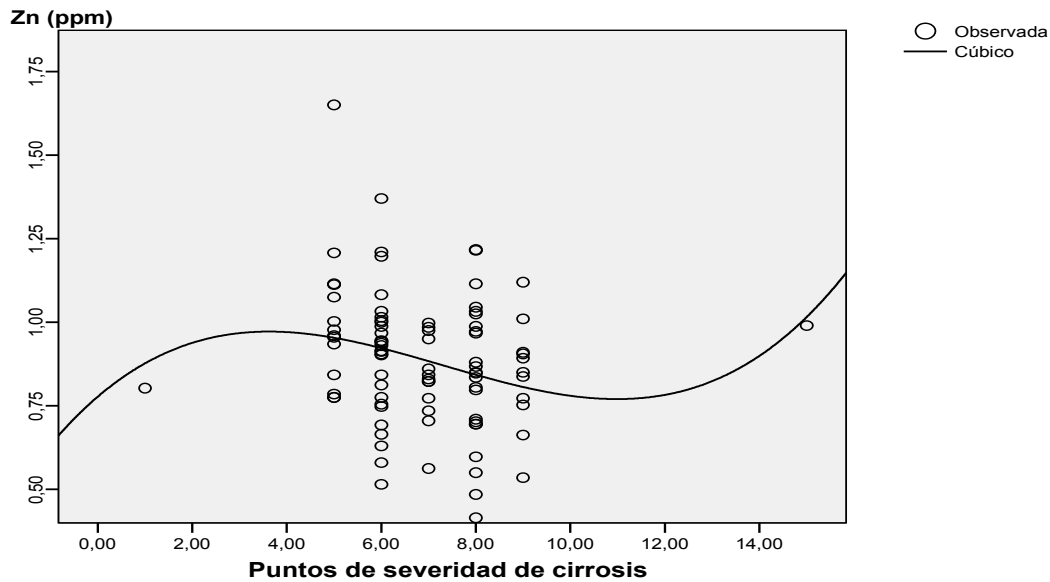


III.4.1.7.2. Análisis de regresión entre la severidad de la cirrosis y los niveles séricos de minerales

Al realizar el análisis de regresión curvilínea de las concentraciones de Zn (ppm) en suero de pacientes con cirrosis con los valores del índice Child-Pugh se obtuvo un coeficiente de correlación $r = 0,257$ (Figura 11) y un nivel de significancia de $P = 0,109$, manifestando la existencia de correlación cúbica no estadísticamente significativa cuya ecuación de recta es la siguiente:

$$[Zn] \text{ ppm} = 0,777 + 0,121 \times (\text{índice de Child-Pugh}) - 0,022 \times (\text{índice de Child-Pugh})^2 + 0,001 \times (\text{índice de Child-Pugh})^3$$

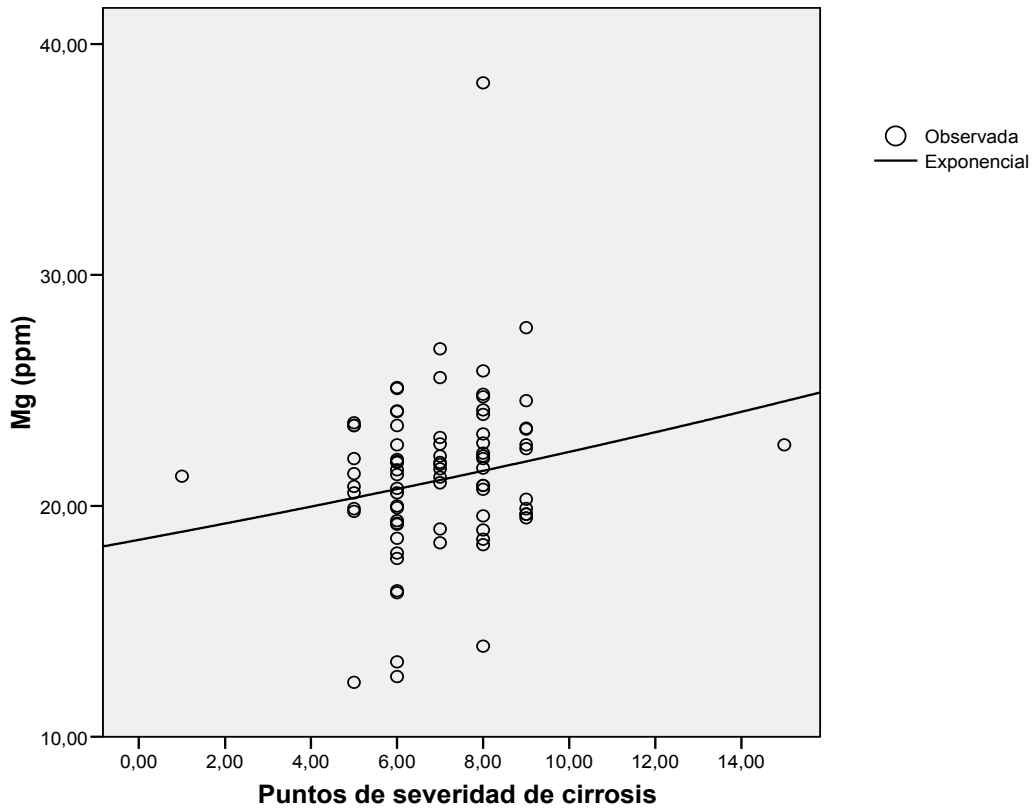
FIGURA 11. Análisis de regresión curvilínea (cúbica) entre los niveles de Zn (ppm) en sujetos con cirrosis y el índice de severidad Child-Pugh estimado



En el análisis de regresión de los niveles séricos de Mg con los valores del índice Child-Pugh se obtiene un valor de significancia de $p= 0,090$ y un coeficiente de correlación $r= 0,191$, lo que manifiesta una tendencia al aumento de la concentración sérica de Mg al elevarse el valor de severidad (Figura 12). La ecuación exponencial resultante de este análisis es:

$$\text{Ln [Mg] ppm} = 18,529 + 0,019 \times (\text{Índice de Child Pugh})$$

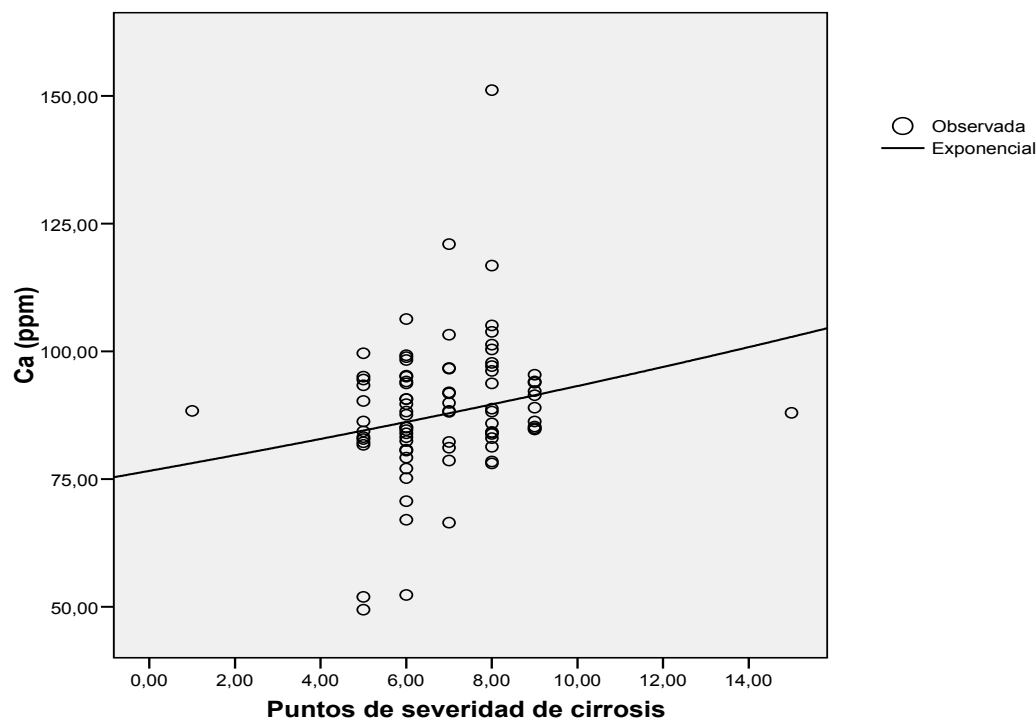
FIGURA 12. Análisis de regresión curvilínea (exponencial) entre los niveles de Mg (ppm) en sujetos con cirrosis y el índice de severidad Child-Pugh estimado



En el análisis de regresión de los niveles séricos de Ca con los valores del índice Child-Pugh se obtiene una tendencia al aumento al obtenerse una significancia de $P = 0,052$ y un coeficiente de correlación $r = 0,211$ (Figura 13), siendo la ecuación de la recta de regresión exponencial:

$$\ln [\text{Ca}] \text{ ppm} = 76,596 + 0,020 \times (\text{índice de Child-Pugh})$$

FIGURA 13. Análisis de regresión curvilínea (exponencial) entre los niveles de Ca (ppm) en sujetos con cirrosis y el índice de severidad Child-Pugh estimado



En el análisis de regresión curvilínea de las concentraciones entre los valores de Cu (ppm) en suero de pacientes con cirrosis y los del índice Child-Pugh se obtuvo un coeficiente de correlación $r = 0,115$ y un nivel de significancia de $P = 0,277$, manifestando la existencia de una correlación inversa no estadísticamente significativa cuya ecuación es la referida a continuación:

$$[Ca] \text{ ppm} = 1,215 + 0,398 \times 1/(\text{índice de Child-Pugh})$$

Para el Se, en el análisis de regresión lineal curvilínea de sus concentraciones séricas con los valores del índice Child-Pugh en cirróticos se determinó un coeficiente de correlación $r = 0,118$ y un nivel de significancia de $p = 0,265$, manifestando la no existencia de una correlación estadísticamente significativa. La ecuación de la recta correspondiente se indica a continuación:

$$[Se] \text{ ppb} = 55,758 - 1,311 \times (\text{índice de Child-Pugh})$$

III.4.2. ANÁLISIS DE REGRESIÓN ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE LOS DIFERENTES MINERALES ANALIZADOS (Mg, Ca, Cu, Zn y Se) EN LOS PACIENTES CIRRÓTICOS

Para los niveles séricos de Zn, Cu y Mg la regresión empleada fue de tipo lineal. El tipo de correlación usada fue la de Pearson, al comprobarse la existencia de una distribución normal para las concentraciones séricas de estos tres minerales. Como se aprecia en la tabla 24, no existe correlación lineal estadísticamente significativa entre los tres minerales indicados.

TABLA 24. Correlación lineal de Pearson entre los niveles séricos de Zn-Cu-Mg

ELEMENTOS	CORREALCIÓN	Mg, ppm	Zn, ppm	Cu, ppm
Mg, ppm	Pearson	1,000	0,182	0,115
	Sig. (bilateral)	-	0,102	0,302
	<i>n</i>	93	93	93
Zn, ppm	Pearson	0,182	1	-0,016
	Sig. (bilateral)	0,102	-	0,875
	<i>n</i>	93	93	93
Cu, ppm	Pearson	0,115	-0,016	1
	Sig. (bilateral)	0,302	0,875	-
	<i>n</i>	93	93	93

Para la correlación del Se y el Ca, al comprobarse la no existencia de distribución normal de los resultados por el test de Kolmogorov-Smirnoff, el análisis de regresión utilizado fue el de la estimación curvilínea. En cada caso se utilizó el modelo para el que se obtuvo un valor de *r* (Coeficiente de Correlación) y de *r*² más elevado, como se aprecia en la tabla 25.

TABLA 25. Análisis de regresión y niveles de significancia por estimación curvilínea de los niveles séricos en enfermos cirróticos de Ca-Se-Zn-Cu-Mg

MINERAL	CORRELAC. / P	Mg (ppm)	Zn (ppm)	Cu (ppm)	Ca (ppm)	Se (ppm)
Mg (ppm)	r	1,000	0,182	0,115	0,861**	0,292*
	r ²	1,000	0,011	0,000	0,742	0,085
	Sig. (bilateral)	-	0,102	0,302	0,000	0,028
Zn (ppm)	r	0,182	1,000	-0,016	-0,005	0,592**
	r ²	0,011	1,000	0,000	0,004	0,350
	Sig. (bilateral)	0,102		0,875	0,083	0,000
Cu (ppm)	r	0,115	-0,016	1,000	0,187	0,164
	r ²	0,000	0,000	1,000	0,035	0,004
	Sig. (bilateral)	0,302	0,875		0,083	0,111
Ca (ppm)	r	0,861**	-0,005	0,187	1,000	0,380*
	r ²	0,742	0,004	0,035	1,000	0,144
	Sig. (bilateral)	0,000	0,966	0,083		0,005
Se (ppm)	r	0,292*	0,592**	0,164	0,380*	1,000
	r ²	0,085	0,350	0,004	0,144	1,000
	Sig. (bilateral)	0,008	0,000	0,111	0,005	

* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

En las figuras siguientes (Figura 14, 15, 16 y 17) se incluyen las representaciones gráficas, con el modelo curvilíneo correspondiente, entre los niveles séricos de los minerales analizados en pacientes cirróticos para los que se obtuvo una correlación estadísticamente significativa ($P < 0,05$).

FIGURA 14. Representación gráfica del análisis de regresión según el modelo tipo S de estimación curvilínea entre los niveles séricos de Ca y Mg en enfermos, con un $r = 0,861$ y $r^2 = 0,742$ ($P = 0,000$) y una ecuación de recta ($\ln [Ca] \text{ ppm} = 5,190 - 15,021 \times 1/[Mg] \text{ ppm}$)

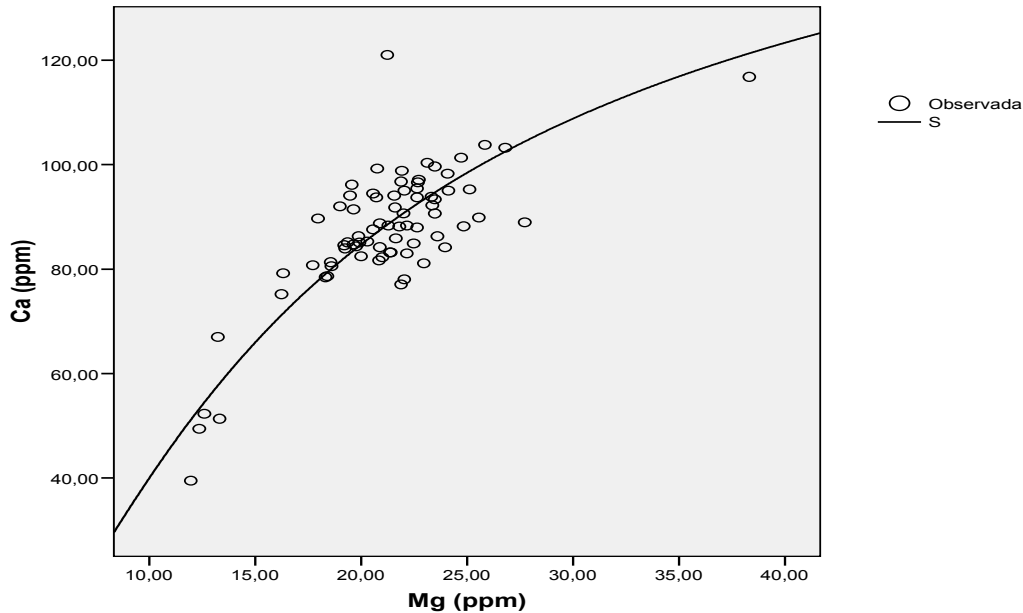


FIGURA 15. Representación gráfica del análisis de regresión según el modelo tipo S de estimación curvilínea entre los niveles séricos de Se y Zn en enfermos, con un $r = 0,592$ y $r^2 = 0,350$ ($p = 0,000$) y una ecuación de recta ($\ln [Se] \text{ ppb} = 4,893 - 0,776 \times 1/[Zn] \text{ ppm}$)

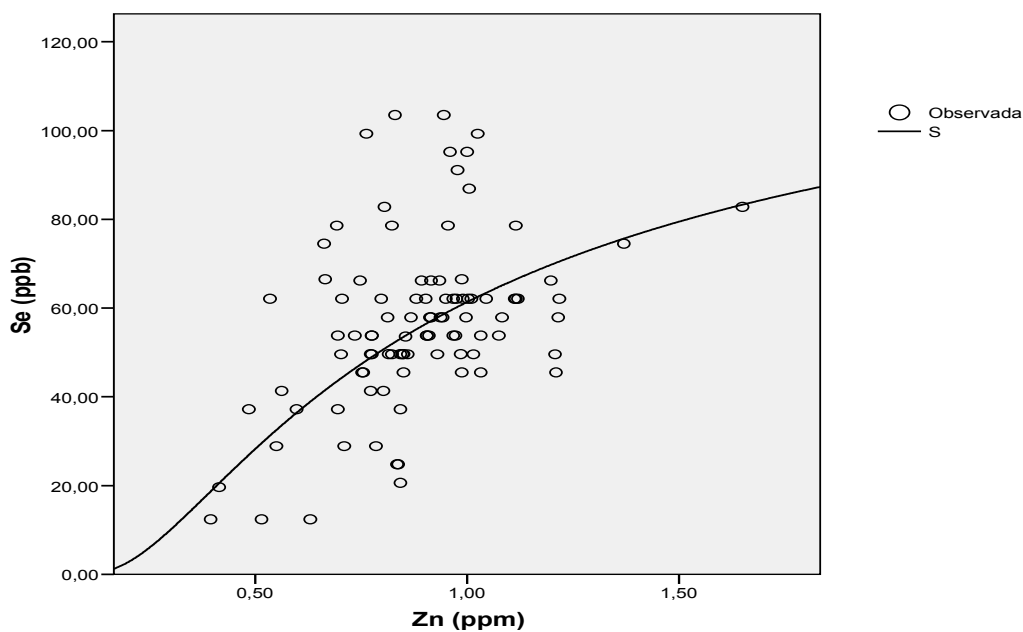


FIGURA 16. Representación gráfica del análisis de regresión según el modelo tipo Potencia de estimación curvilínea entre los niveles sericos de Se y Mg en enfermos, con un $r = 0,292$ y $r^2 = 0,085$ ($p = 0,008$) y una ecuación de recta $(\ln [\text{Se}] \text{ ppb} = 6,953 + 0,663 \times \ln [\text{Mg}] \text{ ppm},$

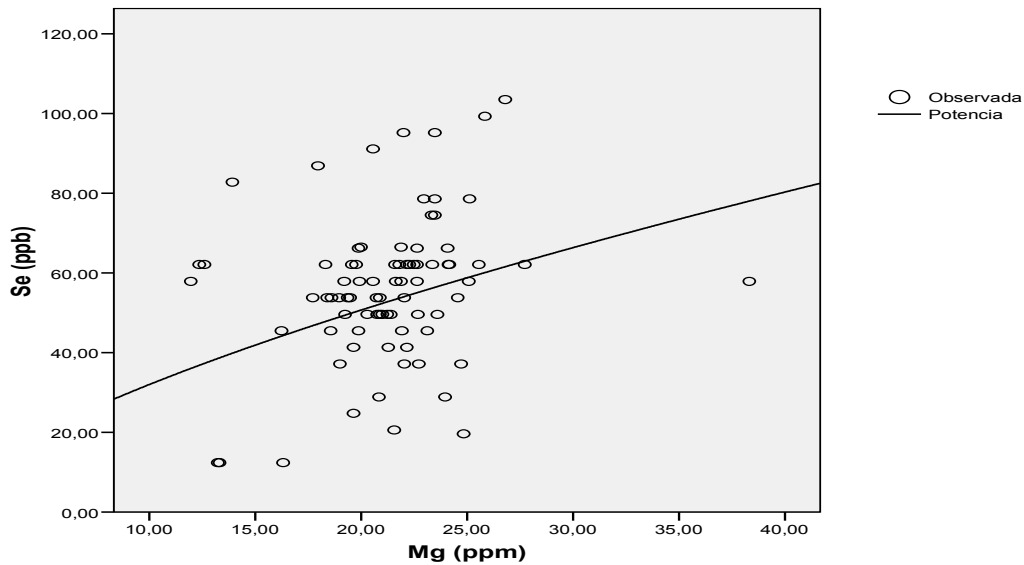
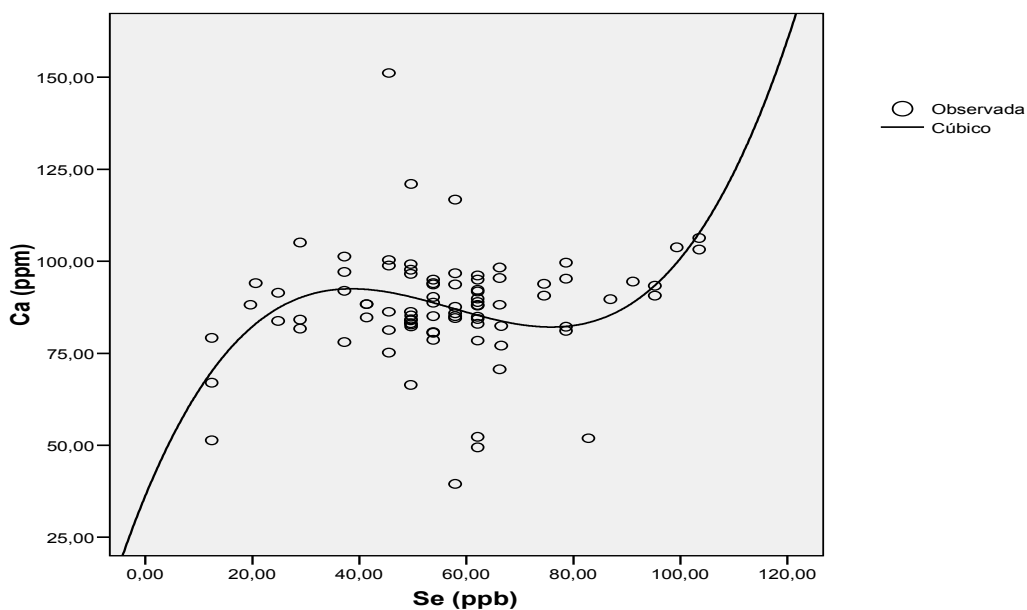


FIGURA 17. Representación gráfica del análisis de regresión según el modelo tipo Cúbico de estimación curvilínea entre los niveles séricos de Ca y Se en enfermos, con un $r = 0,380$ y $r^2 = 0,144$ ($p = 0,005$) y una ecuación de recta $([\text{Ca}] \text{ ppm} = 36,306 + 3,513 \times [\text{Se}, \text{ ppb}] - 0,069 \times [\text{Se}, \text{ ppb}]^2 + 0 \times [\text{Se}, \text{ ppb}]^3).$



IV. DISCUSIÓN

IV.1. SELENIO

Las concentraciones medias de Se sérico de los pacientes cirróticos y los correspondientes al grupo control se muestran en la tabla 19. Como puede apreciarse los niveles de Se sérico fueron significativamente más bajos ($P < .001$) en pacientes cirróticos que en los controles sanos, lo cual se corresponde con la mayoría de los estudios realizados con anterioridad a este respecto (Zhang y col., 2007); así mismo se han obtenido resultados similares en estudios recientes, como el realizado en casos de niños con cirrosis hepática por Uslu y col. (2010), en el que se halló la concentración sérica de Se en los pacientes significativamente más baja que en los controles ($42,4 \pm 8,2 \mu\text{g/L}$ vs. $64,4 \pm 16,9 \mu\text{g/L}$, $P < 0,005$). También ha sido previamente descrito en pacientes con diferentes tipos de hepatopatía (Burk y col., 1998, 2005; Rai y col., 2001; Navarro-Alarcon y col., 2002, 2008; Pemberton y col., 2005; Zhang y col., 2007; Gonzalez-Reimers y col., 2008; Pérez y col., 2011). Un grupo de investigación encontró niveles de antioxidantes significativamente reducidos, incluyendo el Se, en cirróticos alcohólicos al compararlos con un grupo de controles sanos del mismo sexo, describiendo una relación significativa entre la cirrosis y el estrés oxidativo. Otro grupo de investigadores (Gonzalez-Reimers y col., 2008), que también encontró niveles significativamente reducidos de Se sérico en enfermos frente al grupo de los sujetos controles así como al de los no cirróticos, concluyó que el desequilibrio en el estado nutricional característico de estos pacientes constituía el factor de predicción más potente de bajos niveles de Se en alcohólicos.

El Se es un mineral que juega un importante papel antioxidante en varias reacciones bioquímicas al actuar como cofactor de la GSH-Px (Navarro-Alarcón y López Martínez, 2000; Krittaphol y col., 2006; Navarro-Alarcón y Cabrera-Vique 2008; Zulet y col. 2009). Esta enzima actúa contra la aparición y progreso de eventos productores de daño hepático, mediante la protección de las células frente a la formación de radicales libres desde iones hidroperóxido. Un estudio reciente ha puesto de manifiesto que la suplementación con Se a pacientes cirróticos no restituía los niveles séricos normales de Se ni la

actividad de la glutatión peroxidasa (Zhang y col., 2007). Este hallazgo puede estar relacionado con el hecho de que los niveles plasmáticos de Se requieren meses para volver a los niveles normales en casos de malnutrición energético-proteica, tras una rehabilitación nutricional. En cualquier caso, se han realizado pocos ensayos en humanos relativos al valor profiláctico del Se contra los procesos implicados en la cirrosis. Un estudio realizado en animales de experimentación como las ratas (Ozardali y col., 2004) mostró que el Se podría jugar un importante papel en la prevención del daño hepático celular producido por el tetracloruro de carbono. Otros investigadores (Shilo y col., 2008) hallaron que la suplementación con Se incrementaba en el hígado la expresión de la enzima superóxido-dismutasa mitocondrial dependiente del manganeso en ratas, aumentando sus defensas antioxidantes, y por consiguiente reforzando los efectos antiinflamatorios y hepatoprotectores que se atribuyen a este mineral.

En el presente trabajo, también se estudió la significancia estadística en la variación de las concentraciones de minerales según los pacientes hubieran sido sometidos o no a transplante hepático. Sin embargo en este factor debemos tener en consideración el escaso número de transplantados (4) con los que ha contado el estudio. Para el caso del Se, se encontró una significancia ($P < 0.05$) que muestra una menor concentración sérica en los sujetos transplantados ($40,53 \pm 11,50$ ppb) frente a los no transplantados ($57,63 \pm 18,47$ ppb), (Tabla 20).

La tabla 22 recoge las concentraciones medias de Se en el suero de los pacientes dependiendo del sexo comprobándose como los niveles determinados en los hombres fueron significativamente superiores ($P < 0.05$).

En el presente estudio hemos encontrado que las concentraciones medias de Se sérico en pacientes con índice de severidad de Child-Pugh (A) no fueron significativamente diferentes de las correspondientes a los que tenían los índices (B + C). Asimismo no se estableció, una correlación significativa con el ICP de severidad determinado de su patología ($P < 0.05$), similar a anteriores informes incluso en individuos sanos (Lopes y col., 2004). En relación al índice

de severidad de la patología estudiada se encontró que fue significativamente superior en mujeres que en hombres con cirrosis hepática (Índice de Child-Pugh: 7.81 ± 1.71 vs 6.28 ± 1.31 , respectivamente; $P < .001$).

Los niveles séricos de los pacientes no estuvieron significativamente correlacionados con el Índice de Child-Pugh relativo a la severidad de la patología ($[Se] \text{ ppb} = 65,768 - 1,311 \times \text{índice de Child-Pugh}$; $r = 0,118$) ($P > 0.05$). Por tanto, como el ICP puede tomar valores de 5 a 15, este análisis de regresión es semi-continuo. Este hallazgo no está de acuerdo con informes previos sobre una asociación entre la mayor severidad de la hepatopatía y la mayor deficiencia de Se en el cuerpo (Valimaki y col., 1986; Navarro-Alarcón y Cabrera-Vique, 2008). En contraposición, un estudio reciente realizado por Uslu y col. (2010) no halló tampoco diferencias significativas entre las concentraciones de Se sérico de niños con cirrosis en Child-Pugh clase A frente a Child-Pugh clase B+C y otro (Lin y col., 2006) concluyó que la disminución de los niveles de Se sérico son resultado de la deficiencia de la función hepática en cualquier etiología. Tomando en consideración los resultados existentes hasta el momento, así como los encontrados en el presente estudio la suplementación dietética de Se prescrita en pacientes cirróticos no debería ser descartada, ya que estudios recientes como el realizado por Ding y col. (2010), realizados en animales de experimentación o el realizado por Mezey y col. (2011), arrojan resultados favorables a este respecto. Sin embargo, el realizado por Bjelakovic y col. (2010) no ha encontrado evidencias para apoyar o descartar la suplementación nutricional con antioxidantes tales como el Se en pacientes con hepatopatías.

En referencia a la influencia de la edad de los sujetos enfermos en los niveles de Se, las concentraciones de este elemento en las muestras de suero analizadas fueron significativamente superiores ($P < 0,05$) en los pacientes correspondientes al grupo de edad más avanzada (> 50 años), comparado con las edades de los grupos más jóvenes (<30 y $31-50$ años; tabla 21). Este resultado se corrobora por el hecho de que los niveles séricos de Se se encuentran correlacionados lineal y de manera estadísticamente significativa

con el factor edad ($r = 0,277$, $P = 0,007$) en los pacientes cirróticos estudiados. Investigaciones anteriores realizadas por otros grupos de investigación, han obtenido resultados semejantes en pacientes sanos (Lopes y col., 2004). A pesar del resultado obtenido y aunque en diferentes estudios y países se ha apreciado la misma tendencia general, otros autores han indicado que la influencia de la edad en los niveles séricos de Se es cuestionable debido al hecho de que en múltiples ocasiones el grupo estudiado se encuentra ésta a veces pobremente definido (i.e., el rango de edad demasiado pequeño o demasiado grande) (Robberecht and Deelstra, 1994).

Por otro lado en el presente estudio, la mayor edad de los pacientes estuvo inversa y significativamente correlacionada con la severidad de la patología cirrótica (índice Child-Pugh) ($P < 0.001$, $r = -0.456$), siendo más severa la patología en los jóvenes pacientes cirróticos. Este no es un hallazgo común en cirróticos alcohólicos, reflejando la marcada etiología de la enfermedad en nuestros pacientes, dentro de los que aquellos con alcoholismo activo no fueron incluidos en el estudio. De manera contraria otro grupo de investigación observó la existencia de una reducción no-significativa en los niveles de Se sérico a mayor edad en pacientes con hepatopatía, resultado que incrementa la controversia existente sobre el tema referido (Navarro-Alarcón y col., 2002).

En el presente estudio hemos realizado un análisis de varianza de 3 vías para determinar los roles combinados y relativos de los tres factores (sexo [masculino y femenino], edad [<30 , $31-50$, y >50 años], y severidad de la cirrosis [pacientes con Índice de Child-Pugh A vs. B + C]) en los niveles séricos de los enfermos, no encontrando ningún efecto interactivo de estos factores ($P > 0.05$). La severidad de la cirrosis por tanto no tuvo relación significativa con los niveles séricos de Se ($P = 0.763$), pero el sexo (cuya diferencia entre medianas fue de 7,66) y la edad global estuvieron independientemente relacionadas con dichos niveles ($P < 0.05$). De este modo, las concentraciones séricas de Se difirieron significativamente entre el grupo más mayor de

pacientes (>50 años) y el más joven (<30 años: diferencias entre medianas, 11.9; 31-50 años; diferencia entre medianas, 11.6).

En nuestra opinión, la principal limitación del estudio fue el número de pacientes cirróticos estudiado; de hecho, para el grupo Índice de Child-Pugh C, solo se dispuso de un paciente. Aunque los niveles séricos de Se no estuvieron significativamente influidos por el índice de severidad de la patología, lo que origina que rechazemos una de las hipótesis generales de la investigación realizada, son necesarios estudios futuros que deberían realizarse con un número mayor y más equilibrado de pacientes cirróticos para los 3 grupos de enfermos clasificados por el grado de severidad de la patología (Índice de Child-Pugh A, B y C) para dilucidar definitivamente la hipótesis de partida.

Sin embargo, en relación al factor (éxitus) se comprobó como los sujetos que habían fallecido en los 12 meses posteriores al muestreo, presentaban niveles séricos de Se significativamente más elevados ($P < 0,05$) (Tabla 23), posiblemente por una redistribución corporal del Se en la etapa final de la patología previa a la muerte.

En el presente estudio con el fin de evaluar la posible interrelación existente entre los diferentes minerales analizados en los pacientes con CH, se correlacionó de forma lineal o curvilínea los niveles séricos de Se con los correspondientes a los otros minerales (Mg, Ca, Cu y Se), comprobándose la existencia de una correlación positiva estadísticamente significativa con el Zn, Mg y Ca (Tabla 25; Figuras 15, 16 y 17). Sobre todo es destacable la establecida con el Zn con un coeficiente de correlación de $r = 0,592$ y de $r^2 = 0,350$ (correlación curvilínea tipo S, Figura 15).

Por otro lado, en un estudio realizado por Mathew y col. (2007) se encontró que el tratamiento con α -interferon en pacientes con CH aumentaba significativamente los niveles séricos de Se. Como conclusión final del estudio estos investigadores indican que los elementos traza tales como el Se, Cu, Zn y Mn podrían estar envueltos en el efecto reversivo de la CH por el α -interferon

y la vitamina E. Podría ser que la mejora de los niveles séricos de los minerales antioxidantes relacionadas con la regulación del estrés oxidativo, referida por estos investigadores, mejore posiblemente el estatus antioxidante de los pacientes cirróticos.

En conclusión, los niveles séricos de Se fueron significativamente más bajos en los pacientes cirróticos que en los controles sanos, pero no estuvieron significativamente influidos por el índice de severidad de Child-Pugh determinado. Las concentraciones séricas de Se fueron significativamente superiores en pacientes cirróticos hombres frente a mujeres, mientras el índice de severidad fue significativamente superior en mujeres frente a hombres. Los niveles séricos de Se fueron significativamente más bajos en pacientes jóvenes frente a los pacientes más mayores. En definitiva, nuestros resultados demuestran que el Se como componente del sistema antioxidante se ve severamente afectado en la cirrosis, podría comprometerse la actividad antioxidante corporal global acelerando la evolución de la patología cirrótica.

IV.2. ZINC

En el presente estudio hemos encontrado que las concentraciones medias de Zn sérico de los pacientes cirróticos ($0,880 \pm 0,198$ ppm) y los controles sanos ($0,8470 \pm 0,120$ ppm) (Tabla 19), no fueron significativamente diferentes ($P > 0,05$). En estudios anteriores, sin embargo, se apunta a la deficiencia común de este mineral en casos de cirrosis hepática (Gasso y col., 1992; Yoshida y col., 2001; Nakayama y col., 2002; Halifeoglu y col., 2004; Sien-Sing y col., 2004; Lin y col., 2005; Moriyama y col., 2006; Kondrup, 2006; Rahelic y col., 2006; Somi y col., 2007; Hamed y col., 2008; González-Reimers y col., 2008; Nazari y col., 2010), así como en otras patologías asociadas como por ejemplo el consumo crónico de alcohol (González-Reimers y col., 2009). Algunos grupos indican que la mala absorción en pacientes con cirrosis hepática así como su rápida excreción, debida al habitual uso de diuréticos en los mismos, actúan como principales causas de la deficiencia de Zn, aunque

esta hipótesis sigue generando controversia (Sullivan y col., 1978; Mills y col., 1983; Milman y col., 1983; Valberg y col., 1985; Yoshida y col., 2001). Otros grupos sugieren la pérdida de Zn al estar ligado en sangre a la albúmina, cuya concentración se ve muy reducida en el desarrollo de las patologías hepáticas (Moriyama y col. 2006); otros investigadores sin embargo establecen que la pérdida referida se relaciona con el daño de la mucosa intestinal en el intestino delgado (Karayalcin y col., 1988; Ioannis y col., 2007) y la insuficiencia de la función pancreática exocrina acompañada de la síntesis reducida de ligandos, de este elemento, tales como el ácido picolínico en el hígado (Ijuin, 1998; Ioannis, 2007).

Por otro lado la cirrosis hepática es una patología multifactorial relacionada con procesos inflamatorios de daño celular (fibrosis) que se encuentra asociada a fenómenos de estrés oxidativo, resistencia a la insulina, disfunción mitocondrial y pérdida del control de señalización ejercido por las citoquinas. Se conoce que el Zn es un mineral relacionado con el estrés oxidativo, tanto en su prevención, al actuar como cofactor enzimático de la enzima antioxidante dependiente de Zn y Cu como es la superóxido-dismutasa citoplasmática.

En un estudio realizado por Yoshida y col. (2001) se sugirió que los niveles de Zn sérico estaban inversamente relacionados con los niveles de amoníaco en sangre. Otros investigadores establecen que la suplementación de Zn a pacientes cirróticos podría ayudar a restablecer los niveles séricos normales de este elemento ayudando mediante esta estrategia paliativa anti-fibrosis, en casos de cirrosis hepática temprana (Masahiko y col., 2006; Himoto y col., 2007) debido a que reduce las concentraciones sanguíneas de amoníaco probablemente mediante la activación de la glutamina sintetasa muscular (Yoshida y col., 2001). También se ha estudiado la relación de las concentraciones séricas de Zn con otros marcadores de la cirrosis hepática como el ácido hialurónico (Moriyama y col., 2006), concluyendo la existencia de dicha correlación.

En la tabla 20, podemos observar como el hecho de ser sometidos o no a trasplante hepático, no parece intervenir en la concentración sérica de este mineral, aunque como ya hemos señalado anteriormente para el caso del Se, solo contamos para el estudio estadístico con 4 pacientes transplantados por lo que no podemos considerar el dato como estadísticamente relevante.

En el presente estudio, para el Zn no se detectó una influencia significativa según la edad de los sujetos enfermos en los niveles séricos de este elemento ($P > 0,05$), siendo los valores de las medias más desviación estándar obtenidos $0,865 \pm 0,220$ para el grupo de menores de 30 años, $0,862 \pm 0,167$ para el grupo comprendido entre los 31 y los 50 años y $0,903 \pm 0,234$ para los mayores de 50. Sin embargo, investigaciones anteriores realizadas por otros grupos, han encontrado diferencias entre grupos menores de 60 años, cuya concentración fue significativamente superior que en grupos de mayores de 60 años (Moriyama y col., 2006, Ananda y col., 2007).

La tabla 22 muestra la media de las concentraciones de Zn sérico en pacientes atendiendo al sexo. Se ha observado una significancia de $P > 0,05$ que indica la no existencia de diferencias estadísticamente significativas atendiendo a este parámetro. Otros estudios han obtenido resultados similares como el realizado por Moriyama y col. (2006), quienes encontraron niveles séricos de Zn en hombres no significativamente diferentes de los determinados en mujeres.

Se comprobó como los sujetos que habían fallecido en los 12 meses posteriores al muestreo, presentaban niveles séricos de Zn significativamente más elevados ($P < 0,05$) de igual forma que en el caso del Se (Tabla 23).

En el caso de este mineral en contraposición a lo hallado en el resto de minerales estudiados en esta tesis, se detectaron variaciones significativas en las concentraciones séricas de los pacientes atendiendo a las diferentes complicaciones de la patología. Como muestra la figura 7, existen diferencias significativas en los pacientes con ascitis en comparación con los pacientes que presentaban la complicación de bacteremia-sepsis en el pasado;

concretamente los que presentaban la complicación de ascitis mostraron niveles de Zn sérico significativamente más elevados.

La figura 8, muestra que para el Zn, los niveles séricos de los pacientes no están significativamente influenciados con el ICP de severidad determinado de su patología ($P = 0,068$); no obstante, este valor demuestra una tendencia de los sujetos con mayor índice de severidad cirrótica (Child-Pugh B), a disminuir en mayor medida sus niveles de Zn sérico. Este resultado refuerza a los de otros estudios que muestran la misma relación entre la mayor severidad de la hepatopatía y la mayor deficiencia de Zn en el cuerpo de los enfermos (Moriyama y col., 2006; Somi y col., 2007). Tomando en consideración los presentes resultados, la suplementación dietética de Zn pre-escrita en pacientes cirróticos no debería ser descartada, como de forma semejante concluye un estudio previo realizado por otro grupo de investigación (Masahiko y col., 2006).

A pesar de lo anteriormente expuesto, el análisis de regresión curvilínea entre la severidad de la cirrosis y los niveles de Zn sérico no mostró la existencia de correlación estadísticamente significativa (correlación cúbica; Figura 11).

En el presente estudio con el fin de evaluar la posible interrelación existente entre los diferentes minerales analizados en los pacientes con CH, se correlacionaron de forma lineal o curvilínea los niveles séricos de Zn con los correspondientes a los otros minerales estudiados (Mg, Ca, Cu y Se), comprobándose la no existencia de una correlación estadísticamente significativa con ninguno de ellos, con la excepción del Se con el que se correlacionó significativamente mediante una correlación curvilínea tipo S (Tabla 24 y 25; Figura 15).

IV.3. COBRE

La homeostasis del Cu está muy relacionada con la del Zn, y el hígado es uno de los principales reservorios de este mineral. Un incremento en los niveles de Cu conlleva usualmente un descenso en los de Zn y viceversa (Navarro y Wood, 2003). El Zn inhibe la absorción del Cu y compite con el por los puntos/zonas de acoplamiento (Stamoulis y col., 2007).

En la tabla 19, se muestran las concentraciones séricas de Cu de los controles sanos en contraste a los pacientes. En esta tabla puede apreciarse como existen diferencias significativas ($P < 0,05$) en pacientes cirróticos ($1,263 \pm 0,325$ ppm) frente a los controles sanos ($1,078 \pm 0,097$ ppm), apreciándose un incremento de los niveles de Cu sérico en enfermos frente a los controles. Esto, coincide con lo hallado previamente en otros estudios realizados al respecto (Terrés y col., 1998; Nakayama y col., 2002; Halifeoglu y col., 2004; Lin y col., 2005; Rahelic y col., 2006; Hamed y col., 2008; González-Reimers y col., 2008) que también refieren aumentos significativos en la concentración de Cu sérico en los pacientes cirróticos con respecto a los controles y se ha detectado también esta misma correlación estadística en otras patologías hepáticas como la hepatitis C crónica (Grungreiff y col., 2009) o el carcinoma hepatocelular (Poo y col., 2002; Lin y col., 2005); sin embargo, en otras patologías no hepáticas, como aquellas relacionadas con el sistema cardiovascular o hiperlipidemias, no se han hallado variaciones en la concentración sérica de este elemento al enfrentar los datos de pacientes con los de controles sanos (Mahdavi y col., 2009; Ghaermian y col., 2011).

El análisis realizado atendiendo a las posibles variaciones en caso de haberse llevado a cabo un transplante de hígado denotó la no existencia de diferencias significativas en uno u otro caso para el Cu ($P > 0,05$).

Se detectó una influencia significativa según los grupos de edad de los sujetos enfermos ($P < 0,05$; Tabla 21), observándose, como muestra la figura

3, la existencia de niveles significativamente superiores de Cu en el grupo de mayor edad (>50 años) respecto al grupo más joven (≥ 30).

El análisis de regresión entre la edad de los enfermos y los niveles séricos de Cu mostró que estadísticamente, dichos niveles están linealmente correlacionados con la edad, como se muestra en la figura 5.

Atendiendo al factor sexo para el caso del Cu se aprecia una tendencia a la significancia ($P = 0,074$; Tabla 22) que muestra como los niveles de este mineral en el caso del sexo femenino tienden a ser estadísticamente más elevados, lo que se corresponde con los hallazgos que recoge el estudio realizado en casos de hepatitis C crónica por el grupo de Grungreiff y col. (2009) en el que se detectaron niveles superiores de Cu en pacientes femeninos y en los controles de este mismo sexo, en comparación con los respectivos grupos masculinos. En otros estudios sin embargo, no se han encontrado diferencias significativas atendiendo al sexo (Rahelic y col., 2006).

La tabla 23, recoge como atendiendo al factor éxitus, no existen diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$). De igual forma que para el estudio de la variabilidad atendiendo a las complicaciones, donde no se hallaron diferencias significativas.

Tampoco se halló influencia en los niveles séricos de este mineral en relación al grado de severidad de la patología, resultando un $P = 0.853$, en el análisis de la t de Student. El análisis de regresión curvilínea entre la severidad de la cirrosis y los niveles de Cu sérico manifestó la existencia de una correlación inversa no estadísticamente significativa. Estos hallazgos coinciden con los obtenidos por otros grupos de investigación que tampoco encontraron diferencias significativas en la concentración de este mineral, atendiendo a los grupos de Child-Pugh (Rahelic y col., 2006). Sin embargo, otros estudios si refieren variaciones en el ratio Zn/Cu, atendiendo a los grupos Child-Pugh señalando reducciones significativas en los niveles de ese cociente en el caso de Child-Pugh clase B con respecto a Child-Pugh clase A (Somi y col., 2007).

Asimismo, no se encontró ninguna correlación estadísticamente significativa entre el Cu y los otros minerales estudiados, en el análisis de regresión realizado entre las concentraciones de dichos minerales (Tabla 25).

IV.4. MAGNESIO

En nuestra investigación, se hallaron niveles significativamente inferiores de Mg en los pacientes cirróticos ($21,2 \pm 3,73$) frente a los controles sanos ($24,0 \pm 2,22$), como puede apreciarse en la tabla 19 ($P < 0,01$). De igual forma, otros estudios realizados con anterioridad en casos de patologías hepáticas, afirman la común deficiencia en las concentraciones séricas de este elemento (Pasqualetti y col., 1987; Wang y col., 2004; Turecky y col., 2006; Biswajit y col., 2011). Asimismo se han encontrado niveles disminuidos de Mg a nivel muscular en casos de cirrosis hepática (Aagaard y col., 2003).

Dicha deficiencia en los casos de cirrosis hepática ha sido explicada por varios autores atendiendo a la disminución en la ingesta nutricional del mismo y a su excreción debida al efecto indirecto del alcohol en los túbulos renales. Por otro lado no hay que olvidar otros factores a tener en cuenta como causa de la hipomagnesimia, tales como la mala absorción del Mg en el yeyuno distal, la administración de diuréticos y la disminución en los niveles plasmáticos de albúmina (Pasqualetti y col., 1987; Koivisto y col., 2002; Biswajit y col., 2011).

Al inducirse el daño hepático en ratas, la concentración sérica de Mg se ve claramente afectada, como puede observarse en el estudio sobre el metabolismo mineral en fibrosis hepática inducida por dimetilnitrosamina, en el que los niveles séricos de Mg se encontraron significativamente reducidos (George, 2006), o como se recoge en la revisión realizada por Romani (2008), en la que se recoge una disminución del Mg tisular tras el consumo de etanol al 6% en la dieta durante 3 semanas .

En un estudio realizado por Chacko y col., 1997. sobre 76 pacientes cirróticos y 37 controles, no se hallaron diferencias significativas en las concentraciones séricas de Mg, si bien si que existieron en el Mg muscular, encontrándose estas concentraciones disminuidas en el caso de los cirróticos frente a los controles. Otro estudio (Rahelic y col., 2006), tampoco encontró diferencias significativas entre la concentración sérica de Mg de los pacientes cirróticos y la de los controles (0,94 vs. 0,88 mmol/L, $p=0,132$).

En estudios realizados sobre las concentraciones séricas de Mg en otras patologías, se ha observado también una reducción de dichas concentraciones, como es el caso del estudio realizado sobre el Mg en casos de diabetes mellitus tipo 2 (Resnik y col., 1993; Jing y col., 1995). Ésto, guarda relación con nuestros casos, si asumimos que tal y como recoge el estudio realizado por Fartoux y col. (2005), el estrés oxidativo asociado al síndrome de resistencia a la insulina puede desembocar en la producción de especies reactivas del oxígeno, proceso que bien puede exacerbar el daño producido por una hepatitis C crónica, hasta promover la fibrosis y carcinogénesis y desembocar en la cirrosis hepática (Fukushima y col., 2007). Asimismo se ha hallado esta misma correlación en casos de enfermedad cardiovascular e hipertensión (Jing y col., 1995).

No se hallaron diferencias significativas en los niveles séricos de Mg en los casos en los que se había realizado un trasplante hepático frente a aquellos en los que no se había realizado (tabla 20), ni tampoco al observar los distintos tipos de complicaciones en los pacientes.

Tampoco se detectaron diferencias significativas en los niveles séricos de Mg según los grupos de edad de los sujetos enfermos ($P < 0,05$), tal y como se aprecia también en la tabla 21, para los casos del Zn y el Ca. Ésto, difiere de otros estudios recientes realizados al respecto como el de Biswajit y col. (2011), en el que si se apreciaron diferencias significativas, encontrando una disminución en los niveles séricos de Mg al verse disminuida la edad del paciente ($1,37 \pm 0,025$ meq/L en el grupo de 31-38 años, frente a $1,11 \pm 0,048$ meq/L en el grupo de edad de 55-62 años).

De igual forma, no se obtuvieron valores significativos que mostraran diferencias importantes en las concentraciones séricas de Mg, atendiendo al sexo de los pacientes ($P > 0,05$; Tabla 22). El estudio de Rahelic y col. (2006) obtuvo resultados similares atendiendo a este factor.

Tampoco se detectaron diferencias significativas atendiendo al éxitus ($P = 0,295$; Tabla 23) o a las complicaciones de la patología.

Por el contrario, si se hallaron diferencias estadísticamente significativas en la concentraciones séricas de dicho elemento según la influencia del índice de severidad de la patología (Figura 9), encontrándose un valor de $P = 0,040$. Atendiendo a estos hallazgos podemos afirmar que según nuestro análisis, los pacientes con un mayor grado de severidad, determinado mediante la estimación del índice Child-Pugh, tienen niveles significativamente menores de Mg, como puede apreciarse en el análisis de regresión realizado para el Mg (Figura 12). Este resultado, se corresponde con el estudio realizado por Wang y col. (2004) en el que también encontraron diferencias significativas en las concentraciones de Mg sérico en pacientes en estado Child-Pugh C frente a pacientes en Child-Pugh B. Contrariamente a los hallazgos referidos el estudio realizado por Rahelic y col. (2006), no coincide con el nuestro, no hallándose en su caso relación significativa entre los niveles de Mg sérico y los distintos grupos del índice de Child-Pugh.

Puede también observarse en nuestra investigación, una correlación significativa entre los niveles de Mg con los del Ca y Se que se obtuvo al realizar el análisis de regresión correspondiente mediante una estimación curvilínea (Tabla 25). Este resultado no se corresponde con el estudio realizado por Wanj y col. (2004), en el que se apunta a la deficiencia de Mg como posible causa del aumento del Ca intracelular. Ésto se correspondería con lo referido en estudios sobre el rol del Mg como un antagonista del Ca (Laires y col., 2004). Contrariamente en varios trabajos de investigación realizados por nuestro grupo de investigación se observa que los niveles de Mg y Ca en suero, alimentos, dieta, aguas, suelos, así como sus biodisponibilidades están

positiva y significativamente correlacionados (Gámez y col., 1997; Jodral-Segado y col., 2003; Jodral-Segado y col., 2006; Velasco-Reynold y col., 2010).

IV.5. CALCIO

Los niveles de Ca en los pacientes cirróticos se hallaron significativamente reducidos con respecto a los controles, obteniéndose una significancia de $P = 0,000$ y siendo la media \pm DE de $87,7 \pm 14,84$ ppm en el caso de los pacientes y de $109,6 \pm 11,19$ en el de los controles (Tabla 19). En estudios anteriores también se han encontrado niveles reducidos de Ca entre los pacientes cirróticos y los controles (Duarte y col., 2001; Baskol y col., 2004; Wang y col., 2004), y las manifestaciones clínicas a nivel óseo, donde el Ca juega un papel fundamental, son complicaciones extra-hepáticas ampliamente conocidas en las patologías hepáticas crónicas (Hay, 1993; McGaughan y col., 1994; Gur y col., 2005; George y col., 2009; Loria y col., 2010).

En estudios en ratas también se ha encontrado una disminución en los niveles de Ca sérico en daño hepático inducido; encontrándose así mismo positivamente correlacionado con las reducidas concentraciones de albumina, proteína a la que el Ca está ligado en alrededor de un 47% y de 25-dihidroxil vitamina D, responsable de la retención y absorción de iones Ca por los túbulos renales (George, 2006).

Estudios realizados sobre las concentraciones séricas de Ca en otras patologías relacionadas, arrojan resultados similares. Caso de los realizados sobre la prolongación del intervalo QT y la variabilidad del ritmo cardíaco en pacientes cirróticos (Genovesi y col., 2009; Mozos y col., 2011) así como el realizado sobre pacientes con hemodiálisis con o sin patología hepática, donde también se observan unos niveles séricos de Ca disminuidos en cada uno de los grupos estudiados (Ghonemy y col., 2011).

No se encontraron diferencias significativas en la concentración de Ca atendiendo a que los pacientes hubieran sido sometidos a transplante o no (Tabla 20).

Atendiendo a la influencia del grupo de edad (Tabla 21), así como el análisis de regresión entre la edad de los enfermos y los niveles de Ca, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas atendiendo a este factor ($P = 0,621$).

Tampoco se apreció la existencia de diferencias estadísticamente significativas atendiendo al sexo de los sujetos en las concentraciones séricas de este elemento (Tabla 22). El estudio realizado por Duarte y col. (2001), no encontró diferencias en la densidad mineral del hueso atendiendo al sexo, en pacientes con y sin cirrosis hepática.

En lo relativo a la influencia que pudieran tener las diferentes complicaciones, no se encontró una relación estadísticamente significativa entre éstas y los niveles séricos de Ca.

Para el caso del Ca, se halló una relación estadísticamente significativa ($P < 0,05$) con el factor éxitus, resultando niveles más bajos de Ca en los pacientes que habían fallecido frente a los que no (Tabla 23).

El test no paramétrico de Kruskal Wallis mostró una $P = 0,014$; en el análisis realizado para comparar los niveles de este mineral según la severidad de la patología estimada de acuerdo al índice de Child-Pugh, se encontró que los pacientes con un mayor grado de severidad tenían unas concentraciones más altas de Ca sérico que aquellos con menor grado de severidad como puede observarse en la figura 10. Así mismo, en el análisis de regresión de los niveles séricos de Ca con los valores del índice Child-Pugh, se obtuvo una tendencia al aumento de estos niveles según aumenta el índice Child-Pugh ($P = 0,052$) como se observa en la figura 13. Estudios realizados con anterioridad también muestran diferencias significativas atendiendo al índice Child-Pugh, como el estudio de Wang y col. (2004) que halló una disminución

en los niveles séricos de este mineral en los pacientes del grupo Child-Pugh C frente a los pacientes del grupo Child-Pugh B. No obstante, otros estudios no han encontrado variaciones en la concentración sérica de Ca atendiendo al grado de severidad de la enfermedad hepática según el índice Child-Pugh (Miroliaee y col., 2010).

Estudios realizados atendiendo al factor densidad mineral del hueso, también han hallado una correlación entre la severidad de la patología hepática en la cirrosis y la menor densidad mineral ósea (Duan y col., 2004).

Tal y como recoge la tabla 25, se halló una correlación entre las concentraciones séricas del Ca con las de Mg y Se, en el análisis de regresión y de los niveles de significancia por estimación curvilínea realizados en los pacientes cirróticos. En las figuras 14 y 17 pueden observarse estas correlaciones.

V. CONCLUSIONES

1. La metodología analítica empleada para la determinación de los minerales (Se, Zn, Cu, Ca y Mg) en las muestras de suero de pacientes cirróticos, resultó adecuada según los resultados de los parámetros analíticos obtenidos.
2. La cirrosis hepática está asociada a variaciones significativas en el metabolismo de los minerales estudiados, encontrándose niveles séricos de Se, Mg y Ca disminuidos, y de Cu aumentados respecto a los determinados en los controles sanos.
3. El grado de severidad de la patología (índice Child-Pugh) es un factor determinante de las concentraciones séricas de Mg y Ca en cirróticos: al aumentar el índice de severidad se disminuyeron significativamente los niveles de Mg y aumentaron los de Ca.
4. Los pacientes con mayor índice de severidad de la patología, presentaron niveles séricos de Zn significativamente más bajos; a pesar de ello la correlación curvilínea (modelo cúbico) entre los valores del índice Child-Pugh y las concentraciones séricas de Zn mostraron un tendencia a la significancia estadística ($P= 0.090$).
5. Los niveles séricos de Se en pacientes trasplantados (tan sólo 4) fueron significativamente inferiores.
6. Las concentraciones séricas de Se fueron significativamente superiores en pacientes cirróticos hombres frente a mujeres, mientras que con el índice de severidad sucedió lo contrario. Los niveles séricos de Se fueron significativamente más bajos en pacientes jóvenes.
7. La concentración sérica de Cu aumentó significativamente con la edad de los pacientes cirróticos.
8. Sólo para el Zn, se en encontraron diferencias significativas según el tipo de complicación manifestada por los pacientes: específicamente los que

en el pasado presentaron ascitis mostraron niveles séricos de Zn significativamente superiores a los que padecieron la complicación de bacteremia-sepsis.

9. El análisis de regresión curvilínea puso de manifiesto que los niveles séricos de Se estuvieron significativamente correlacionados con los de Zn y Ca (modelo tipo S), y con los de Mg (modelo potencia), en los pacientes cirróticos.

10. Nuestros datos, al igual que otros obtenidos en estudios anteriores sostienen la idoneidad de la utilización de los niveles séricos de zinc y cobre, y probablemente los de Se y Mg, como bio-indicadores del estatus corporal en estos elementos. La asociación de estos niveles séricos a otros factores, constituyen herramientas útiles para el diagnóstico de diversas patologías hepáticas entre las que se encuentra la cirrosis hepática.

11. Como conclusión definitiva, nuestros resultados demuestran que varios minerales, componentes fundamentales del sistema antioxidante del organismo, se ven severamente afectados en la cirrosis, pudiendo verse comprometida la actividad antioxidante corporal global, acelerando así la evolución de la patología cirrótica.

V. BIBLIOGRAFÍA

AAGAARD NK, ANDERSEN H, VILSTRUP H, CLAUSEN T, JAKOBSEN K, DORUP I. Decreased muscle strength and contents of Mg and Na,K-pumps in chronic alcoholics occur independently of liver cirrhosis. *J In Med*. 2003;253:359-366.

AIKAWA J. Effect of glucose and insulin on magnesium metabolism in rabbits. A study with magnesium-28. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1960;103:363-366.

ANANDA S PRASAD, FRANCES WJ BECK, BIN BAO, JAMES T FIZGERALD, DIANE C SNELL, JOEL D STEINBERG, LAVOISIER J CARDOZO. Zinc Supplementation decreases incidence of infections in the elderly: effect of zinc on generation of cytokines and oxidative stress. *Am J Clin Nutr*. 2007;85:837-844.

AKIHIRO NAKAYAMA, HIROYUKI FUKUDA, MASAOKI EBARA, HIROSHI HAMASAKI, KATSUYUKI NAKAJIMA AND HIROMU SAKURAI. A new diagnostic method for chronic hepatitis, liver cirrhosis, and hepatocellular carcinoma based on serum metallothionein, copper, and zinc levels. *Biol Pharm Bull*. 2002;25:426-431.

AL-BADER A, ABUL H, HUSSAIN T, AL-MOOSAWI M, MATHEW TC, DASHTI H. Selenium and liver cirrhosis. *Mol Cell Biochem*. 1998;185:1-6.

ACS COMMITTEE ON ENVIRONMENTAL IMPROVEMENT. Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry. *Anal Chem*. 1980;52:22-42

BASKOL MMD, OZBAKIR OMD, COSKUN RMD, BASKOL GMD, SARAYMEN R, YUCESAY MMD. The role of serum zinc and other factors on the prevalence of muscle cramps in non-alcoholic cirrhotic patients. *J Clin Gastroenterol*. 2004;38:524-529.

BATALLER R. Fibrosis Hepática: Una respuesta regenerativa patológica en las hepatopatías crónicas. Real Academia Nacional de Farmacia. 2006. <http://www.ranf.com/sesiones/2006/2505/bataller.pdf>

BELLIDO M, LUGO L, CASTAÑEDA S, ROMÁN BLAS J A, RUFÍAN-HENARES J A, NAVARRO-ALARCÓN M, LARGO R, HERRERO-BEAUMONT G. PTH restores mandibular bone mineral density in a rabbit model of osteoporosis. J Dental Res. 2010;89:360-365.

BISCHOFF-FERRARI HA, KIEL DP, DAWSON-HUGHES B, ORAV JE, LI R, SPIEGELMAN D. Dietary calcium and serum 25-hydroxyvitamin D status in relation to BMD among U.S. adults. J Bone Miner Res. 2009;24:935-942.

BISWAJIT D, CHANDRA P, THIMMARAJU KV. Serum magnesium level in patients with liver cirrhosis. Int J Biol Med Res. 2011;2:709-711.

BJELAKOVIC G, GLUUD L L, NIKOLOVA D, BJEKAKOVIC M, NAGORNI A AND GLUUD C. Meta-analysis: antioxidant supplements for liver diseases – the Cochrane Hepato-Biliary Group. AP&T Al Pharmacol Therap. 2010; 32:356-367.

BLACK MM. The evidence linking zinc deficiency with children's cognitive and motor functioning. J Nutr. 2003; 133:1473S-1476S.

BOTELHO DE CARVALHO E. Insuficiencia hepática. En: Botelho de Carvalho E. Manual de soporte nutricional. Editorial Médica e Científica Ltda. Sao Paolo. 1992:159-165.

BROOKES PS, YISIANG-YOON, ROBOTHAM JL, ANDERS MW, SHEY-SHING S. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. Am J Physiol Cell Physiol. 2004;287:C817-C833.

BURK RF, EARLY DS, HILL KE, PALMER IS, BOEGLIN ME. Plasma selenium in patients with cirrhosis. Hepatology 1999;27:794-798.

BURK RF, HILL KE. Selenoprotein P: an extracellular protein with unique physical characteristics and a role in selenium homeostasis. *Ann Rev Nutr.* 2005;25:215-235.

CABO-MASIP T, ALENTADO-MOREL N, DALMAU-SERRA J. Nuevas recomendaciones diarias de ingesta de calcio y vitamina D: prevención del raquitismo nutricional. *Acta Pediatr Esp.* 2008;66:233-236.

CASTELLANOS-FERNÁNDEZ M, SANTANA-PORBÉN S, GARCÍA-JORDÁ E, RODRÍGUEZ-DEMIRANDA A, BARRETO-PENIÉ J, LÓPEZ-DÍAZ Y, MARTÍNEZ-GONZÁLEZ C. Influencia de la desnutrición en la aparición de complicaciones y mortalidad en pacientes cirróticos. *Nutr Hosp.* 2008;23:68-74.

CHACKO RT, CHACKO A. Serum & muscle magnesium in Indians with cirrhosis of liver. *Indian J Med Res.* 1997;106:469-474.

CHILD GG, TURCOTTE JG. Surgery and portal hypertension. In: Child GG, editor. *The liver and portal hypertension.* Philadelphia: Saunders; 1964. p.50-52.

LIN CC, HUANG JF, TSAI LY, HUANG YL. Selenium, iron, copper, and zinc levels and copper-to-zinc ratios in serum of patients at different stages of viral hepatic diseases. *Biol Trace Elemt Res.* Humana Press Inc. 2005, 109:15-23.

CONDE-MARTEL A, GONZÁLEZ-REIMERS E, SANTOLARIA-FERNÁNDEZ F, CASTRO-ALEMAN V, GALINDO-MARTÍN L, RODRÍGUEZ-MORENO F, MARTÍNEZ-RIERA A. Combined effects of ethanol and protein deficiency on hepatic iron, zinc, manganese, and copper contents. *Alcohol.* 1992;9:341-348.

DOMÍNGUEZ M, COLMENERO J, BATALLER R. Tratamiento de la fibrosis hepática. *Gastroenterol Hepatol*. 2009;32:627-632.

DUARTE MPC, GARIAS MLF, COELHO HSM, MENDONCA LMC, STABNOV LMD, OLIVEIRA MDCC, LAMY RA, OLIVEIRA DS. Calcium-parathyroid hormone-vitamin D axis and metabolic bone disease in chronic viral liver disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 2001;16:1022-1027.

EAGON PK, TEEPE AG, ELM MS, TADIC SD, EPLEY MJ, BEILER BE, SHINOZUKA H, RAO KN. Hepatic Hyperplasia and cancer in rats: alterations in copper metabolism. *Carcinogenesis* 1999;20:1091-1096.

ELIN RJ. Magnesium: the fifth but forgotten electrolyte. *Amer J Clin Pathol*. 1994;102:616-629.

ESCALANTE-BOLEAS MA, FRANCO-VICARIO R, CUBAS-LARGACHA L, GOIRÍA-ORMAZÁBAL JI, ZULUETA GABANCHO ML, CABARCOS-CAZÓN A, DUQUE-DE-LAS-HERAS C, MIGUEL-DE-LA-VILLA F. Nutrición, enfermedad ósea y cirrosis hepática. *An Med Intern*. 2002;19:503-505.

ESPINOZA-HERRERA Y, MUÑOZ-RUIZ LM, RESTREPO-GUTIÉRREZ JC. Enfermedad de Wilson: revisión del tema. *IATREIA* 2010;23:58-66.

FARTOUX L, POUJOL-ROBERT A, GUECHOT J, WENDUM D, POUPON R, SERFATY L. Insulin resistance is a cause of steatosis and fibrosis progression in chronic hepatitis C. *Gut* 2005; 54:1003-1008.

FIGUEIREDO FA, DE-MELLO-PÉREZ R, KONDO M. Effect of liver cirrhosis on body composition: evidence of significant depletion even in mild disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 2005;20:209-216.

FLECKENSTEIN A, JANKE J, DORING HJ, LEADER O. Myocardial fiber necrosis due to intracellular Ca overload – a new principle in cardiac pathophysiology. *Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab*. 1974;4:563-580.

GÁMEZ C, ARTACHO R, RUIZ LÓPEZ M D, NAVARRO M, PUERTA A, LÓPEZ M C. Serum concentration and dietary intakes of Mg and Ca in institutionalized elderly people. *Sci Total Environ.* 1997;203: 245-251.

GÁMEZ C, RUÍZ LÓPEZ MD, ARTACHO R, NAVARRO M, PUERTA A, LÓPEZ C. Serum selenium in institutionalized elderly subjects and relation to other nutritional markers. *Clin Chem.* 1997;43: 693-694.

GARCÍA-GABARRA A. Ingesta de nutrientes: conceptos y recomendaciones internacionales (2ª Parte). *Nutr Hosp.* 2006;21:437-47.

GASSO M, RUBIO M, VARELA G, et al. Effects of S adenosylmethionine on lipid peroxidation and liver fibrogenesis in carbon tetrachloride-induced cirrhosis, *Hepatology* 1996;25:200-205.

FARREL GC, LARTER CZ. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: From Steatosis to Cirrhosis. *Hepatology* 2006;43:S99-S112.

GEORGE J. Mineral metabolism in dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis. *Clin Biochem.* 2006;39:984-991.

GEORGE J, GANESH HK, ACHARYA S, BANDGAR TR, SHIVANE V, KARVAT A, BHATIA SJ, SHAH S, MENON PS, SHAH N. Bone mineral density and disorders of mineral metabolism in chronic liver disease. *World J Gastroenterol.* 2009;15:3516-3522.

GHAEMIAN A, SALEHIFAR E, JALALIAN R, GHASEMI F, AZIZI S, MASOUMI S, SHIRAJ H, MOHAMMADPOUR RA, BAGHERI GA. Zinc and copper levels in severe heart failure and effects of atrial fibrillation on the zinc and copper status. *Biol Trace Elem Res.* 2011;143:1239-1246.

GHONEMI TA, SALIM EM, ATIA M, FEKRY A, SHAWKY K. Serum leptin and bone mineral density in hemodialysis patients with or without liver diseases. Arab J Nephrol Transplan. 2011;4:131-136.

GIL-DEL-CASTILLO ML, NOGUERA VELASCO JA, MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ P. Determinación de selenio: importancia y medición. Servicio de análisis clínicos. Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca. Murcia, 2005.

GINÉS P, ARROYO V. Cirrosis hepática. En: Farreras P, Rozman C. Medicina Interna. 13 edición. Editorial Mosby Doyma. Barcelona, 1995,1: 333-336.

GÓMEZ N, HERRERO J, QUIROGA J. La Nutrición en el Enfermo Hepático. www.aeeh.org/trat_enf_hepaticas/C-50.pdf Cap.50 31/10/01.

GONZÁLEZ-PÉREZ JM, GONZÁLEZ REIMERS E, DURÁN-CASTELLÓN MC, SANTOLARIA-FERNÁNDEZ F, GALINDO-MARTÍN L, ROSVILAMAJÓ R, VEGA-PRIETO MJ, VIÑA-RODRIGUEZ J, ABREU-GONZÁLEZ P. Relative and combined effects of selenium, protein deficiency and ethanol on bone. Trace Elem Med Biol. 2011; 25:113-117.

GONZÁLEZ-REIMERS E, CANDELARIA MARTÍN-GONZÁLEZ M, REMEDIOS ALEMÁN-VALLS M, VEGA-PRIETO MJ, GALINDO-MARTÍN L, ABREU-GONZÁLEZ P, SANTOLARIA-FERNÁNDEZ F. Relative and Combined Effects of Chronic Alcohol Consumption and HCV Infection on Serum Zinc, Koper, and Selenium. Biol Trace Elem Res. 2009;132:75-84.

GONZÁLEZ-REIMERS E, GALINDO-MARTÍN L,M, SANTOLARIA-FERNÁNDEZ F, SÁNCHEZ-PÉREZ MJ, ALVISA-NEGRIN J, GARCÍA-VALDECASAS-CAMPELO EG, et al. Prognostic value of serum selenium levels in alcoholics. Biol Trace Elem Res. 2008;125:22-29.

GONZÁLEZ-REIMERS E, LÓPEZ-LIROLA A, MARTÍN OLIVERA R, SANTOLARIA-FERNÁNDEZ F, GALINDO-MARTÍN L, ABREU-GONZÁLEZ P, et al. Effects of protein deficiency on liver trace elements and antioxidant activity in carbon tetrachloride-induced liver cirrhosis. *Biol Trace Elem Res.* 2003;93:127-139.

GRUNGREIFF K, HEBELL T, GUTENSOHN, K, REINHOLD A, REINHOLD D. Plasma concentrations of zinc, copper, interleukin-6 and interferon-gamma, and plasma dipeptidyl peptidase IV activity in chronic hepatitis C. *Mol Med Rep.* 2009; 2:63-68.

GUARINI P, STANZIAL AM, OLIVIERI O, CASARIL M, GALVANI S, PANTALENA M, et al. Erythrocyte membrane lipids and serum selenium in post-viral and alcoholic cirrhosis. *Clin Chim Acta* 1998;270:139-150.

GUR A, DIKICI B, NAS K, BOSNAK M, HASPOLAT K, SARAC AJ. Bone mineral density and cytokine levels during interferon therapy in children with chronic hepatitis B: does interferon therapy prevent from osteoporosis?. *BMC Gastroenterol.* 2005;5:30

HALIFEOGLU I, GUR B, AYDIN S, OZTURK A. Plasma trace elements, vitamin B-12, folate and homocysteine levels in cirrhotic patients compared to healthy controls. *Biochem Mos.* 2004;69:693-696.

HALPERN MJ. Magnesium Physiopathology. I. Normal Physiopathology and Biochemistry. In: Magnesium deficiency. Eds: Halpern MJ & J.Durlach, Karger, Basel, Germany. 1985; 1-8.

HAMBIDGE M, KREBS N. Interrelationships of key variables of human zinc homeostasis: relevance to dietary zinc requirements. *Annu Rev Nutr.* 2001;21:429-452.

HAMBIDGE M, KREBS N. Zinc, diarrea y neumonía. *J Pediatr.* 1999;135:661-664.

HAMED SA, HAMED EA, FARGHALY MH, EZAM K. Trace elements and flapping tremors in patients with liver cirrhosis. Saudi Med. 2008;29:345-351.

HARRISON. Principios de Medicina Interna. 14 edición McGraw – Hill.1998.

HAY JE. Bone disease in liver transplant recipients. Gastroenterol Clin North Am. 1993;22:237-249.

HERRERA JA. Aspectos preventivos de la ingesta de calcio en los diferentes ciclos vitales del ser humano. Colomb Med. 2002;33:6-9.

HIDEKI FUKUSHIMA, YOSHIYUKI MIWA, MAKOTO SHIRAKI, IKUKO GOMI, KATSUHISA TODA, SHOKO KURIYAMA, HIRONORI NAKAMURA, TOSHITATSU WAKAHARA, SEIICHI ERA, HISATAKA MORIWAKI. Oral branched-chain amino acid supplementation improves the oxidized/reduced albumin ratio in patients with liver cirrhosis. Hepatol Res. 2007;37:765-770.

HIMOTO T, HOSOMI N, NAKAI S, DEGUCHI A, KINEKAWA F, MATSUKI M, YACHIDA M, MASAKI T, KUROKOCHI K, WATANABE S, SENDA S, KURIYAMA S. Efficacy of zinc administration in patients with hepatitis C virus-related chronic liver disease. Scand J Gastroenterol. 2007;42:1078-1087.

INSITITUTE OF MEDICINE (IOM). Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. Dietary reference intakes for calcium, phosphorus, magnesium, vitamin D, and fluoride. Food and nutrition board. Washington DC: National Academy Press; 1997, p.146-89.

IOANIS S, GRIGORIOS KOURAKLIS, STAMATIOS THEOCHARIS. Zinc and the liver: An active interaction. Springer Sci Buss Med. 2007;52:1595-1612.

IJUIN H. Evaluation of pancreatic exocrine function and zinc absorption in alcoholism. *Kurume Med J.* 1998;45:1-5.

IUPAC. Nomenclature symbols units and their usage in spectrochemical analysis. II. *Spectrochim Acta* 1978;33B:242.

JAVIER BRAHM B. Sección de Gastroenterología, Hospital Clínico Universidad de Chile. *Gastr Latinoam.* 2006;17:256-259.

JENS KONDRUP. Nutrition in end stage liver disease. *Best Practi Res Clin Gastroenterol.* 2006;20: 547-560.

JIMENA-SALGUEIRO M, WEILL R, HERNÁNDEZ-TRIANA M, ZUBILLAGA M, LYSIONEK A, GOLDMAN C, RUÍZ-ÁLVAREZ V, BOCCIO J, CARO R. Deficiencia de zinc en relación con el desarrollo intelectual y sexual. *Rev Cub Sal Publ.* 2004;30:126-131.

JING MA, FOLSOM AR, MELNICK SL, ECKFELDT JH, SHARRETT AR, NABULSI AA, HUTCHINSON RG, METCALF PA. Associations of serum and dietary magnesium with cardiovascular disease, hypertension, diabetes, insulin, and carotid arterial wall thickness: the Aric Study. *J Clin Epidemiol.* 1995;48:927-940.

JODRAL-SEGADO A M, NAVARRO-ALARCÓN M, LÓPEZ-G^a DE LA SERRANA H, LÓPEZ-MARTÍNEZ M C. Magnesium and calcium contents in foods from SE Spain: influencing factors and estimation of daily dietary intakes. *Sci Total Environ.* 2003;312:47-58.

JODRAL-SEGADO A, NAVARRO-ALARCÓN M, LÓPEZ-G^a DE LA SERRANA H, LÓPEZ-MARTÍNEZ M C. Calcium and magnesium levels in agricultural soil and sewage sludge in an industrial area from Southeastern Spain: relationship with plant (*Saccharum officinarum*) disposition. *Soil Sed Contam.* 2006;15:366-377.

KARAYALCIN S, ARCASOY A, UZUNALIMOGLU O. Zinc plasma levels after oral zinc tolerance test in nonalcoholic cirrosis. *Dig Dis Sci.* 1988;33:1096-1102.

KLEIN D, LICHTMANNEGGER J, HEINZMANN U, MULLER-HOCKER J, MICHAELSEN S, SUMMER KH. Association of copper to metallothionein in hepatic lysosomes of Long-Evans cinnamon (LEC) rats during the development of hepatitis. *Eur K Clin Invest.* 1998;28:302-310.

KRITTAPHOL W, BAILEY KB, PONGCHAROEN T, WINICHAGOON P, THOMSON C, GIBSON RS. Primary school children from northeast Thailand are not at risk of selenium deficiency. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2006;15:474-481.

KOIVISTO M, VALTA P, HÖCKERSTEDT K, LINDGREN L. Magnesium depletion in chronic terminal liver cirrosis. *Clin Transplant.* 2002;16:325-328.

KOYAMA H, ABDULAH R, OHKUBO T, IMAI Y, SATOH H, NAGAI K. Depressed serum selenoprotein P: possible new predictor of increased risk for cerebrovascular events. *Nutr Res.* 2009;29:94-99.

LAIRES MJ, MONTEIRO CP, BICHO M. Role of cellular magnesium in health and human disease. *Front Biosc.* 2004;9:262-276.

L. POO J, ROSAS-ROMERO R, MONTEMAYOR AC, ISOARD F, URIBE M. Diagnostic value of the Copper/zinc ratio in hepatocellular carcinoma: a case control study. *J Gastroenterol.* 2003;38:45-51.

LECOMTE E, HERBERTH B, PIRROLLET P, CHANCERELLE Y, ARNAUD J, MUSSE N, et al. Effect of alcohol consumption on blood antioxidant nutrients and oxidative stress indicators. *Am J Clin Nutr.* 1994;60:255-261.

LIN CC, HUANG JF, TSAI LY, HUANG YL. Selenium, iron, copper, and zinc levels and copper-to zinc ratios in serum of patients at different stages of viral hepatic diseases. *Biol Trace Elem Res.* 2006;109:15-23.

LIZARDI-CERVERA J, MOTOLA-KUBA D, GUEVARA-GONZÁLEZ L. La Obesidad y su asociación con el desarrollo de cirrosis criptogénica y hepatocarcinoma. *Gac Méd Méx.* 2004;140:S77-S83

LOGUERCIO C, DE GIROLAMO V, FEDERICO A, FENG SL, CATALDI V, DEL VECCHIO BLANCO C, et al. Trace elements and chronic liver diseases. *J Trace Elem Med Biol.* 1997;11:158-161.

LONG GL, WINEFORDNER JD. Limit of detection: a closer look at the IUPAC definition. *Anal Chem.* 1980; 55:713.

LOPES PA, SANTOS MC, VICENTE L, RODRÍGUEZ MO, PAVAO ML, NEVE K, et al. Trace elements status (Se, Cu, Zn) in healthy portuguese subjects from Lisbon population. *Biol Trace Elem Res.* 2004;101:1-17.

LOPÉZ-HERNÁNDEZ MA, SERRANO RUFINO M. Enfermedad de Wilson: reporte de un caso y revisión de la literatura. *Med Int Mex.* 2007;23:458-463.

LORIA I, ALBANESE C, GIUSTO M, GALTIERI PA, GIANNELLI V, LUCIDI C, DI-MENNA S, PIRAZZI C, CORRADINI SG, MENNINI G, ROSSI M, BERLOCO P, MERLI M. Bone disorders in patients with chronic liver disease awaiting liver transplantation. *Transplant Proceed.* 2010;42(4):1191-1193.

MAHDAVI R, RASEKHI H, OSTADRAHIMI A, ASADI Y, VAHED-JABBARI M. Nutritional and biochemical status of copper, zinc, Zn/Cu ratio, iron and iron stores, in hyperlipidemic and healthy men. *Iran Jour Endocrinol Metabol.* 2009;10:505-510.

MANSILLA-OLIVARES A. El calcio, átomo detonante de la vida y la función celular. Cir Ciruj. 2004;72:139-151.

MANZANARES-CASTRO, W. Selenio en los pacientes críticos con Respuesta Inflamatoria Sistémica. Nutr Hosp. 2007;22:295-306.

MARTÍN A, LUNA-DEL-CASTILLO J. Bioestadística para ciencias de la salud. Norma-Capitel. Madrid. 2004

MAS A, SARKAR B. Role of glutathione in selenite binding by human plasma. Biol Trace Elem Res. 1988;20:95-104.

MASAHIKO TAKAHASHI, HIDETSUGU SAITO, MAKIKO HIGASHIMOTO, TOSHIFUMI HÍBI. Possible inhibitory effect of oral zinc supplementation on hepatic fibrosis through downregulation of TIMP-1: A pilot Study. Hepatol Res. 2006;37:405-409.

MCGAUGHAN GW, FELLER RB. Osteoporosis in chronic liver disease: Pathogenesis, risk factors and management. Dig Dis. 1994;12:253-255.

Medlineplus. Servicio de la Biblioteca Nacional de Medicina de EEUU y los Institutos Nacionales de la Salud. Selenio (Se). <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/druginfo/natural/patient-selenium.html>

MEJIDE MIGUEZ HM. Child Pugh. Clasificación pronóstica de la hepatopatía. <http://www.meiga.info/Escalas/CHILD-PUGH.pdf>

MENDEZ E, WYATT CJ. Contenido y absorción del calcio proveniente de la dieta del noroeste de México: una retrospectiva bibliográfica. ALAN 2000;50:330-333.

MÉNDEZ-SÁNCHEZ N, NORBERTO C. CHÁVEZ-TAPIA, MISAEL URIBE. Obesidad y esteatohepatitis no alcohólica. *Gac Méd Mex.* 2004;140:S67-S72.

MESEJO A, JUAN M, SERRANO A. Cirrosis y encefalopatía hepáticas: consecuencias clínico-metabólicas y soporte nutricional. *Nutr Hosp.* 2008;2:8-18.

MIROLIAEE A, NASIRI-TOOSI M, KHALILZADEH O, ESTEGHAMATI A, ABDOLLAHI A, MAZLOUMI M. Disturbances of parathyroid hormone-vitamin D axis in non-cholestatic chronic liver disease: a cross-sectional study. *Hepatol Int.* 2010;4:634-640.

MEZEY E, LIU, XIAOPU, POTTER J. The Combination of Selenium and Vitamin E Inhibits Type I Collagen Formation in Cultured Hepatic stellate Cells. *Biol Trace Elem Res.* 2011;140:82-94.

MING DING, POTTER J, LIU X, S.TORBENSON M, ESTEBAN M. Selenium Supplementation Decreases Hepatic Fibrosis in Mice After Chronic Carbon Tetrachloride Administration. *Biol Trace Elem Res.* 2010;133:83-97.

MINISTERIO DE MEDIO AMBIENTE, MEDIO RURAL Y MEDIO MARINO DEL GOBIERNO DE ESPAÑA. Consumo alimentario en España. 2011.

MITSUHIKO MORIYAMA, HIROSHI MATSUMURA, AKIKO FUKUSHIMA, KENJI OHKIDO, YASUO ARAKAWA, KAZUSHIGE NIREI, HIROAKI YAMAGAMI, MIKI KANEKO, NAOHIDE TANAKA, YASUYUKI ARAKAWA. Clinical Significance of Evaluation of Serum Zinc Concentrations in C-Viral Chronic Liver Disease. *Springer Sci Buss Med.* 2006;51:1967-1977.

MORISCO F, VITAGLIONE P, AMORUSO D, RUSSO B, FOGLIANO V, CAPAROSO N. Foods and liver health. *Mol Aspects Med.* 2008;29:144-150.

MOZOS I, COSTEA C, SERBAN C, SUSAN L. Factors associated with a prolonged QT interval in liver cirrhosis patients. *J Electrocardiol.* 2011;44:105-108.

NAVARRO M, WOOD R. Plasma changes in micronutrients following a multivitamin and mineral supplement in healthy humans. *J Am Coll Nutr.* 2003;22:124-132.

NAVARRO-ALARCON M, CABRERA-VIQUE. Selenium in food and the human body: a review. *Sci Total Environ.* 2008;400:115-141.

NAVARRO ALARCÓN M, LOPEZ G^a DE LA SERRANA H, PEREZ-VALERO V, LÓPEZ MARTÍNEZ MC. Selenium concentrations in serum of individuals with liver diseases (cirrhosis or hepatitis): relationship with some nutritional and biochemical markers. *Sci Total Environ.* 2002;291:135-141.

NAVARRO-ALARCÓN M, LÓPEZ H, RUIZ ML, GONZÁLEZ S, PÉREZ V, LÓPEZ MC. Determination of selenium in serum by hydride generation atomic absorption spectrometry for calculation of dialy dietary intake. *Sci Total Environ.* 1995; 175:245-252.

NAVARRO-ALARCÓN M, LÓPEZ H, RUIZ ML, GONZÁLEZ S, PÉREZ V, LÓPEZ MC. Determination of selenium in serum by hydride generation atomic absorption spectrometry for calculation of dialy intake. *Sci Total Environ.* 1995;175: 245-252.

NAVARRO-ALARCÓN M, LÓPEZ H, RUÍZ ML, GONZÁLEZ S, PÉREZ V, LÓPEZ MC. Determination of selenium in serum by hydride generation atomic absorption spectrometry for calculation of daily dietary intake. *Sci Total Environ.* 1995;175:245-252.

NAVARRO-ALARCÓN M, LÓPEZ-MARTÍNEZ MC. Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases. *Sci Total Environ.* 2000;249:347-371.

NAZARI MA, MALAYERI SH, POURHOUSEINGHOLI MA, MOHEBI SR, ZALI MR. Evaluation of zinc plasma level in iranian cirrhotic patients due to hepatitis B and hepatitis C. *Hepat Mon.* 2010;10:62-64.

NORDIN BE. Calcium and osteoporosis. *Nutrition* 1997;13:664-686.

OLIVERAS-LOPEZ MJ, NIETO-GUINDO, P., AGUDO APONTE. Evaluación nutricional de una población universitaria. *Nutr Hosp.* 2006;21:179-183.

ORE-CÁRDENAS A, FRISANCHO-VELARDE O, HERNÁNDEZ-ROJAS C. Estudio comparativo entre ultrasonografía y diagnóstico histopatológico de cirrosis y fibrosis por virus de hepatitis B y C. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2004.

ORRENIUS S, ZHIVOTOVSKY B, NICOTERA P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4:552-565.

ORTS COSTA JA, ZÚÑIGA CABRERA A, ALARCÓN TORRES I. Hepatitis autoinmune. *An Med Inter.* 2004;21:340-354.

OZARDALI I, BITIREN M, KARAKILCIK AZ, ZERIN M, AKSOY N, MUSA D. Effects of selenium on histopathological and enzymatic changes in experimental liver injury of rats. *Exp Toxicol Pahol.* 2004;56:59-64.

SHILO S, PARDO M, AHARON-SIMON M. Selenium supplementation increases liver MnSOD expresión: molecular mechanism for hepato-protection. *J Inorg Biochem.* 2008;102:110-118.

PALACIOS C. El calcio en las enfermedades crónicas: un resumen de las evidencias. *An Venez Nutr.* 2003;16:78-84.

PASQUALETTI P, CASALE R, COLANTONIO D, DI-LAURO G, FESTUCCIA V, NATALI L, NATALI G. Serum levels of magnesium in hepatic cirrhosis. *Quad Sclavo Diag.* 1987;23:12-7.

PAYÁ A, RUEDA C, CASTILLO MT, CARRERAS R. Vitamina D y embarazo. *Gin Obs Clin.* 2009;10:175-179.

PEMBERTON PW, SMITH A, WARNES TW. Non-invasive monitoring of oxidant stress in alcoholic liver disease. *Scand J Gastroenterol.* 2005;40:1102-1108.

PLEVAK D, SEEFF L. Critical care issues in liver transplantation. *Liver Transpl.* 2000;4:S2-S4.

PRASAD AS, BAO B, BECK FW, KUCUK O, SARKAR FH. Antioxidant effect of zinc in humans. *Free Radic Biol Med.* 2004;37:1182-1190.

PRASAD AS. Zinc deficiency. *BMJ* 2003;326:409-410.

POPE W, BABLOK WC. Avances en evaluación de métodos y aparatos en el laboratorio clínico. *Quím Clín.* 1989;8:71-92

POWELL SR. The antioxidant properties of zinc. *J Nutr.* 2000;130:1447S-1454S.

PUGH RN, MURRAY-LYON IM, DAWSON JL, PIERTRONI MC, WILLIAMS R. Transection of the oesophagus for bleeding oesophageal varices. *Br J Surg.* 1973;60:646-9.

KUJUNDZIC M, ROMIC Z, BEKIC K, PETROVECKI M. Serum concentration of zinc, copper, manganese and magnesium in patients with liver cirrhosis. *Coll Antropol.* 2006;30:523-528.

RAI M, PAL MR, SABIHTA P, PAI P. Hepatoprotective influence of selenium in experimental liver cirrhosis. *Kuw Med J.* 2001;33:333-336.

RATZIU V, GIRAL P, CHARLOTTE F, et al. Liver fibrosis in overweight patients. *Gastroenterology* 2000;1128:1117-1123.

RESNIK LM, ALTURA BT, GUPTA RK, LARAGH JH, ALDERMAN MH, ALTURA BM. Intracellular and extracellular magnesium depletion in Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetology*1993;36:767-770.

REYES CASTAÑEDA. *Bioestadística aplicada* (Ed. Trillar) 1980. México.

REYES PÉREZ A. Estudio longitudinal de los niveles de Zn y Cu en pacientes sometidos a hemodiálisis: correlación con diversos parámetros bioquímicos. Memoria de Licenciatura. Universidad de Granada 2001.

RHEAD WJ, EVANS GA, SCHRAUZER GN. Selenium in plasma: level in blood proteins and behaviour upon dialysis, acidification, and reduction. *Bioinorg Chem.* 1974;3:217-223.

RÍOS BLANCO J, GONZÁLEZ GARCÍA J, VÁZQUEZ RODRÍGUEZ JJ. Historia natural de la coinfección por VHC y VIH: interacción de ambas coinfecciones y repercusiones de su tratamiento específico. *Enf Emerg.* 2003;5:119-125.

ROBBERECHT H, DEELSTRA H. Factors influencing blood selenium concentration values- a literature review. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis.* 1994;8:129-143.

RODÉS J, TRILLA A. Investigación clínica: del laboratorio al paciente. *Med Clin.* 2003;121:189-191.

RODRÍGUEZ M, SEIJO JA, NOVALES J, AGUILERA V. Calcinosis cutánea. *Rev Cent Dermatol Pascua* 2002;11:7-10

ROMANI AMP. Review: magnesium homeostasis and alcohol consumption. Mag Res. 2008;21:197-204.

RONENBERG A, L.-HORN D. Síntomas de la Cirrosis. Amer Liver Found. <http://healthlibrary.epnet.com/GetContent.aspx?token=981f9709-f625-4a42-a685-d1cde949efa5&chunkiid=122879>

ROSADO J L. Deficiencia de zinc y sus implicaciones funcionales. Sal Pub Mex. 1998;4:181-188.

RUBIO C, GONZÁLEZ-WELLER D, MARTÍN –IZQUIERDO RE, REVERT C, RODRÍGUEZ I, HARDISSON A. El zinc: oligoelemento esencial. Nutr Hosp. 2007;22:101-107.

RUIZ-MAGRO P, APARICIO-LÓPEZ J, LÓPEZ-HERCE CID, MARTÍNEZ-CAMPOS M, SANCHO-PÉREZ L. Alteraciones Metabólicas en niños críticamente enfermos. An Esp Pediatr. 1999;51:143-148.

SÁEZ L, FLOREA D, GARCÍA-ÁVILA M, MILLÁN E, MOLINA J, GONZÁLEZ-LÓPEZ B, QUINTERO B, CABEZA C, PLANEÍS E. Deficiencia de cobre en un colectivo y factores asociados. Ars Pharm. 2010;51:789-801.

SANZ-PARÍS A, RODRÍGUEZ-VALLE A, ARRIETA-NAVARRO R, ALBERO-GAMBOA R. Enfermedad de Wilson. Dieta controlada en cobre. Diet Nutr Clín Metabol. 2010; 25:369-379.

SANZ Y, COLLADO MC, HAROS M, DALMAU J. Funciones metabólicas nutritivas de la microbiota intestinal y su modulación a través de la dieta: probióticos y prebióticos. Acta Pediatr Esp. 2004;62:520-526.

SATO C, KOYAMA H, SATOH H, HAYASHI Y, CHIBA T, OHI R. Concentrations of Koper and zinc in liver and serum samples in biliary

atresia patients at different stages of traditional surgeries. *Tohoku K Exp Med.* 2005;207:271-277.

SIENG-SING YANG, YUN-CHIH LAI, TSUEI-RU CHIANG, DER-FANG CHEN AND DING-SHINN CHEN. Role of zinc in subclinical hepatic encephalopathy: Comparison with somatosensory-evoked potentials. *Gastroenterol Hepatol.* 2004;19:375-379.

SOMI MH, RAHIMI AO, MOSHREFI B, REZAEIFAR P, MAGHAMI JG. Nutritional status and blood trace elements in cirrhotic patients. *Hep Month.* 2007;7,27-32.

SPECKMAN B, WALTER PL, ALILI L, REIHNER R, SIES H, KLOTZ LO. Selenoprotein P expressions is controlled through interation of the coactivator PGC-1 α with fox01a and hepatocyte nuclear factor 4 α transcription factors. *Hepatology* 2008;48:1998-2006.

STAMOULIS I, KOURAKLIS G, THEOCHARIS S. Zinc and the liver: an active interaction. *Dig Dis Sci.* 2007;52:1595-1612.

SUAREZ DE RONDEROS MP, MICHELSEN RUEDA J. El papel del selenio y la vitamina E en la prevención y tratamiento del cáncer de próstata. *Rev Costarric Salud Públ.* 2004;13:01-14.

TERRÉS C, NAVARRO M, MARTÍN-LAGOS F, GIMÉNEZ R, LÓPEZ H, LÓPEZ MC. Zinc levels in foods from Southeastern Spain: relationship to daily dietary intake. *Food Add Contam.* 2001;18:687-695.

TERRÉS MARTOS C, NAVARRO ALARCÓN M, MARTÍN-LAGOS F, LÓPEZ G^a DE LA SERRANA H, LÓPEZ MARTÍNEZ M C. Serum zinc and copper concentrations and Zn/Cu ratios in patients with hepatopathies and diabetes. *J Trace Elem Med Biol.*1998;12:44-49.

THACKERAY EW, SCHUYLER O, SANDERSON MD, FOX JC, KUMAR N. Hepatic iron overload or cirrhosis may occur in acquired copper deficiency and is likely mediated by hypoceruloplasminemia. *J Clin Gastroenterol.* 2011;45:153-158.

THULUVATH PJ, TRIGER DR. Selenium in chronic liver disease. *J Hepathol.* 1992;14:176-182.

TREJO R, ÁLVAREZ W, GARCÍA-PAGÁN JC, FEU F, ESCORSELL A, BRUGUERA M, BOSCH J, RODÉS J. “Aplicabilidad y rentabilidad diagnóstica de la biopsia hepática transyugular”. Unidad de Hepatología. Hospital Clínico. Departamento de medicina. Universidad de Barcelona 1995.

TURECKY L, KUPCOVA V, SZANTOVA M, UHLIKOVA E, VIKTORINOVA A, CZIRFUSZ A. Serum magnesium levels in patients with alcoholic and non-alcoholic fatty liver. *Bratisl Lek Listy.* 2006;107:58-61.

ULATE-MONTERO G, ULATE-CAMPOS A. Revisión: El calcio en los miocitos cardíacos y su papel en las miocardiopatías. *Rev Costar Cardiol.* 2006;8:19-25.

USLU N, SALTIK-TEMIZEL IN, DEMIR H, GURAKAN F, OZEN H, YUCE A. Serum selenium concentrations in cirrhotic children. *Turk J Gastroenterol.* 2010;21:153-155.

VALIMAKI MJ, HARJU KJ, YLIKAHRI RH. Decreased serum selenium in alcoholics, a consequence of liver dysfunction. *Br J Nutr.* 1989;55:227-233.

VAN DYCK M V, ROMÁN-MALDONADO S, VÁQUEZ CASTELLANOS J L, PANDURO CERDA A. Predisposición genética y virus de la Hepatitis C crónica. La hepatología molecular: un enfoque multidisciplinar. *Mediagraph Artem.* 2005;7:26-32.

VÁSQUEZ-GARIBAY EM, ROMERO-VELARDE E. Esquemas de alimentación saludable en niños durante sus diferentes etapas de vida. Parte1. Primeros dos años de vida. *Ins Nutr Hum.* 2008;65:593-604.

VELASCO-REYNOLD C, NAVARRO-ALARCÓN M, LÓPEZ-GARCÍA H, PEREZ-VALERO V, LÓPEZ MARTÍNEZ M C. Copper in foods, beverages and waters from SE Spain: influencing factors and daily dietary intake. *Food Add Contam Part A* 2008a;25:937-945.

C. VELASCO-REYNOLD, M. NAVARRO-ALARCÓN, H. LÓPEZ-G^a DE LA SERRANA, V. PEREZ-VALERO, M. C. LÓPEZ-MARTÍNEZ. Analysis of total and dialyzable copper levels in duplicate meals by ETAAS: daily intake. *Eur Food Res Technol.* 2008b;227:367-373.

VELASCO-REYNOLD C, NAVARRO-ALARCÓN M, LÓPEZ-GARCÍA H, PEREZ-VALERO V, AGIL A, LÓPEZ-MARTÍNEZ MC. Dialysability of magnesium and calcium from hospital duplicate meals: influence exerted by other elements. *Biol Trace Elem Res.* 2010;133:313-324.

VENEGAS-TRESIERRA LF, HOLGUÍN-MARÍN R, YOZA –YOSHIDAIRA M. MORMONTOY-LAURET W, JARA-CUBAS T, POLO-RAMÍREZ C, VEGA-CAICO I. Evaluación y terapia nutricional en pacientes cirróticos del hospital “Edgardo Rebagliati Mastins”. *Rev Gastroenterol Peru.* 2002;22:13-18.

VÍCTOR IDROVO C, M.D., Clínica Marly, Fundación Santa Fe de Bogotá, Bogotá, D.C. *Rev Colombia Gastroenterol.* 2000;15:179-182.

WALLACH S. Availability of body magnesium during magnesium deficiency. *Magnesium* 1988;7:262-270.

WANG A, XIA T, YUAN J, CHEN X, WANG KY. Antagonistic effect of selenium on oxidative stress, DNA damage, and apoptosis induced by fluoride in human hepatocytes. *Fluoride* 2004;37:107-116.

WANG FJ, CAO K, MA LP, JIN ZX. Study of cellular and serum concentration of calcium and magnesium in peripheral blood cells of cirrhosis. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*. 2004;12:144-147.

WEISSTAUB AR, MENÉNDEZ AM, MONTEMERLO H, PASTENE H, PIÑEIRO A, GUIDONI ME, MARTÍN-DE-PORTELA ML. Zinc Plasmático, cobre sérico y zinc y cobre eritrocitarios en adultos sanos de Buenos Aires. *Acta Bioquím Clín Latam* 2008;42:315-23.

World Health Organization Food and Agriculture Organization of the United Nations. Human Vitamin and Mineral Requirements. Report of a joint FAO/WHO expert consultation. Rome, 2002.

YASUHIRO YOSHIDA, TOSHIHIRO HIGASHI, KAZUHIRO NOUSO, HARUSHIGE NAKATSUKASA, SHIN-ICHIRO NAKAMURA, AKIHARU WATANABE, TAKAO TSUJI. Effects of deficiency / zinc supplementation on ammonia metabolism in patients with decompensated liver cirrhosis. *Acta Med Okayama* 2001;55:349-355.

ZEMEL MB, MILLER SL. Dietary calcium and dairy modulation of adiposity and obesity risk. *Nutr Rev*. 2004;62:125-131.

ZHANG J, WANG H, YU H. Thioacetamide-induced cirrhosis in selenium-adequate mice displays rapid and persistent abnormality of hepatic selenoenzymes which are mute to selenium supplementation. University of Sci Tech of China, Southern Campus; 2007.

ZULET MA, PUCHAU B, HERMSDORFF HHM, NAVARRO C, MARTÍNEZ JA. Dietary selenium is negatively associated with serum sialic acid and metabolic syndrome features in healthy young adults. *Nutr Res*. 2009;29:41-48.

VI. DIFUSIÓN DE LA INVESTIGACIÓN
