


Consumo moderado de cerveza. Estudio nutricional e inmunológico en humanos y animales de experimentación

Este trabajo ha sido realizado por el siguiente grupo de investigación:

- Ligia Esperanza Díaz
- Dra. Marcela González-Gross
- Javier Romeo
- Dra. Ana Isabel Vallejo
- Dra. Ascensión Marcos.

GRUPO INMUNONUTRICIÓN. DPTO. METABOLISMO Y NUTRICIÓN. INSTITUTO DEL FRÍO
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS. MADRID, ESPAÑA.
DPTO. DE FISIOLOGÍA. FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA. UPV/EHU



1	INTRODUCCIÓN	6
2	ANTECEDENTES	7
3	HIPÓTESIS DE TRABAJO	9
	3.1. Estudio en humanos	9
	3.2. Estudio en animales de experimentación	9
4	OBJETIVOS	10
	4.1. Estudio en humanos	10
	4.2. Estudio en animales de experimentación	10
5	METODOLOGÍA	11
	5.1. Metodología del estudio en humanos	11
	5.1.1. Sujetos	11
	5.1.2. Diseño experimental	11
	5.1.3. Parámetros estudiados	12
	5.1.4. Descripción de la metodología	14
	5.1.5. Tratamiento estadístico de los datos obtenidos en humanos	24
	5.2. Metodología del estudio en animales de experimentación	25
	5.2.1. Animales de experimentación	25
	5.2.2. Diseño experimental	25
	5.2.3. Metodología	27
	5.2.4. Desarrollo de los estudios	28
	5.2.5. Técnicas analíticas	28
	5.2.6. Tratamiento estadístico de los datos obtenidos en animales de experimentación	34
6	DATOS EXPERIMENTALES	36
	6.1. Estudio en humanos	36
	6.2. Estudio en animales de experimentación	51



7	RESULTADOS	54
	7.1. Estudio en humanos	54
	7.1.1. Parámetros dietéticos.....	54
	7.1.2. Parámetros antropométricos.....	56
	7.1.3. Parámetros hematológicos	62
	7.1.4. Parámetros bioquímicos.....	81
	7.1.5. Parámetros inmunológicos	92
	7.2. Estudio en animales de experimentación	107
	7.2.1. Parámetros dietéticos.....	107
	7.2.2. Parámetros ponderales.....	108
	7.2.3. Parámetros inmunológicos	115
8	DISCUSIÓN	128
	8.1. Estudio en humanos.	128
	8.1.1. Parámetros dietéticos.....	128
	8.1.2. Parámetros antropométricos	128
	8.1.3. Parámetros hematológicos.....	129
	8.1.4. Parámetros bioquímicos	130
	8.1.5. Parámetros inmunológicos	134
	8.2. Estudio en animales de experimentación.	137
	8.2.1. Parámetros ponderales.....	137
	8.2.2. Parámetros inmunológicos	137
9	CONCLUSIONES	140
	9.1. Estudio en humanos.	140
	9.2. Estudio en animales de experimentación.	140
	BIBLIOGRAFÍA	141

1

En los albores del siglo XXI, asistimos con cierta complacencia al avance del conocimiento científico en materia de nutrición, contribuyendo sin duda a llevar a la práctica la máxima de la Organización Mundial de la Salud de "añadir vida a los años". En la actualidad, la mayoría de los países están revisando las ingestas recomendadas de energía y nutrientes con el fin de incorporar el posible potencial preventivo que algunos o varios de ellos ejercen sobre las enfermedades crónicas no transmisibles que afectan a gran parte de la población mundial. Resulta extremadamente novedosa la inclusión de algunos así denominados "no nutrientes" (o compuestos vegetales secundarios) a estas recomendaciones, ya que aunque no son esenciales para la vida humana, su ingesta parece relacionada con un efecto beneficioso sobre la salud. Tanto nutrientes como no nutrientes se encuentran en los alimentos y bebidas que consumimos y la elección y combinación óptima de éstos nos conducirá a una dieta "funcional" y a una alimentación saludable.

La cerveza, debido a sus propiedades refrescantes y organolépticas, es una bebida de alta aceptación en la población. Su bajo contenido alcohólico y apreciable de nutrientes y compuestos vegetales secundarios ha aumentado el interés científico por conocer los efectos que un consumo moderado ejerce sobre la salud. En la evaluación del estado nutricional, además del análisis de otros parámetros, el estudio de la inmunocompetencia es clave, debido a que es muy sensible a los cambios que pueden surgir en la ingesta y almacenes corporales de nutrientes.

La constatación de la escasez de bibliografía científica en relación con los efectos del consumo moderado de cerveza sobre la salud, y la casi inexistente de los efectos sobre el sistema inmune, nos llevó al planteamiento del presente estudio, cuyo objetivo ha sido comprobar si un consumo moderado de cerveza puede ejercer un efecto beneficioso sobre el estado nutricional e inmunológico. El estudio que se presenta resulta completamente novedoso a nivel mundial.

ANTECEDENTES

2

La asociación entre el consumo de alcohol y los posibles beneficios o riesgos derivados de su consumo dependen, además de factores individuales, de las cantidades consumidas, si bien hasta la fecha no se ha podido demostrar claramente que un tipo de bebida sea más beneficioso que otro, dada la escasez de estudios realizados sobre este tema.

En la bibliografía, el consumo moderado se fija en 10-12 g y 20-24 g de alcohol/día para mujeres y hombres, respectivamente, debido a la mayor susceptibilidad de las mujeres para metabolizar el alcohol (González-Gross y col., 2000; Dietary Guidelines, 2002). El tipo de bebida no se ha considerado importante al definir el consumo moderado, porque sólo se limita a la cantidad de alcohol. Sin embargo, aquellas bebidas alcohólicas que contienen antioxidantes y vitaminas del grupo B, como por ejemplo la cerveza, pueden ejercer un beneficio adicional sobre algunos parámetros nutricionales, más allá del efecto del alcohol *per se* sobre los factores de riesgo cardiovasculares (González-Gross y col., 2000; Ghiselli y col., 2000).

El impacto general sobre la salud de un consumo de alcohol moderado no ha sido determinado aún y mucho menos el de la cerveza. Los datos hallados en diferentes estudios (Keys, 1980; Wilt y col., 1997; Groenbaek y col., 1999) y revisiones bibliográficas (González-Gross y col., 2000; Cook, 1998) sugieren un efecto beneficioso del consumo moderado de alcohol sobre la morbilidad cardiovascular, probablemente debido al efecto protector del alcohol sobre el desarrollo de la aterosclerosis. El beneficio neto del consumo moderado de alcohol, teniendo en cuenta todos los marcadores biológicos conocidos de enfermedad coronaria, se sitúa en una reducción del riesgo del 24,7% en el metanálisis realizado por Rimm y col. (1996). La inducción de mediadores inflamatorios y quimioquinas, particularmente la MCP-1 (Proteína Quimiotáctica de Monocitos-1), como resultado de la activación de células endoteliales y monocitos, han sido identificados como un elemento clave en la iniciación y progresión de la formación de la placa ateromatosa (Gu y col., 1998). Por tanto, la disminución del MCP-1 y citoquinas inflamatorias (IL-1) y la producción de IFN- α , trae como consecuencia un efecto beneficioso en el componente inflamatorio de la formación de la placa ateromatosa (Szabo y col., 1996, 1999).

Según nuestro conocimiento, el efecto del consumo moderado de cerveza sobre el sistema inmune no ha sido estudiado hasta la fecha. Se plantea la hipótesis de que su contenido en antioxidantes pueda proteger a las células inmuno-competentes frente a diversas agresiones (Percival y Sims., 2000), al igual que su-

cede con su contenido nada despreciable en vitaminas del grupo B (González-Gross y col, 2000). En una revisión reciente realizada por nuestro grupo (Díaz y col., 2002), se concluye que extrapolando los datos obtenidos en otros estudios, en especial en consumo crónico de alcohol, el consumo de cantidades moderadas parece tener un impacto beneficioso sobre el sistema inmune. Así, se ha observado que dicho consumo moderado presenta un comportamiento en forma de curva gaussiana frente a ambos extremos: abstinencia y consumo elevado, de manera similar a la curva en forma de U que traza el consumo moderado de alcohol frente a la mortalidad por enfermedad cardiovascular. Por todo ello, se considera que el consumo moderado de cerveza podría tener unas consecuencias beneficiosas, tanto para la inmunidad humoral como para la inmunidad celular. En este contexto, se ha realizado el trabajo de investigación que se presenta a continuación, con el fin de esclarecer este aspecto tan importante, y determinar si un consumo moderado de cerveza puede mejorar el estado de salud de los adultos sanos y, en particular, potenciar su respuesta inmune.

Con el fin de determinar el efecto de un consumo moderado de cerveza sobre los órganos linfoides primarios y secundarios se ha realizado un estudio adicional en animales de experimentación descartando por un lado, posibles efectos perjudiciales del consumo moderado de alcohol y evaluando si la cerveza debido a su aporte de nutrientes, ejerce a cantidades moderadas un efecto beneficioso sobre los parámetros inmunológicos.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

3

3.1. ESTUDIOS EN HUMANOS

HIPÓTESIS GENERAL

El consumo moderado de cerveza puede ejercer un efecto beneficioso sobre la salud en adultos sanos; efecto que se puede determinar por la evaluación del estado nutricional e inmunológico.

3.2. ESTUDIOS EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

HIPÓTESIS GENERAL

El estudio de órganos linfoides primarios y secundarios en animales de experimentación permite descartar un efecto perjudicial de un consumo moderado de alcohol y establecer una mejora de la inmunocompetencia mediante el consumo de cantidades moderadas de cerveza.

4

4.1. ESTUDIOS EN HUMANOS

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la relación entre un consumo moderado de cerveza y el estado nutricional e inmunológico y establecer aquellos parámetros que pueden ser considerados biomarcadores de los efectos del consumo moderado de cerveza.

4.2. ESTUDIOS EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la relación entre un consumo moderado de cerveza y la influencia sobre la inmunocompetencia (órganos linfoides primarios y secundarios y sangre periférica), así como establecer aquellos parámetros que pueden ser considerados biomarcadores de los efectos del consumo moderado de cerveza.

METODOLOGÍA

5.1. METODOLOGÍA DEL ESTUDIO EN HUMANOS

5.1.1. SUJETOS

El estudio se llevó a cabo en 57 sujetos sanos de ambos sexos con edades comprendidas entre los 25 y 50 años, que se presentaron voluntariamente al estudio. Después de una reunión informativa, todos los sujetos firmaron el informe con su consentimiento informado. Las características de la muestra se detallan en el Cuadro 1.

Cuadro 1. *Características de la muestra.*

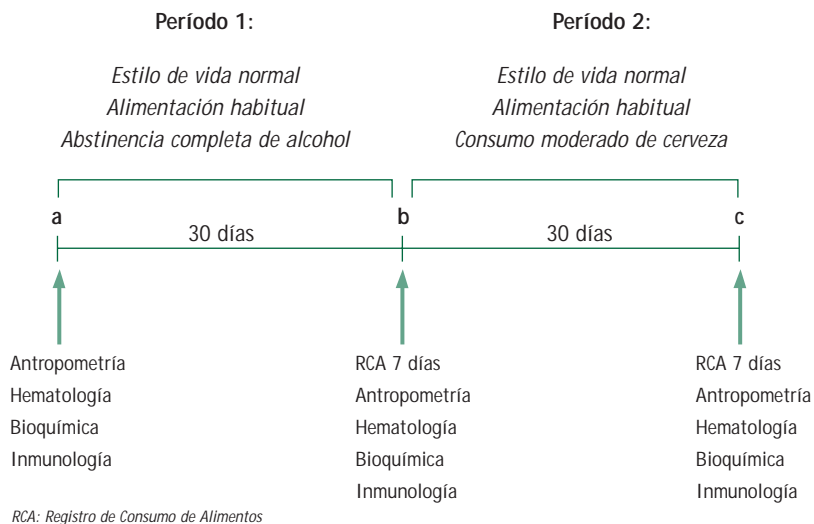
	Mujeres (n= 27)	Varones (n=30)
Edad (años)	37,66±9,19	35,00±6,11
Peso (kg)	60,89±4,26	73,00±8,32
Talla (cm)	159,55±0,04	172,87±0,75
IMC (kg/m ²)	24,02±2,75	24,45±2,63

Ninguno de los voluntarios tenía antecedentes familiares ni personales de abuso de alcohol ni patologías que desaconsejaran un consumo moderado de bebidas alcohólicas.

5.1.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se eligió un diseño de intervención longitudinal en el que cada sujeto fue su propio control. El período experimental fue de dos meses, durante los cuales todos los sujetos siguieron con sus hábitos de vida y de alimentación. La única modificación introducida fue referente al consumo de bebidas alcohólicas. Durante el primer mes, todos los sujetos tuvieron que abstenerse de cualquier consumo de alcohol. Durante el segundo mes, tuvieron que consumir la cantidad correspondiente a lo que hemos definido como consumo moderado de cerveza, es decir, 330 ml de cerveza de 4,5% vol. (12 g de alcohol para mujeres) y 660 ml de cerveza de 4,5% vol. (24 g de alcohol para varones). En los puntos (a) (antes de comenzar el estudio), (b) (al mes de abstinencia de alcohol) y (c) (al mes de consumo moderado de cerveza) se realizaron diversas pruebas analíticas, tal y como se muestra en el Cuadro 2.

Cuadro 2. *Diseño experimental del estudio.*



5.1.3. PARÁMETROS ESTUDIADOS

Cuadro 3. *Parámetros dietéticos*

Energía y nutrientes	Grupos de alimentos
<ul style="list-style-type: none"> • Energía • Proteínas • Carbohidratos • Lípidos • Fibra • Vitaminas • Minerales • Alcohol 	<ul style="list-style-type: none"> • Cereales • Lácteos • Huevos • Azúcares • Aceites • Verduras y hortalizas • Legumbres • Frutas • Carnes • Pescados • Bebidas alcohólicas • Bebidas no alcohólicas • Salsas y condimentos • Precocinados • Aperitivos

Cuadro 4. *Parámetros antropométricos e índices calculados*

Parámetros Antropométricos	
<ul style="list-style-type: none"> • Edad • Talla • Peso • Pliegues cutáneos <ul style="list-style-type: none"> • <i>Bicipital</i> • <i>Tricipital</i> • <i>Subescapular</i> • <i>Suprailíaco</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Perímetro del brazo (bíceps normal) • Perímetro cintura • Perímetro cadera • Índice de masa corporal (Índice de Quetelet) (IMC) • Índice cintura-cadera

Cuadro 5. *Parámetros biológicos*

Parámetros hematológicos	Parámetros bioquímicos	Parámetros inmunológicos
<p>Serie roja:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Hematíes • Hemoglobina • Hematocrito • Volumen corpuscular medio • Hemoglobina corpuscular media • Concentración de hemoglobina corpuscular media • Índice de dispersión de hematíes 	<ul style="list-style-type: none"> • Glucosa basal • Colesterol total • Colesterol-HDL • Colesterol-LDL • Triglicéridos • Transaminasas • Ácido úrico • Urea • Proteínas totales • Albúmina • Prealbúmina • Ferritina 	<ul style="list-style-type: none"> • Capacidad fagocítica y oxidativa de neutrófilos • Factores de complemento C3 y C4 • Determinación de subpoblaciones linfocitarias • Test cutáneo de hipersensibilidad retardada • Determinación de citoquinas • Inmunoglobulinas IgG, IgA, IgM
<p>Serie blanca:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Leucocitos: <ul style="list-style-type: none"> • <i>Neutrófilos</i> • <i>Linfocitos</i> • <i>Monocitos</i> • <i>Eosinófilos</i> • <i>Basófilos</i> 		
<p>Plaquetas:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Recuento de plaquetas • Volumen plaquetar medio • Distribución de plaquetas • Plaquetocrito 		

5.1.4. DESCRIPCIÓN DE LA METODOLOGÍA

5.1.4.1. PARÁMETROS DIETÉTICOS

La evaluación dietética en los sujetos fue realizada a través de la técnica de "registro de consumo de alimentos" durante 7 días consecutivos en el período de abstinencia (b) y durante la última semana de un consumo moderado de cerveza (c).

Una vez conocido el consumo de alimentos y bebidas se transformó en energía y nutrientes utilizando el programa informático perteneciente al grupo de programas para estudios de alimentación "GEA" (Cabajal y Molinero, 2002).

De este modo, se calcularon las ingestas de:

- *Energía*
- *Proteínas*
- *Carbohidratos*
- *Lípidos totales*
- *Fibra*
- *Minerales: calcio, hierro, yodo, magnesio, zinc, sodio, potasio, fósforo, selenio*
- *Vitaminas: vitamina B¹, vitamina B², equivalentes de niacina, vitamina B⁶, folato, vitamina B¹², vitamina C, vitamina A (equivalentes de retinol), retinol, carotenos, vitamina D, vitamina E*
- *Colesterol y ácidos grasos: colesterol, ácidos grasos saturados, ácidos grasos monoinsaturados, ácidos grasos polinsaturados, ácidos grasos cis, ácidos grasos trans y ácidos grasos no identificados*
- *Alcohol*

5.1.4.2. PARÁMETROS ANTROPOMÉTRICOS

5.1.4.2.1. TALLA

Se midió mediante tallímetro incorporado a la báscula modelo Seca 714 (rango 60 – 200 cm). El individuo se coloca de pie, descalzo, con la cabeza de forma que el plano de Frankfurt, que une el borde inferior de la órbita de los ojos y el superior del meato auditivo externo sea horizontal, con los pies juntos, rodillas estiradas, talones, nalgas y espalda en contacto con la pieza vertical del aparato medidor.

Los brazos permanecen colgantes a lo largo de los costados con las palmas dirigidas hacia los muslos. La pieza horizontal y móvil del aparato se baja hasta contactar con la cabeza del individuo, presionando ligeramente el pelo. En el marcador se lee la unidad completa más cercana.

5.1.4.2.2. PESO

Se midió mediante báscula modelo Seca 714 con precisión de 100 g (rango 0,1-130 kg). La medición se realiza con el individuo en ropa interior, colocado encima de la báscula, sin apoyarse en ningún sitio. Se anota la unidad completa más próxima.

5.1.4.2.3. MEDIDA DE PLIEGUES CUTÁNEOS

Todos los pliegues se midieron en el lado no dominante del cuerpo utilizando un lipocalibre HOLTAIN (presión constante, 10 g/mm² y precisión, 0,2 mm).

Las medidas fueron realizadas por triplicado, calculándose la media de los tres valores obtenidos. De esta forma, se consigue una mayor fiabilidad de los resultados.

Para la medida del espesor del tejido adiposo subyacente a la piel, se separó un pliegue de tejido superficial sujetándolo firmemente con los dedos pulgar e índice de la mano izquierda, teniendo especial cuidado en no arrastrar con el pliegue alguna fibra de tejido muscular y situando sobre él y alejado unos 2 cm de los dedos el lipocalibre. Las mediciones se leyeron a los 2 segundos permitiendo que la lectura del lipocalibre se estabilizara.

Los pliegues medidos fueron:

■ *Pliegue bicipital (mm)*

Se separó un pellizco superficial en el brazo izquierdo, sobre la cara anterior del bíceps braquial, en posición vertical y en el punto medio entre el acromion y olécranon (la misma zona donde se midió el perímetro del brazo).

■ *Pliegue tricpital (mm)*

Se realizó la medida en el mismo lugar que el bicipital pero sobre la región posterior del brazo izquierdo, encima del tríceps, también en posición vertical.

■ **Pliegue subescapular (mm)**

Se midió en la espalda, con los brazos paralelos al cuerpo, sobre el vértice inferior de la escápula izquierda, de forma que el pliegue siguiese la línea que marca el borde de la misma.

La dirección del pliegue es oblicuo, formando 45° con la línea horizontal y siguiendo la línea de pliegues de la piel (Tanner y Whitehouse, 1962).

■ **Pliegue suprailíaco (mm)**

Se midió sobre la cresta ilíaca izquierda y por debajo de las costillas flotantes sobre la línea que baja desde el centro de la axila.

5.1.4.2.4. *PERÍMETRO DEL BRAZO*

La medición del perímetro del brazo se realizó según las normas establecidas por Lohman y col. (1988), con el antebrazo pegado al cuerpo, relajado y contraído en posición horizontal, en el punto medio entre el acromion y el olécranon del brazo no dominante. Se utilizó una cinta métrica de acero HOLTAIN (rango 0-150 cm).

5.1.4.2.5. *PERÍMETRO DE LA CINTURA*

El individuo de pie, con el abdomen relajado, los miembros superiores colgando junto a los costados y con los pies juntos. Se midió la línea horizontal que se encuentra equidistante de la última costilla y la cresta ilíaca, mediante cinta métrica de acero HOLTAIN.

5.1.4.2.6. *PERÍMETRO DE LA CADERA*

En la misma posición adoptada para la medida del perímetro de la cintura, se considera perímetro de la cadera al máximo que se consigue pasando una cinta métrica de forma horizontal a nivel de la cadera.

5.1.4.2.7. *ÍNDICE DE MASA CORPORAL*

O índice de Quetelet, viene expresado por la relación (WHO, 1986):

$$\text{Peso (kg)}/\text{Talla}^2 \text{ (m}^2\text{)}.$$

5.1.4.2.8. *ÍNDICE CINTURA/CADERA*

Se expresa por la relación de perímetro cintura/perímetro cadera.

5.1.4.3. *PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS*

5.1.4.3.1. *SERIE ERITROCITARIA*

El recuento de hematíes y las determinaciones de hemoglobina, hematocrito e índices hemáticos: volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM), concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM), y el índice de dispersión de hematíes (RDW), se realizaron en un contador automático H1 (Technicon-Bayer).

5.1.4.3.2. *SERIE LEUCOCITARIA*

Recuento de leucocitos totales y su perfil mediante la determinación de la fórmula leucocitaria.

El recuento de leucocitos totales, linfocitos, monocitos, neutrófilos, eosinófilos y basófilos, así como la fórmula leucocitaria se realizaron, simultáneamente con los parámetros de la serie roja, en un contador H1 (Technicon-Bayer).

5.1.4.3.3. *SERIE TROMBOCÍTICA*

El recuento de plaquetas, así como los parámetros relacionados: volumen plaquetar medio (VPM), índice de distribución de plaquetas (PDW), y plaquetocrito (PTC), se realizaron en un contador automático H1 (Technicon-Bayer).

5.1.4.4. *PARÁMETROS BIOQUÍMICOS*

Los niveles de glucosa, colesterol, colesterol-HDL, colesterol-LDL, triglicéridos, transaminasas, ácido úrico, urea, proteínas totales, albúmina, prealbúmina y ferritina se realizaron en un autoanalizador Merck modelo AU 510 (Merck Diagnostic).

5.1.4.5. PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS

5.1.4.5.1. CAPACIDAD FAGOCÍTICA Y OXIDATIVA

La fagocitosis consta de varios pasos: quimiotaxis de la célula fagocítica, opsonización, absorción de la bacteria, formación del fagosoma, fagocitosis o englobamiento y, finalmente, destrucción y muerte del agente extraño. Al englobar la célula fagocítica a la bacteria, se desarrolla en el interior del fagosoma un mecanismo bactericida que causa acidificación y oxidación enzimática. Mediante incubación con un fluorocromo, el anticuerpo (Ac) aumenta la actividad enzimática dando como resultado un incremento de la intensidad de la fluorescencia, que se puede medir por citometría de flujo.

La determinación de la capacidad de englobamiento de leucocitos se llevó a cabo mediante un test comercial (Phagotest, Orpegen Pharma). Este test permite determinar cuantitativamente el número de células capaces de ingerir bacterias y la actividad específica por célula (número de bacterias internalizadas). Se parte de dos tubos a los que se añaden 100 μ l de sangre con heparina. Un tubo se incuba durante 10 minutos con 20 μ l de bacterias (*Escherichia coli*) opsonizadas a 37°C, mientras que el otro tubo, que es el control negativo, permanece en hielo. El proceso de fagocitosis se detiene al poner las muestras en hielo y añadiendo 100 μ l de la solución correspondiente. Esta solución permite discriminar entre las bacterias sólo adheridas a la superficie de las que han sido captadas e ingeridas, ya que destruye la fluorescencia de las bacterias no ingeridas. Se lavan dos veces con 2 ml de solución de lavado y se centrifugan a 2500 rpm, a 4°C durante 5 minutos. Se añaden a los dos tubos 2 ml de solución con capacidad fijadora y lisadora y se dejan incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos, con el fin de que los eritrocitos queden lisados y los leucocitos fijados. Posteriormente se centrifuga y se lava con la solución de lavado. Finalmente se añaden 100 μ l de yoduro de propidio, que permite discriminar las células eucariotas de los agregados y/o bacterias. Se mantienen a 0°C durante unos 15 minutos y se procede al análisis de las muestras en el citómetro de flujo.

Tras la fagocitosis se produce en el neutrófilo un aumento del consumo de oxígeno conocido como estallido respiratorio. Tras la degranulación, una familia de oxidasas dependientes de NADPH son proyectadas al interior de las vacuolas fagocíticas. Estas oxidasas actúan convirtiendo el oxígeno molecular

en oxígeno altamente reactivo, que se dismuta espontáneamente para formar peróxido de hidrógeno y otros potentes agentes oxidantes. Esta vía proporciona alguno de los efectos antimicrobianos más importantes del neutrófilo.

El test conocido por Burstest (Orpegen Pharma) permite determinar tanto cuantitativamente como cualitativamente este proceso y consta de los siguientes pasos:

Como partículas estimulantes se utilizan bacterias opsonizadas de *Escherichia coli* sin marcar, y el péptido quimiotáctico N-formil-MetLeuPhe (FMLP), como estimulantes de baja actividad. Como sustrato fluorogénico se utiliza dihidro-rodamina (DHR)123.

Se activan las células inicialmente, partiendo de tres tubos con 100 μ l de sangre heparinizada (a 0°C durante 15 minutos). Se añaden 20 μ l de bacteria *Escherichia coli* a un tubo, 20 μ l del péptido quimiotáctico (FMLP) a otro y el tercer tubo se utiliza como control. Mientras que el tubo control permanece en hielo, los otros dos se agitan y se incuban durante 10 minutos a una temperatura de 37°C. Tras la estimulación, los neutrófilos producen metabolitos derivados de la oxidación (anión superóxido, peróxido de hidrógeno y ácido hipocloroso), que eliminan las bacterias que se encuentran en el fagosoma. La formación de productos oxidantes durante la respiración oxidativa puede ser monitorizada mediante la adición y consecuente oxidación de 20 μ l de sustrato DHR 123 (no fluorescente) que se oxida y pasa a rodamina 123 (fluorescente). Se incuban durante 10 minutos a 37°C para permitir la reacción que acabamos de describir, y pasado este tiempo se añaden 2 ml de solución con capacidad fijadora y lisante y se deja incubar a temperatura ambiente 20 minutos, con el fin de que los eritrocitos queden lisados y los leucocitos fijados. Posteriormente se centrifuga y se lava con solución de lavado. Finalmente se añaden 100 μ l de la solución que permite discriminar las células eucariotas de los posibles agregados y/o bacterias. Se mantienen a 0°C durante unos 15 minutos y se procede al análisis del porcentaje de células que han producido radicales de oxígeno, así como la intensidad media de fluorescencia en el citómetro de flujo.

5.1.4.5.2. FACTORES DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO: C3 Y C4

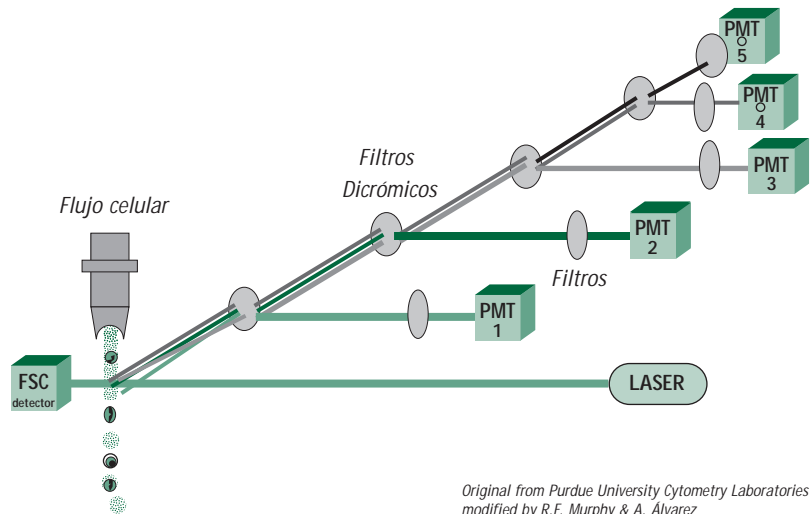
Las concentraciones séricas de los factores del complemento C3 y C4 se determinaron por nefelometría (Behring 100).

5.1.4.5.3. RECUENTO Y PORCENTAJE DE SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS

Las subpoblaciones linfocitarias [células T totales (CD2), células T maduras (CD3), células T helper o cooperadoras (CD4), células T citotóxicas o supresoras (CD8) y células B (CD19)], se determinaron mediante la incubación de sangre venosa, anticoagulada con EDTA-K3, con el anticuerpo monoclonal correspondiente a cada subpoblación (CD4/CD8 (Leu-3a/2a), conjugado con un fluorocromo (isocianato de fluoresceína (FITC) el CD4 y ficoeritrina (PE) el CD8, CD3/CD19 (Leu-4/12 conjugado con FITC y PE respectivamente, CD2 (Leu-5b) conjugado con PE, Becton-Dickinson, Missiauga, ON), en un Q-PREP EPICS (Coulter Diagnostics). Este sistema consta de un reactivo lisante de eritrocitos (Inmunoprep A), un estabilizador de leucocitos (Inmunoprep B), y un fijador de membrana celular (Inmunoprep C).

Posteriormente, las muestras marcadas se analizaron por citometría de flujo, ya que éste es un método analítico que permite la medida de emisión de fluorescencia y dispersión de luz, producidas por la iluminación apropiada de las células o partículas microscópicas de una en una y arrastradas por un flujo portador, a medida que desfilan frente a un sistema de detección (Cuadro 6).

Cuadro 6. Esquema de la citometría de flujo



Original from Purdue University Cytometry Laboratories
modified by R.F. Murphy & A. Alvarez

Los citómetros de flujo utilizados fueron: Fscan (Becton-Dickinson) y Epics XL (Coulter) y consta de:

- **Sistema hidráulico:** Rodea la suspensión celular en flujo con una vaina externa, formada por un fluido libre de partículas, que mueve la muestra a velocidad constante y controlada a través de la zona de detección ("cámara de flujo"), donde las células o partículas son expuestas, una a una, al haz iluminador.
- **Sistema de iluminación:** Produce un haz de luz que ilumina la muestra. La mayor parte de los citómetros (como es nuestro caso) utilizan luz láser, por ser coherente, monocromática, polarizada, estrecha, estable y de intensidad conocida, aunque hay sistemas que disponen de lámparas de mercurio.
- **Sistema óptico:** Enfoca la iluminación de las partículas de muestra, detecta la luz dispersada por ellas y selecciona la fluorescencia emitida a medida que las partículas atraviesan el haz luminoso.
- **Sistema electrónico:** Proporciona una iluminación de intensidad constante, detecta y amplifica la respuesta de las partículas en forma de pulso analógico, transforma las señales en forma digital y controla el proceso de separación celular electromagnética (Cell Sorting).
- **Sistema de adquisición y análisis de datos:** En la mayor parte de los citómetros modernos es compatible con ordenadores personales y sistemas operativos comunes (plataformas Ms-DOS, Windows y MacIntosh). Permite la adquisición multiparamétrica de datos y el análisis en tiempo real y en modo de lista (matrices de datos no correlacionados), así como el análisis restringido a subpoblaciones seleccionadas ("acotamiento"). Los datos se presentan en forma de histogramas monoparamétricos o representaciones biparamétricas de la distribución, junto con información estadística de las distribuciones. Existen diferentes programas comerciales de apoyo, utilizables en ordenadores independientes (Álvarez y col., 2000).

Tras este análisis, se calculó el cociente CD4/CD8, como indicador del estado nutricional (Marcos y col., 1997).

5.1.4.5.4. *FUNCION INMUNE CELULAR "IN VIVO":*

Se utilizó un sistema de multipuntura de ocho cabezas. Siete de ellas contienen 0,03 ml de antígeno estéril y la octava, utilizada como control negativo contie-

nen 0,03 ml de glicerina. Los antígenos empleados fueron Tétanos, Difteria, Estreptococo grupo C, Tuberculina, *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Proteus mirabilis* (Multitest CMI, delayed hypersensitivity skin test kit. Merieux Institute, Miami, Florida).

El test se aplicó intradérmicamente en el antebrazo y pasadas 48 horas se procedió a la lectura de los diámetros de induración producidos por cada antígeno. Cuando el diámetro era inferior a 2 mm, la reacción a ese antígeno se consideró negativa. Se sumaron los milímetros de la induración de las respuestas positivas, es decir, cuando el diámetro era igual o superior a 2 mm, y el valor total se definió como score.

Se consideraron los criterios de valoración de respuestas definidos por Jaurrieta y col. (1981) para mujeres y hombres de la población española:

Cuadro 7. Valoración del test de hipersensibilidad retardada cutánea

Mujeres	Hombres
Score=0: respuesta anérgica	Score=0: respuesta anérgica
Score= 0-5 mm: hipoergia	Score= 0-10 mm: hipoergia
Score 5-10 mm: respuesta baja	Score= 10-20 mm: respuesta baja
Score >10 mm: respuesta normal.	Score >20 mm: respuesta normal.
Anergia relativa: respuesta a un solo antígeno	Anergia relativa: respuesta a un solo antígeno

5.1.4.5.5. FUNCIÓN INMUNE CELULAR "IN VITRO": SECRECIÓN DE CITOQUINAS MEDIDAS POR CBA (CYTOMETRIC BEAS ARRAY).

La secreción de citoquinas se determinó en sobrenadantes procedentes de cultivos celulares tras 48 horas de incubación con un mitógeno.

Se parte de sangre heparinizada que se diluye con solución salina (1/1) y se procede a la separación de linfocitos en gradiente de densidad ($1,077 \pm 0,001\text{g/ml}$) de Ficoll (Ficoll-Hypaque, Lymphoprep, Nyegaard, Oslo, Norway). El proceso de separación se basa en la diferencia de densidad que existe entre los distintos tipos celulares. Las células mononucleares y las plaquetas se depositan en la parte superior del gradiente, porque tienen menor densidad que éste. Los glóbulos rojos y los granulocitos tienen mayor densidad y se depositan en el fondo del tubo. Con una pipeta Pasteur se retira la banda de linfocitos. Se reali-

zan dos lavados en medio RPMI-1640 (BioWhittaker, Verviers, Belgium) y se ajusta a una concentración de 10^6 células por cada 1 ml de medio de cultivo. Dichas células se resuspenden en el medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero bovino (BioWhittaker) después de descomplementarlo y con una concentración al 1% de penicilina/estreptomicina (5000UI/ml:5000mg/ml, BioWhittaker). Tras esto, se procede a la estimulación con phytohemaglutinina (PHA; Gibco BRL, Paisley, UK), mitógeno que activa a todas las células por igual, es decir, no tiene especificidad por un subtipo celular, a una concentración final 7 mg/ 10^6 células e incubación 37°C en una atmósfera humidificada al 5% de CO₂ durante 48 horas, período tras el cual se extraen los sobrenadantes y se almacenan a -20°C para su posterior procesamiento.

La determinación de IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-10, TNF- α , IL-6 se llevó a cabo por duplicado por medio de la técnica de CBA, usando los kits de Becton-Dickinson (*Human Th1 y Th2 cytokine CBA*).

La secreción de citoquinas medidas por citometría de flujo combina el fundamento de las técnicas de inmunoensayo con la citometría de flujo. Seis grupos de microesferas de poliestireno de igual tamaño (7,5 μ m de diámetro) son teñidas con distintas intensidades de fluorescencia. Cada partícula ha sido unida mediante enlace covalente con un anticuerpo (Ac) (Pharmingen, San Diego, CA) frente a una de 6 citoquinas (IL-2, IFN- γ , IL-4, IL-10, TNF- α , IL-6), representando una población concreta con una intensidad FL-3 de fluorescencia determinada. Este complejo Ac-partícula es capaz de unirse a la citoquina correspondiente y ser detectada de forma simultánea en la mezcla. La citoquina presente en la muestra, que se une al complejo, puede ser detectada por inmunoensayo directo usando 6 anticuerpos diferentes unidos a ficoeritrina (detector) (PE), (FL2). Tanto los estándares con concentraciones de 0-5000 pg/ml como los reactivos (Ac-partícula, detector-PE) son mezclas de las 6 citoquinas.

La mezcla de 50 μ l de Ac-microesfera, 50 μ l de detector-PE, y 50 μ l de muestra o de estándares, se incuba durante 4 horas a temperatura ambiente y en ausencia de luz. Después, se lava para eliminar el reactivo que no se ha unido y se procede a la lectura en el citómetro. Se obtienen 6 curvas standard.

5.1.4.5.6. TASA SÉRICA DE INMUNOGLOBULINAS: IgG, IgA E IgM

Las concentraciones séricas de inmunoglobulinas IgG, IgA e IgM se determinaron por nefelometría (Behring-100).

La técnica de inmunonefelometría permite una rápida medida cuantitativa de precipitación, en algunos casos facilitada con látex, para la determinación de proteínas.

Las proteínas presentes en la muestra reaccionan con antisueros altamente específicos para formar complejos antígeno-anticuerpo insolubles. La medida de la dispersión que sufre un rayo luminoso al atravesar esta suspensión es proporcional a la concentración de antígeno o proteína que nos interesa, en situación de anticuerpo en exceso. La aglutinación facilitada por látex se usa en reacciones de antígeno-anticuerpo que no permiten la formación de inmunocomplejos suficientemente grandes para ser medidos. En dicho caso el anticuerpo se encuentra absorbido a la superficie de partículas de látex, que en contacto con el antígeno proporcionan una aglutinación medible.

5.1.5. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS OBTENIDOS EN HUMANOS

El tratamiento estadístico de los datos de parámetros analizados en sujetos sanos, se llevó a cabo en el Centro Técnico de Informática (CTI) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), mediante el programa estadístico SPSS 11.0 en Windows XP.

■ Análisis descriptivo univariante

Se realizó un cálculo de los estadísticos básicos (medias y varianzas) y se realizaron pruebas de ajuste de las distribuciones de las distintas variables de la muestra, observándose que todas seguían una distribución normal, salvo las citoquinas. Se determinaron los valores *missing-data* y *outliers* que pudieran ser sesgos en la muestra.

■ Modelos lineales generales

Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas Basal (a), Abstinencia (b) y Cerveza (c) y factor fijo el Sexo para cada parámetro.

En los casos en que la distribución normal no pudo ser asegurada, se aplicaron pruebas estadísticas no paramétricas para cada sexo. Test de Wilcoxon comparando pares: [(a)-(b),] [(a)-(c)] y [(b)-(c)].

■ Modelos multivariantes

Se realizó una selección de las variables de mayor interés en el estudio; a partir de aquí se realizaron los siguientes análisis:

- Se realizó una estimación de missing-data para las variables señaladas basada en la media del grupo y la dependencia lineal.
- Se realizó análisis factorial en componentes principales, estudiándose la matriz de correlación entre los parámetros Basal (a), Abstinencia (b) y Cerveza (c).
- La representación gráfica se realizó por Gráficos de Box-Wiskers sobre los grupos: Basal (a), Abstinencia (b) y Cerveza (c).

5.2. METODOLOGÍA DEL ESTUDIO EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

5.2.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Para esta experiencia se utilizaron 40 ratas machos de raza Wistar en crecimiento, con una edad de 8 semanas, de peso inicial promedio de 240 g, conseguidos a partir del criadero del Instituto de Nutrición y Bromatología del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC-UCM).

5.2.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

Tras un período de adaptación de cinco días al nuevo habitáculo y a las condiciones de la experimentación controladas:

- *Jaulas individuales de metabolismo*
- *Temperatura $22^{\circ}\text{C} \pm 1$ en el habitáculo*
- *Foto-período día/noche de 12 horas (8-20 horas)*
- *Humedad relativa entre 50 y 70%*

Los 40 animales fueron divididos en cuatro grupos de 10 individuos. La dieta de referencia elegida fue la AIN93-G, específica para ratas en crecimiento según las recomendaciones de American Institute of Nutrition (1993) y cuya composición se detalla en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Composición de la dieta (AIN93G)

Ingredientes	g/kg Dieta
Almidón de maíz	397,486
Caseína (85% Proteína)	200,000
Dextrinas	132,000
Sacarosa	100,000
Aceite de soja	70,000
Fibra	50,000
Minerales	35,000
Vitaminas	10,000
L-cisteína	3,000
Colina	2,500
Terbutilhidroquinona	0,014

Los grupos se establecieron teniendo como base el tipo de bebida en cada uno de ellos.

- **Grupo 1:** 10 ratas cuya bebida fue agua
- **Grupo 2:** 10 ratas cuya bebida fue cerveza diluida con agua
- **Grupo 3:** 10 ratas cuya bebida fue cerveza sin alcohol diluida con agua
- **Grupo 4:** 10 ratas cuya bebida fue etanol diluido con agua

La concentración moderada de alcohol para los animales de experimentación se definió como 0,28 g alcohol para una rata de 240 g, equivalente a 20 g alcohol para un sujeto de 70 kg.

La concentración de etanol en cada uno de los grupos de estudio fue ajustada según el peso inicial y el incremento de peso en cada individuo a lo largo del tiempo de estudio, con el fin de proveer, indistintamente del tipo de bebida, una concentración que correspondiese a un consumo moderado de alcohol.

Durante las cuatro semanas de duración del estudio, la ingesta de dieta y de bebida se registró en forma diaria y el peso fue controlado tres veces por semana. Los cuatro grupos comieron y bebieron *ad libitum*.

Los resultados de los grupos objeto de estudio fueron comparados entre sí

y frente al grupo control (1), formado por los 10 animales que como bebida consumían agua.

5.2.3. METODOLOGÍA

Cuadro 9. *Parámetros dietéticos y ponderales estudiados en animales*

Parámetros Dietéticos	Parámetros Ponderales
Ingesta diaria de dieta AIN93G Ingesta de bebida	Peso corporal (PC) Ganancia de peso (GP) Porcentaje de incremento de peso (% IP) Eficacia alimentaria (EA) Peso de timo (PT) Peso de bazo (PB) Índice timo-somático (ITS) Índice espleno-somático (IES)

Cuadro 10. *Parámetros inmunológicos estudiados en animales*

Sangre Periférica	Bazo	Timo	Placas de Peyer
Recuento y porcentaje de subpoblaciones linfocitarias CD2 CD3 CD4 CD8 CD161 CD45RA Cocientes linfocitarios CD4/CD8 CD2/CD45RA Capacidad fagocítica de los neutrófilos Función inmune celular in vitro: secreción de citoquinas: IL-2, TNF- α .	Porcentaje de subpoblaciones linfocitarias CD2 CD3 CD4 CD8 CD45RA Cocientes linfocitarios CD4/CD8 CD2/CD45RA	Porcentaje de subpoblaciones linfocitarias CD4+CD8+ CD4+CD8- CD4-CD8+ Cociente linfocitario CD4/CD8	Porcentaje de subpoblaciones linfocitarias CD2 CD3 CD4 CD8 CD161 CD45RA Cocientes linfocitarios CD4/CD8 CD2/CD45RA

5.2.4. DESARROLLO DE LOS ESTUDIOS

Tras someter las ratas a un consumo moderado de etanol durante 4 semanas, fueron decapitadas y se les extrajo 4 cc de sangre, 3,0 ml de sangre en heparina de litio 143 U.I y 1,0 ml en tubo seco. Mantenido a temperatura ambiente, por un tiempo máximo no superior a 30 minutos, la muestra heparinizada fue usada para el aislamiento de la banda de linfocitos y la muestra en tubo seco para obtención del suero. Una vez obtenidas las muestras de sangre se procede a la fijación del animal sobre la tabla de disección en posición decúbiteo supino, con ayuda de gomas enganchadas en las cuatro patas y se procede a la disección, se obtienen intactos el bazo, timo e intestino. Se pesan los órganos y se mantienen en solución isotónica fría para su análisis. Todas las muestras fueron procesadas transcurrido un tiempo de 30 a 45 min. después del sacrificio del animal.

5.2.5. TÉCNICAS ANALÍTICAS

El procedimiento quirúrgico para la obtención de los órganos linfoides especializados (timo, bazo y placas de Peyer), se inició limpiando cuidadosamente la zona ventral del animal, procediendo a abrir y separar la piel. A continuación, mediante el empleo de tijeras curvas, se realizó la apertura, levantando la piel y practicando una pequeña incisión en la línea media ventral. Empleando las mismas tijeras se abrió la piel desde el ano hasta la altura del labio inferior. Concluida la incisión se procedió a retirar la piel hacia los lados, separándola de la capa muscular.

La disección del abdomen se inició realizando una incisión sobre la línea alba del plano muscular a lo largo de todo el abdomen. Esta incisión se inicia desde el punto situado un centímetro por encima de los orificios genitales hasta el extremo caudal del esternón a la altura del cartílago xifoides. A continuación se efectuaron incisiones transversales a derecha e izquierda al nivel de la caja torácica y de los miembros posteriores. Se separaron los labios de la incisión y se fijaron con pinzas hemostáticas.

La extracción del bazo e intestino se realizó tras la apertura total del abdomen, se cortó el músculo esterno-hioideo por la línea media separando a ambos lados, con el fin de encontrar y extraer en su totalidad el timo.

Una vez pesados en balanza analítica (METTLER AE 260 Delta Range) de precisión 0,1 mg el timo y bazo, y realizada la extracción del intestino delgado y grue-

so de la totalidad de las placas de Peyer, se procedió a la dilaceración de los órganos, homogenización, centrifugación y aplicación de lavados con solución tampón para la obtención de linfocitos. Los eritrocitos contenidos en bazo fueron eliminados por adición de una solución lisante de cloruro amónico y posteriormente mediante lavados consecutivos con suero salino para eliminar los restos de membrana y hemoglobina de los mismos.

5.2.5.1. PARÁMETROS DIETÉTICOS

La evaluación dietética en las ratas se realizó a través del registro del consumo diario de la dieta en gramos sobre sustancia fresca (ssf) y sobre sustancia seca (sss) y la medición de los mililitros de bebida ingeridos por cada animal.

5.2.5.2. PARÁMETROS PONDERALES

5.2.5.2.1. PESO CORPORAL

El peso corporal de los animales se determinó en una balanza electrónica marca METTLER PM 3000 de precisión 0,1 g.

5.2.5.2.2. GANANCIA DE PESO (GP)

La ganancia de peso se calculó hallando la diferencia entre el peso final (PF) y peso inicial (PI).

5.2.5.2.3. PORCENTAJE DE INCREMENTO DE PESO (%IP)

El porcentaje de incremento de peso (% IP), se calculó a partir de los valores de peso inicial (PI), peso final (PF), utilizando la ecuación:

$$\%IP = [(PF-PI)/100]PI$$

5.2.5.2.4. EFICACIA ALIMENTARIA (EA)

La eficacia alimentaria (EA) se calculó a partir del incremento de peso (IP) por día (g) y por sustancia seca (ss) ingerida por día.

El valor de sustancia seca se obtiene a través del cálculo de la humedad de la dieta, por pérdida de peso en estufa a 105°C hasta peso constante (A.O.A.C., 1980).

$$EA = IP (g)/ss (g)$$

5.2.5.2.5. PESO DEL TIMO (PT)

El peso se determinó usando una balanza analítica (METTLER AE 260 Delta Range) de precisión 0,1 mg, una vez retiradas las membranas que lo adherían.

5.2.5.2.6. PESO DEL BAZO (PB)

El peso se determinó usando una balanza analítica (METTLER AE 260 Delta Range) de precisión 0,1 mg, una vez retiradas las membranas que lo adherían.

5.2.5.2.7. ÍNDICE TIMO-SOMÁTICO (ITS)

El índice timo-somático (ITS) se calculó a partir de los valores de peso de timo (PT), peso corporal final (PF), utilizando la siguiente ecuación:

$$ITS = [PT / PF] \times 100$$

5.2.5.2.8. ÍNDICE ESPLENO-SOMÁTICO (IES)

El índice espleno-somático (IES) se calculó a partir de los valores de peso de bazo (PB), peso corporal final (PF), utilizando la siguiente ecuación:

$$IES = [PB / PF] \times 100$$

5.2.5.3. PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS

5.2.5.3.1. SANGRE PERIFÉRICA

5.2.5.3.1.1. Recuento y porcentaje de subpoblaciones linfocitarias

Las subpoblaciones linfocitarias (células T totales (CD2), células T maduras (CD3), células T helper o cooperadoras (CD4), células T citotóxicas o supresoras (CD8), células B (CD45RA) y células natural killer (CD161), se determinaron mediante la incubación de sangre anticoagulada con heparina, con el anticuerpo monoclonal

correspondiente a cada subpoblación usando dos controles: Control 1: GOAT Antimouse IgG:RPE-RAT 0,5 mg Control 2: GOAT Antimouse IgG:FITC-RAT 0,5 mg y las subpoblaciones: Mouse Anti Rat CD2:FITC 0,1mg, Mouse Anti Rat CD3:FITC 0,1 mg, Mouse Anti Rat CD4:RPE 0,1 mg, Mouse Anti Rat CD8:RPE-C y 5 0,1 mg, Mouse Anti Rat CD161:FITC 0,1 mg (NK), Mouse Anti Rat CD45RA:RPE 0,1 mg (CD19). Se utilizaron tres soluciones para preparar la muestra antes de marcarla con los anticuerpos monoclonales: solución lisante de eritrocitos, estabilizador de leucocitos y un fijador de membrana celular.

Posteriormente, las muestras marcadas se analizaron por citometría de flujo, como se ha indicado previamente en el apartado del estudio en humanos (Cuadro 6). Tras estos análisis se calcularon los cocientes CD4/CD8 y CD2/CD45RA

5.2.5.3.1.2. *Capacidad fagocítica*

Esta función de los fagocitos se ha explicado previamente en el apartado 5.1.4.5.1 correspondiente al estudio en humanos.

5.2.5.3.1.3. *Función inmune celular in vitro*

Se lleva a cabo el aislamiento de linfocitos y se determina la secreción de citoquinas por ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) (Bender MedSystems, Vienna, Austria) tras la estimulación con un mitógeno. El aislamiento de linfocitos se realiza mediante centrifugación en gradiente de densidad ($1,077 \pm 0,001$ g/ml) de Ficoll (Lymphoprep). Es un método rápido y muy simple de purificación de células mononucleares de sangre periférica entre las que están los linfocitos. El proceso de separación se basa en la diferencia de densidad que existe entre las células mononucleares y otros elementos de la muestra de sangre. Las células mononucleares y las plaquetas se depositan en la parte superior del gradiente, porque tienen menor densidad que éste. Los glóbulos rojos y los granulocitos tienen mayor densidad y se depositan en el fondo del tubo.

Mediante pipeta Pasteur se retira la banda de linfocitos. Se realizan dos lavados en el medio RPMI-1640 (BioWhittaker, Verviers, Belgium). Finalmente las células aisladas se resuspenden en el medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal (BioWhittaker), después de descomplementarlo, y con una concentración al 1% de penicilina/estreptomicina (5000 UI/ml:5000 µg/ml, BioWhittaker), ajustándolas a una concentración de 10^6 cel/ml de medio de cul-

tivo. Se procede a la estimulación con el mitógeno phytohemaglutinina (PHA; Gibco BRL, Paisley, UK) a una concentración final de 7×10^{-4} % (P/V). Las células en cultivo se incuban durante 48h a 37°C en una atmósfera humidificada que contiene una proporción de 5% de CO₂. Tras el periodo de incubación el sobrenadante de cultivo se resuspende y se recolecta para su centrifugación, almacenándose a -20°C hasta su posterior utilización.

En el presente estudio, se han determinado las citoquinas IL-2 y TNF- α por duplicado utilizando la técnica de ELISA. El método de ELISA es un ensayo de inmunoadsorción acoplado a una actividad enzimática para la detección cuantitativa de, en nuestro caso, citoquinas en sobrenadantes de cultivos celulares, suero humano, plasma u otros fluidos. Se basa en la unión específica de la citoquina contenida en la muestra a anticuerpos monoclonales específicos inmovilizados sobre la superficie de placas de titulación. Para ello, las muestras y estándares apropiados se incuban en dichas placas con el anticuerpo, de forma que el antígeno a determinar (citoquina presente en la muestra) o el estándar se une a los anticuerpos fijados al pocillo. Un segundo anticuerpo monoclonal anti-citoquina, conjugado con biotina, se añade también en esta incubación, el cual se une a la citoquina capturada por el primer anticuerpo. Tras la incubación, se elimina el segundo anticuerpo no unido mediante lavados repetidos en una solución buffer y se incuba de nuevo en presencia de un conjugado Streptavidina-HRP (*horseradish peroxidase conjugate*), que se unirá al conjugado de biotina. Con otra serie de lavados se elimina la Streptavidina-HRP no unida y se añade una solución de Tetrametilbencidina (TMB), que sirve de sustrato a la HRP. Con la reacción enzimática se forma un compuesto coloreado en proporción a la cantidad de citoquina presente en la muestra. La reacción se detiene mediante la adición de ácido sulfúrico (H₂SO₄) y se mide la absorbancia a 450 nm. Se prepara una curva estándar a partir de las siete concentraciones conocidas (estándares) de citoquina utilizada y se determina la concentración de la muestra a partir de la absorbancia medida.

5.2.5.3.2. Bazo

5.2.5.3.2.1. Recuento y porcentaje de subpoblaciones linfocitarias

Una vez pesado el órgano, se mantiene sobre una placa Petri con unos mililitros de suero salino. Una vez se ha eliminado cualquier membrana se procede a la maceración del órgano sobre una malla fina de acero inoxidable estéril de 3x3 cm

poniendo el órgano sobre ella y presionando contra la misma con el émbolo de una jeringa para homogenizar sus tejidos, proceso que finaliza cuando se obtiene una solución rojiza. Dicha solución se filtra a través de una malla de 20 μm de poro para eliminar cualquier tipo de células que pudiesen haber interferido con el procedimiento, por ejemplo tejido adiposo o conjuntivo. El resto se recoge en un tubo tipo Falcon de fondo cónico.

Se realiza un lavado añadiendo suero salino hasta un volumen final de 14 ml y se centrifuga durante 7 min. a 1000 rpm. Se obtiene por centrifugación diferencial el sobrenadante que se elimina por decantación y el precipitado se resuspende y ajusta a un volumen de 2 ml. A este volumen se agregan 5 ml de una solución lisan-te de cloruro amónico (CINH_4) al 0,85 %, dejando que actúe durante 10 min. a temperatura ambiente. Después de una segunda centrifugación (7 min. a 1000 rpm), se añade suero salino hasta un volumen final de 15 ml y se centrifuga una vez más a 1000 rpm durante 7 minutos, se elimina el sobrenadante y tras resuspender el precipitado, se le añade suero salino hasta un volumen de 5 ml.

Finalizado el procedimiento de purificación de los linfocitos de bazo, se establece la cantidad de linfocitos/ml, realizando un recuento en cámara de Neubauer. Se realiza una última centrifugación a las mismas revoluciones y tiempo que la anterior y se ajusta el volumen a 1×10^6 cel/ml. A continuación se realiza el marcaje de las células con los anticuerpos monoclonales controles: IgG-FITC, IgG-RPE Cy5, y los fenotipos: CD4-RPE, CD8-RPE, CD3-FITC, CD45RA-RPE, CD2-FITC, CD161-FITC, y se incuba durante 30 min. a temperatura ambiente protegido de la luz directa. Posteriormente, las muestras marcadas se analizan por citometría de flujo del mismo modo como se ha explicado en el apartado anterior.

5.2.5.3.3. *TIMO*

5.2.5.3.3.1. *Recuento y porcentaje de subpoblaciones linfocitarias:*

Una vez pesado, el timo se lava con solución salina 0,9 % y se procede a su mace-ración del mismo modo como se ha indicado para el caso del bazo.

5.2.5.3.4. *Placas de Peyer*

Una vez extraída la totalidad del intestino delgado y grueso, se procede a lavar el interior a presión con ayuda de una jeringa de 5 cc con suero salino para eliminar

las heces. Con ayuda de pinzas, tijeras de disección y una fuente de luz se extraen la totalidad de las placas de Peyer del intestino, se cuenta el número total de placas extraídas por rata y se colocan en placas Petri con 3 ml de solución salina al 0,9 %. Finalizada la extracción de las placas, se pasan a través de papel de filtro con el fin de limpiar la mucosa intestinal y se lavan nuevamente en solución salina con el fin de eliminar el máximo posible de restos de mucosa.

Una vez limpias las placas de Peyer, se van macerando una a una suavemente con ayuda de pinzas y del émbolo de una jeringa sobre una malla fina de acero inoxidable estéril de 3x3 cm puesta dentro de una caja Petri de poliestireno de 10 cm de diámetro, donde previamente se ha puesto de 3 a 4 cc de suero salino. Cuando las placas de Peyer estén dilaceradas en su totalidad, se coge de nuevo la malla con las pinzas y se lava con solución salina. Se recoge la suspensión de células que ha quedado después de dilaceradas con ayuda de la misma jeringa de 5 cc que se había utilizado para macerarlas.

Se filtra la suspensión pasándola a través de una malla de 20 μm de poro, se coloca en un tubo cónico tipo Falcon de 15 ml, se lleva a un volumen de 5 ml con suero salino y se centrifuga durante 5 min. a 1800 rpm a 4°C. Se decanta y se resuspende suavemente el botón, se lava nuevamente con 5 ml de solución salina y se centrifuga de nuevo durante 5 min. a 1800 rpm a 4°C. Se decanta y se resuspende nuevamente, llevándolo a un volumen de 5 ml con solución salina al 0,9%.

A continuación, se monta la cámara de Neubauer con 10 μl de la suspensión, con el fin de obtener la cantidad de linfocitos de la muestra y se ajusta a una concentración final de 1×10^6 cel/ml. Finalmente se marcan los linfocitos con los anticuerpos monoclonales correspondientes. Controles: IgG-FITC, IgG-RPE Cy5, y los fenotipos: CD4-RPE, CD8-RPE, CD3-FITC, CD45RA-RPE, CD2-FITC, CD161-FITC, incubándolos en una zona protegida de la luz directa durante 30 min. a temperatura ambiente. El volumen final que se ha de obtener para su lectura es de 800 μl . Posteriormente, las muestras marcadas se analizan por citometría de flujo.

5.2.6. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS OBTENIDOS EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

El tratamiento estadístico de los datos de los animales de experimentación se llevó a cabo en el Centro Técnico de Informática (CTI) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), mediante el programa estadístico SPSS 11.0 en Windows XP.

■ Análisis descriptivo univariante

Se realizó un cálculo de los estadísticos básicos (medias y varianzas) y se realizaron pruebas de ajuste de las distribuciones de las distintas variables de la muestra, observándose que todas seguían una distribución normal, salvo las citoquinas. Se determinaron los valores *missing-data* y *outliers*, que pudieran ser sesgos en la muestra.

■ Modelos lineales generales

Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) de una vía (grupo) de los cuatro grupos de ratas a estudiar.

Se determinó el grado de significación estadística de la diferencia entre las medias mediante el Test de Pares *a posteriori* de Bonferroni para contrastar las diferencias entre los grupos.

Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) de una vía (grupo) usando como covariantes, los parámetros de dieta y bebida.

En los casos en que la distribución normal no pudo ser asegurada, se aplicaron pruebas estadísticas no paramétricas como el test de Mann-Whitney y de Kruskal-Wallis para establecer el grado de significación entre los cuatro grupos.

■ Modelos Multivariantes

Se realizó una selección de las variables de mayor interés en el estudio; a partir de aquí se realizaron los siguientes análisis:

- Se realizó una estimación de *missing-data* para las variables señaladas basada en la media del grupo y la dependencia lineal.
- Los análisis de regresión se realizaron para la variable peso, ajustado por día, dieta y bebida, viendo la evolución del mismo a través de los días de experimentación, comparación de pendientes.
- Los gráficos realizados de líneas para el estudio de la evolución y Gráficos de Box-Whiskers.

6

DATOS EXPERIMENTALES

A continuación se muestran todas las tablas correspondientes a los resultados obtenidos en los parámetros evaluados tanto en humanos como en animales de experimentación.

En las Tablas 1-45 se presentan los datos obtenidos en el estudio realizado en humanos.

En las Tablas 46-54 se presentan los datos obtenidos en el estudio realizado en animales de experimentación.

Los datos se expresan como media \pm desviación estándar.

6.1. ESTUDIO EN HUMANOS

Tabla 1. Valoración de la ingesta dietética media diaria de energía, macronutrientes y fibra en mujeres durante el período de abstinencia alcohólica y con un consumo moderado de cerveza

	Abstinencia (n=22)	Cerveza (n=22)
Energía (kcal)	1776,86 \pm 410,39	1887,68 \pm 476,58
Proteínas (g)	79,32 \pm 14,40	78,64 \pm 15,38
Lípidos (g)	71,24 \pm 19,29	71,68 \pm 23,19
Carbohidratos (g)	212,91 \pm 62,61	226,05 \pm 66,34
Fibra (g)	14,73 \pm 4,10	16,39 \pm 6,49

Valores expresados como media \pm desviación estándar. No existen diferencias significativas en el test de muestras pareadas.

Tabla 2. Valoración de la ingesta dietética media diaria de minerales en mujeres durante el período de abstinencia alcohólica y con un consumo moderado de cerveza.

	Abstinencia (n=22)	Cerveza (n=22)
Calcio (mg)	870,95 \pm 190,25	820,82 \pm 191,51
Hierro (mg)	11,19 \pm 2,14	11,81 \pm 3,29
Yodo (μ g)	327,10 \pm 148,38	281,23 \pm 135,02*
Magnesio (mg)	258,14 \pm 48,15	279,95 \pm 70,68
Zinc (mg)	8,55 \pm 1,99	9,00 \pm 2,37
Sodio (mg)	2825,73 \pm 1240	2595,64 \pm 696,25
Potasio (mg)	2650,64 \pm 480,35	2678,50 \pm 607,30
Fósforo (mg)	1089,91 \pm 202,23	1144,00 \pm 225,02
Selenio (μ g)	42,57 \pm 18,29	46,09 \pm 25,97

Valores expresados como media \pm desviación estándar.

* Diferencias significativas ($p < 0,05$) entre abstinencia alcohólica y consumo moderado de cerveza.

Test t Student para muestras pareadas.

Tabla 3. Valoración de la ingesta dietética media diaria de vitaminas en mujeres durante el período de abstinencia alcohólica y con un consumo moderado de cerveza.

	Abstinencia (n=22)	Cerveza (n=22)
Vitamina B ₁ (mg)	1,00±0,22	1,10±0,30
Vitamina B ₂ (mg)	1,37±0,27	1,41±0,25
Eq. Niacina (mg)	25,17±4,51	25,51±4,88
Vitamina B ₆ (mg)	1,24±0,32	1,27±0,34
Folato (μg)	139,53±39,88	153,37±56,32
Vitamina B ₁₂ (μg)	3,87±1,46	5,78±2,76 *
Vitamina C (mg)	76,57±38,62	79,35±38,01
Vit. A: Eq. Retinol (μg)	614,45±224,75	788,27±486,14 *
Retinol (μg)	286,95±223,05	408,57±463,09
Carotenos (μg)	1984,14±1161,10	2322,68±1640,00
Vitamina D (μg)	3,88±1,92	3,80±4,30
Vitamina E (mg)	4,70±1,91	4,75±2,94

Valores expresados como media ± desviación estándar.

* Diferencias significativas (p<0,05) entre abstinencia alcohólica y consumo moderado de cerveza.

Test t Student para muestras pareadas.

Tabla 4. Valoración de la ingesta dietética media diaria de colesterol y ácidos grasos en mujeres durante el período de abstinencia alcohólica y con un consumo moderado de cerveza.

	Abstinencia (n=22)	Cerveza (n=22)
Colesterol (mg)	307,14±107,06	300,14±160,64
AGS (g)	24,24±6,81	24,08±7,98
AGM (g)	27,52±8,00	27,61±9,80
AGP (g)	10,32±3,23	10,15±4,88
AG trans (g)	1,46±0,52	1,55±0,67
AG no identificados (g)	1,33±0,41	1,28±0,36
AG cis (g)	30,33±8,88	29,61±11,00

Valores expresados como media ± desviación estándar. No existen diferencias significativas en el test de muestras pareadas.

Tabla 5. Valoración de la ingesta dietética media diaria de energía, macronutrientes y fibra en hombres durante el período de abstinencia alcohólica y con un consumo moderado de cerveza.

	Abstinencia (n=24)	Cerveza (n=24)
Energía (kcal)	2250,58±762,49	2306,75±496,21
Proteínas (g)	103,08±33,35	100,86±21,02
Lípidos (g)	87,99±32,50	87,17±21,99
Carbohidratos (g)	278,90±112,75	263,21±76,37
Fibra (g)	20,25±11,78	18,44±8,05

Valores expresados como media ± desviación estándar. No existen diferencias significativas en el test de muestras pareadas.

Tabla 6. Valoración de la ingesta dietética media diaria de minerales en hombres durante el período de abstinencia y con un consumo moderado de cerveza.

	Abstinencia (n=24)	Cerveza (n=24)
Calcio (mg)	979,04±425,35	920,63±284,85
Hierro (mg)	14,72±5,09	13,97±3,54
Yodo (µg)	296,25±151,61	303,75±148,90
Magnesio (mg)	306,58±116,47	322,67±62,96
Zinc (mg)	11,95±4,48	11,92±4,08
Sodio (mg)	3514,25±1576,84	3143,13±1244,60
Potasio (mg)	3066,33±968,35	3124,25±724,60
Fósforo (mg)	1353,00±547,99	1351,00±271,01
Selenio (µg)	59,35±30,00	53,61±22,74

Valores expresados como media ± desviación estándar. No existen diferencias significativas en el test de muestras pareadas.

Tabla 7. Valoración de la ingesta dietética media diaria de vitaminas en hombres durante el período de abstinencia alcohólica y con un consumo moderado de cerveza.

	Abstinencia (n=24)	Cerveza (n=24)
Vitamina B ₁ (mg)	1,30±0,50	1,28±0,33
Vitamina B ₂ (mg)	1,64±0,62	1,79±0,46
Eq. Niacina (mg)	30,01±8,13	32,28±6,26
Vitamina B ₆ (mg)	1,53±0,63	1,39±0,37
Folato (µg)	153,23±68,70	162,56±46,73
Vitamina B ₁₂ (µg)	6,00±2,77	7,32±3,63
Vitamina C (mg)	65,77±28,42	61,78±27,14
Vit. A: Eq. retinol (µg)	901,96±550,83	868,42±547,07
Retinol (µg)	476,92±478,79	498,42±533,26
Carotenos (µg)	1719,54±1420,55	1805,33±1212,81
Vitamina D (µg)	3,70±3,54	4,38±1,88
Vitamina E (mg)	4,87±2,12	4,60±1,44

Valores expresados como media ± desviación estándar. No existen diferencias significativas en el test de muestras pareadas.

Tabla 8. Valoración de la ingesta dietética media diaria de colesterol y ácidos grasos en hombres durante el período de abstinencia alcohólica y con un consumo moderado de cerveza.

	Abstinencia (n=24)	Cerveza (n=24)
Colesterol (mg)	364,12±130,14	397,58±119,30
AGS (g)	29,35±12,65	28,92±8,33
AGM (g)	32,22±11,89	31,81±8,24
AGP (g)	12,82±5,87	12,98±4,85
AG trans (g)	1,83±1,00	2,03±1,08
AG no identificados (g)	1,58±0,65	1,52±0,37
AG cis (g)	36,66±14,26	35,39±11,55

Valores expresados como media ± desviación estándar. No existen diferencias significativas en el test de muestras pareadas.

Tabla 9. Valoración de la ingesta dietética media diaria en mujeres (1) y hombres (2), durante el período de abstinencia alcohólica y con consumo moderado de cerveza.

	Abstinencia (n=22)	Cerveza (n=22)
Alcohol (g) (1)	0±0,01	11,44±5,59 *
Alcohol (g) (2)	0±0,01	20,50±0,02*

Valores expresados como media ± desviación estándar.

* Diferencias significativas ($p<0,05$) entre abstinencia alcohólica y consumo moderado de cerveza.

Test t Student para muestras pareadas.

Tabla 10. Consumo semanal de alimentos clasificados por grupos en mujeres durante el período de abstinencia y con un consumo moderado de cerveza.

	Abstinencia (n=22)	Cerveza (n=22)
Cereales (g)	1316±580,5	1339±624,7
Lácteos (g)	2632±1027	2203±770,9 *
Huevos (g)	213,1±137,2	199,41±151,8
Azúcares (g)	117,1±67,23	132,9±106,6
Aceites (g)	117,9±58,76	98,00±51,47
Verduras y hortalizas (g)	1524±658,1	1352±626,1
Legumbres (g)	105,3±66,21	146,3±138,7
Frutas (g)	1457±828,3	1628±901,4

Valores expresados como media ± desviación estándar.

* Diferencias significativas ($p<0,05$) entre abstinencia alcohólica y consumo moderado de cerveza. Test-t muestras pareadas.

Tabla 11. Consumo semanal de alimentos clasificados por grupos en mujeres, en un período de abstinencia alcohólica y con un consumo moderado de cerveza.

	Abstinencia (n=22)	Cerveza (n=22)
Carnes (g)	875,9±300,2	908,8±342,1
Pescados (g)	676,3±307,8	545,9±342,9
Bebidas alcohólicas (g)	0,4±0,00	2364±244,78*
Bebidas no alcohólicas (g)	2916±1583	1870±1295 *
Salsas y condimentos (g)	3638±3918	2126±2498 *
Precocinados (g)	208,5±176,5	315,0±237,5 *
Aperitivos (g)	61,91±43,03	157,5±162,3

Valores expresados como media ± desviación estándar.

* Diferencias significativas ($p<0,05$) entre abstinencia alcohólica y consumo moderado de cerveza. Test-t muestras pareadas.

Tabla 12. Consumo semanal de alimentos clasificados por grupos en hombres, en un período de abstinencia alcohólica y con un consumo moderado de cerveza.

	Abstinencia (n=25)	Cerveza (n=25)
Cereales (g)	1672±1037	1530±661,4
Lácteos (g)	2715±1756	2446±1027
Huevos (g)	238,5±157,0	272,0±129,7
Azúcares (g)	151,43±127,7	149,5±111,3
Aceites (g)	98,36±69,00	93,80±58,76
Verduras y hortalizas (g)	1446±736,4	1347±571,0
Legumbres (g)	231,0±219,0	205,0±182,6
Frutas (g)	1626±1089	1387±1179

Valores expresados como media ± desviación estándar. No existen diferencias significativas en el test de muestras pareadas.

Tabla 13. Consumo semanal de alimentos clasificados por grupos en hombres, en un período de abstinencia alcohólica y con un consumo moderado de cerveza.

	Abstinencia (n=25)	Cerveza (n=25)
Carnes (g)	1196±485,2	1329±645,8
Pescados (g)	594,7±360,5	528,2±390,8
Bebidas alcohólicas (g)	0,5±0,01	4620±0,626 *
Bebidas no alcohólicas (g)	2462±1933	1415±891,4 *
Salsas y condimentos (g)	4422±4617	1889±2157 *
Precocinados (g)	340,1±275,2	344,2±224,3
Aperitivos (g)	92,92±87,91	91,00±64,64

Valores expresados como media ± desviación estándar.

* Diferencias significativas ($p<0,05$) entre abstinencia alcohólica y consumo moderado de cerveza. Test-t muestras pareadas.

Tabla 14. Antropometría en mujeres en estado basal, después del período de abstinencia alcohólica y después de un consumo moderado de cerveza.

	Basal (n=27)	Abstinencia (n=27)	Cerveza (n=27)
Peso (kg)	60,89±4,26	60,95±4,03	61,99±2,82
Talla (cm)	159,55±0,04	159,55±0,04	159,55±0,04
Pliegue bicipital (mm)	7,26±2,31	7,35±1,68	7,34±1,78
Pliegue tricipital (mm)	17,14±4,19	17,00±4,16	17,56±4,31
Pliegue subescapular (mm)	20,17±7,30	20,89±5,65	20,65±5,83
Pliegue supraílico (mm) *	17,50±5,80 ^a	18,83±5,69 ^a	20,29±4,88 ^b
Perímetro brazo (cm) *	29,32±2,58 ^a	28,93±2,59 ^b	28,71±2,59 ^b
Perímetro cintura (cm)	77,60±5,46	77,67±5,02	77,56±4,58
Perímetro cadera (cm)	96,53±6,15	95,69±4,68	95,40±4,45
IMC (kg/m ²)	24,02±2,75	24,03±2,49	24,05±2,47
Índice cintura/cadera	0,80±0,05	0,81±0,03	0,81±0,04

Valores expresados como media ± desviación estándar.

* Diferencias significativas ($p<0,05$) entre abstinencia alcohólica y consumo moderado de cerveza. Test-t muestras pareadas.

Letras distintas indican diferencias significativas ($p<0,05$) entre los puntos (a,b,c).

Tabla 15. Antropometría en hombres en estado basal, después del período de abstinencia alcohólica y después de un consumo moderado de cerveza.

	Basal (n=30)	Abstinencia (n=30)	Cerveza (n=30)
Peso (kg)	73,00±8,32	73,10±8,68	73,54±8,40
Talla (cm)	172,87±0,75	172,87±0,75	172,87±0,75
Pliegue bicipital (mm)	5,65±2,57	5,87±2,80	5,84±2,68
Pliegue tricipital (mm) *	10,39±3,22 ^a	10,73±3,56 ^{ab}	10,98±3,51 ^b
Pliegue subescapular (mm)	13,79±4,19	13,74±3,80	13,93±3,92
Pliegue suprailiaco (mm)	13,87±6,22	14,19±5,85	14,92±5,94
Perímetro brazo (cm)	31,77±3,00	31,67±3,03	31,87±3,17
Perímetro cintura (cm)	85,49±6,42	86,01±6,52	85,82±6,08
Perímetro cadera (cm)	95,35±4,02	94,83±3,90	94,69±3,93
IMC (kg/m ²)	24,45±2,63	24,47±2,61	24,62±2,57
Índice cintura/cadera	0,89±0,03	0,90±0,03	0,90±0,03

Valores expresados como media ± desviación estándar.

* Diferencias significativas ($p<0,05$) entre abstinencia alcohólica y consumo moderado de cerveza. Test-t muestras pareadas.

Letras distintas indican diferencias significativas ($p<0,05$) entre los puntos (a,b,c).

Tabla 16. Parámetros hematológicos (serie eritrocitaria) en mujeres en estado basal, después de un período de abstinencia alcohólica y después de un consumo moderado de cerveza.

	Basal (n=27)	Abstinencia (n=27)	Cerveza (n=27)
Hemáties ($\times 10^{12}/l$) *	4,22±0,26 ^a	4,26±0,25 ^a	4,37±0,28 ^b
Hemoglobina (g/dl) *	13,07±1,08 ^a	13,10±1,14 ^a	13,33±1,28 ^b
Hematocrito (%) *	38,13±3,19 ^a	37,89±3,10 ^a	39,44±3,35 ^b
VCM (fl) *	90,26±5,02 ^a	88,83±5,07 ^b	90,26±5,19 ^a
HCM (pg) *	30,93±1,92 ^a	30,72±2,05 ^a	30,48±2,13 ^b
CHCM (g/dl) *	34,26±0,55 ^a	34,57±0,80 ^a	33,76±0,88 ^b
IDH (%)	14,16±1,97	14,01±1,69	14,15±1,45

Valores expresados como media ± desviación estándar.

* Diferencias significativas ($p<0,05$) entre abstinencia alcohólica y consumo moderado de cerveza. Test-t muestras pareadas.

* Letras distintas indican diferencias significativas ($p<0,05$) entre los puntos (a,b,c). Test-t muestras pareadas entre: estado basal, período de abstinencia y consumo moderado de cerveza.

Tabla 17. Parámetros hematológicos (serie blanca), en mujeres en estado basal, después de un período de abstinencia alcohólica y después de un consumo moderado de cerveza.

	Basal (n=27)	Abstinencia (n=27)	Cerveza (n=27)
Leucocitos ($\times 10^9/l$) *	6,34±1,26 ^a	6,76±1,44 ^b	7,27±1,97 ^b
Neutrófilos ($\times 10^9/l$) *	3,43±0,88 ^a	3,69±1,17 ^{ab}	4,13±1,53 ^b
Linfocitos ($\times 10^9/l$) *	2,14±0,50	2,32±0,55 ^b	2,38±0,63 ^b
Eosinófilos ($\times 10^9/l$)	0,19±0,18	0,19±0,12	0,18±0,12
Monocitos ($\times 10^9/l$)	0,51±0,15	0,47±0,14	0,49±0,15
Basófilos ($\times 10^9/l$) *	0,05±0,02 ^a	0,05±0,03 ^{ab}	0,06±0,03 ^b

Valores expresados como media ± desviación estándar.

Diferencias significativas ($p<0,05$) entre abstinencia alcohólica y consumo moderado de cerveza.

* Letras distintas indican diferencias significativas ($p<0,05$) entre los puntos (a,b,c).

Test-t muestras pareadas entre: estado basal, período de abstinencia y consumo moderado de cerveza.

Tabla 18. *Parámetros hematológicos (perfil leucocitario), en mujeres en estado basal, después de un periodo de abstinencia alcohólica y después de un consumo moderado de cerveza.*

	Basal (n=27)	Abstinencia (n=27)	Cerveza (n=27)
Neutrófilos (%)	53,75±6,36	53,82±8,42	55,93±7,95
Linfocitos (%)	34,02±5,90	35,12±7,95	33,59±7,50
Monocitos (%) *	8,31±3,06 ^a	7,13±1,76 ^{ab}	6,80±1,68 ^b
Eosinófilos (%)	2,96±2,14	2,85±1,71	2,66±1,71
Basófilos (%)	0,84±0,36	0,85±0,44	0,87±0,42

Valores expresados como media ± desviación estándar.

* Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los puntos (a,b,c).

Test-t muestras pareadas entre: estado basal, periodo de abstinencia y consumo moderado de cerveza.

Tabla 19. *Parámetros hematológicos (serie trombocítica), en mujeres en estado basal, después de un periodo de abstinencia alcohólica y después de un consumo moderado de cerveza.*

	Basal (n=27)	Abstinencia (n=27)	Cerveza (n=27)
Plaquetas ($\times 10^9/l$) *	251,59±48,89 ^a	275,62±49,34 ^b	279,17±53,02 ^b
VPM (fl)	9,56±0,83	9,52±0,80	9,66±0,80
PDW (%)	2,88±0,19	2,95±0,32	2,91±0,27
PTC (%) *	0,24±0,04 ^a	0,26±0,04 ^b	0,26±0,04 ^b

Valores expresados como media ± desviación estándar.

* Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los puntos (a,b,c).

Test-t muestras pareadas entre: estado basal, periodo de abstinencia y consumo moderado de cerveza.

Tabla 20. *Parámetros hematológicos (serie eritrocitaria), en hombres en estado basal, después de un periodo de abstinencia alcohólica y después de un consumo moderado de cerveza.*

	Basal (n=30)	Abstinencia (n=30)	Cerveza (n=30)
Hematíes ($\times 10^{12}/l$) *	4,86±0,31 ^a	4,93±0,37 ^{ab}	4,99±0,33 ^b
Hemoglobina (g/dl)	14,87±0,82	14,99±1,01	15,02±0,96
Hematocrito (%) *	43,35±2,48 ^a	43,15±3,00 ^a	44,70±2,76 ^b
VCM (fl) *	89,22±3,70 ^a	87,54±3,39 ^b	89,62±3,64 ^a
HCM (pg) *	30,59±1,23 ^a	30,41±1,36 ^a	30,12±1,41 ^b
CHCM (g/dl) *	34,29±0,52 ^a	34,63±0,69 ^b	33,61±0,66 ^c
IDH (%)	14,19±0,76	14,20±0,70	14,17±0,86

Valores expresados como media ± desviación estándar.

* Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los puntos (a,b,c).

Test-t muestras pareadas entre: estado basal, periodo de abstinencia y consumo moderado de cerveza.

Tabla 21. Parámetros hematológicos (serie blanca), en hombres en estado basal, después de un período de abstinencia alcohólica y después de un consumo moderado de cerveza.

	Basal (n=30)	Abstinencia (n=30)	Cerveza (n=30)
Leucocitos (x10 ⁹ /l)	6,19±1,28	5,95±1,05	6,14±1,34
Neutrófilos (x10 ⁹ /l)	3,33±0,88	3,06±0,79	3,24±1,10
Linfocitos (x10 ⁹ /l)	2,11±0,57	2,17±0,43	2,20±0,51
Eosinófilos (x10 ⁹ /l)	0,17±0,10	0,18±0,09	0,18±0,09
Monocitos (x10 ⁹ /l)	0,48±0,17	0,46±0,14	0,45±0,14
Basófilos (x10 ⁹ /l) *	0,05±0,03 ^a	0,06±0,02 ^{ab}	0,06±0,03 ^b

Valores expresados como media ± desviación estándar.

* Letras distintas indican diferencias significativas (p<0,05) entre los puntos (a,b,c).

Test-t muestras pareadas entre: estado basal, período de abstinencia y consumo moderado de cerveza.

Tabla 22. Parámetros hematológicos (perfil leucocitario), en hombres en estado basal, después de un período de abstinencia alcohólica y después de un consumo moderado de cerveza.

	Basal (n=30)	Abstinencia (n=30)	Cerveza (n=30)
Neutrófilos (%)	53,59±7,68	51,06±6,87	52,13±8,01
Linfocitos (%)	34,53±7,20	36,93±6,44	36,35±7,19
Monocitos (%) *	7,90±2,19 ^{ab}	7,82±2,04 ^a	7,36±1,68 ^b
Eosinófilos (%)	2,84±1,60	3,09±1,69	3,01±1,59
Basófilos (%) *	0,89±0,45 ^a	0,99±0,40 ^{ab}	1,05±0,43

Valores expresados como media ± desviación estándar.

* Letras distintas indican diferencias significativas (p<0,05) entre los puntos (a,b,c).

Test-t muestras pareadas entre: estado basal, período de abstinencia y consumo moderado de cerveza.

Tabla 23. Parámetros hematológicos (serie trombocítica), en hombres en estado basal, después de un período de abstinencia alcohólica y después de un consumo moderado de cerveza.

	Basal (n=30)	Abstinencia (n=30)	Cerveza (n=30)
Plaquetas (x10 ⁹ /l) *	228,66±41,82 ^a	243,07±37,74 ^b	238,17±36,76 ^{ab}
VPM (fl) *	9,82±1,22 ^a	10,25±1,59 ^b	10,29±1,79 ^{ab}
PDW (%)	3,00±0,36	2,93±0,19	2,93±0,19
PTC (%) *	0,22±0,03 ^a	0,24±0,03 ^b	0,24±0,04 ^b

Valores expresados como media ± desviación estándar.

* Letras distintas indican diferencias significativas (p<0,05) entre los puntos (a,b,c).

Test-t muestras pareadas entre: estado basal, período de abstinencia y consumo moderado de cerveza.

Tabla 24. *Parámetros bioquímicos en mujeres, en estado basal, después de un período de abstinencia alcohólica y después de un consumo moderado de cerveza.*

	Basal (n=27)	Abstinencia (n=27)	Cerveza (n=27)
Glucosa basal (mg/dl)	88,07±9,73	90,44±8,08	90,96±12,72
Colesterol total (mg/dl) *	190,40±31,57 ^{ab}	186,11±30,21 ^a	196,18±34,04 ^b
Colesterol HDL (mg/dl) *	60,70±11,50 ^a	57,77±14,25 ^a	66,88±12,44 ^b
Colesterol LDL (mg/dl)	114,70±31,71	113,07±26,29	114,22±29,97
Triglicéridos (mg/dl)	4,25±0,37	4,28±0,33	4,25±0,36
Ácido úrico (mg/dl) *	4,19±0,81 ^{ab}	4,00±0,81 ^a	4,20±0,88 ^b
Urea (mg/dl)	28,77±5,05	28,14±5,57	29,07±6,01

Valores expresados como media ± desviación estándar.

* Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los puntos (a,b,c).

Test-t muestras pareadas entre: estado basal, período de abstinencia y consumo moderado de cerveza.

Tabla 25. *Parámetros bioquímicos (enzimas y proteínas) en mujeres, en estado basal, después de un período de abstinencia alcohólica y después de un consumo moderado de cerveza.*

	Basal (n=27)	Abstinencia (n=27)	Cerveza (n=27)
GOT (U/l)	15,55±4,58	15,51±4,07	16,25±3,54
GPT (U/l)	7,59±4,57	8,77±4,61	9,70±5,48
GGT (U/l) *	14,22±9,20 ^{ab}	13,85±7,34 ^a	14,88±7,44 ^b
Proteínas totales (g/dl)	7,18±0,39	7,12±0,28	7,16±0,36
Albumina (g/dl) *	4,24±0,28 ^a	4,26±0,20 ^a	4,09±0,28 ^b
Prealbumina (mg/dl)	23,96±2,84	24,37±2,28	24,03±3,19
Ferritina (ng/ml) *	3,69±0,91 ^a	3,68±0,84 ^{ab}	3,57±0,95 ^b

Valores expresados como media ± desviación estándar.

* Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los puntos (a,b,c).

Test-t muestras pareadas entre: estado basal, período de abstinencia y consumo moderado de cerveza.

Tabla 26. *Parámetros bioquímicos en hombres, en estado basal, después de un período de abstinencia alcohólica y después de un consumo moderado de cerveza.*

	Basal (n=30)	Abstinencia (n=30)	Cerveza (n=30)
Glucosa basal (mg/dl)	88,93±29,96	92,96±5,88	92,96±7,77
Colesterol total (mg/dl)	209,40±31,38	204,86±34,9	211,20±29,67
Colesterol-HDL (mg/dl) *	44,20±6,68 ^a	41,33±7,0 ^b	46,50±7,92 ^a
Colesterol-LDL (mg/dl)	138,40±27,35	138,56±33,37	138,68±28,25
Triglicéridos (mg/dl)	4,86±0,55	4,79±0,41	4,84±0,52
Ácido úrico (mg/dl)	6,08±1,20	5,89±1,04	6,11±1,06
Urea (mg/dl)	35,83±7,12	37,83±8,47	35,13±6,36

Valores expresados como media ± desviación estándar.

* Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los puntos (a,b,c).

Test-t muestras pareadas entre: estado basal, período de abstinencia y consumo moderado de cerveza.

Tabla 27. *Parámetros bioquímicos (enzimas y proteínas) en hombres, en estado basal, después de un periodo de abstinencia alcohólica y después de un consumo moderado de cerveza.*

	Basal (n=30)	Abstinencia (n=30)	Cerveza (n=30)
GOT (U/l)	20,13±5,67	20,73±5,13	20,86±5,12
GPT (U/l) *	13,00±5,82 ^a	15,00±7,17 ^b	14,00±6,09 ^{a,b}
GGT (U/l) *	22,93±14,98 ^{a,b}	19,96±9,51 ^a	21,63±9,34 ^b
Proteínas totales (g/dl)	7,30±0,38	7,24±0,38	7,19±0,43
Albumina (g/dl) *	4,43±0,20 ^a	4,42±0,21 ^a	4,22±0,24 ^b
Prealbumina (mg/dl) *	27,80±3,04 ^a	29,16±3,09 ^b	29,56±3,52 ^b
Ferritina (ng/ml)	4,87±0,85	4,86±0,91	4,83±0,91

Valores expresados como media ± desviación estándar.

* Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los puntos (a,b,c).

Test-t muestras pareadas entre: estado basal, período de abstinencia y consumo moderado de cerveza.

Tabla 28. *Capacidad fagocítica y oxidativa en mujeres, en estado basal, después de un periodo de abstinencia alcohólica y después de un consumo moderado de cerveza.*

	Basal (n=27)	Abstinencia (n=27)	Cerveza (n=27)
B Coli (%) *	33,90±19,00 ^a	42,90±23,37 ^{a,b}	48,86±21,83 ^b
F Coli (%)	54,02±23,49	53,58±22,75	62,33±21,09

Valores expresados como media ± desviación estándar.

* Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los puntos (a,b,c).

Test-t muestras pareadas entre: estado basal, período de abstinencia y consumo moderado de cerveza.

Tabla 29. *Capacidad fagocítica y oxidativa en hombres, en estado basal, después de un periodo de abstinencia alcohólica y después de un consumo moderado de cerveza.*

	Basal (n=30)	Abstinencia (n=30)	Cerveza (n=30)
B Coli (%) *	27,39±18,13 ^a	34,98±25,40 ^{a,b}	39,25±24,53 ^b
F Coli (%)	50,74±29,17	51,16±23,97	57,29±26,93

Valores expresados como media ± desviación estándar.

* Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los puntos (a,b,c).

Test-t muestras pareadas entre: estado basal, período de abstinencia y consumo moderado de cerveza.

Tabla 30. *Factores del complemento, en mujeres, en estado basal, después de un periodo de abstinencia y después de un consumo moderado de cerveza.*

	Basal (n=27)	Abstinencia (n=27)	Cerveza (n=27)
Complemento C3 * (g/l)	1,09±0,16 ^{a,b}	1,06±0,13 ^a	1,14±0,21 ^b
Complemento C4 * (g/l)	0,21±0,06 ^a	0,19±0,05 ^b	0,21±0,06 ^a

Valores expresados como media ± desviación estándar.

* Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los puntos (a,b,c).

Test-t muestras pareadas entre: estado basal, período de abstinencia y consumo moderado de cerveza.

Tabla 31. Factores del complemento, en hombres, en estado basal, después de un período de abstinencia y después de un consumo moderado de cerveza.

	Basal (n=30)	Abstinencia (n=30)	Cerveza (n=30)
Complemento C3 (g/l)	1,31±0,18	1,30±0,17	1,31±0,19
Complemento C4 (g/l)	0,25±0,06	0,24±0,05	0,25±0,06

Valores expresados como media ± desviación estándar.

No existen diferencias significativas en el test de muestras pareadas

Tabla 32. Subpoblaciones linfocitarias en valores absolutos, en mujeres, en estado basal, después de un período de abstinencia alcohólica y después de un consumo moderado de cerveza.

	Basal (n=29)	Abstinencia (n=29)	Cerveza (n=29)
CD2 (cel/ml)	1379,87±616,60	1511,43±644,66	1547,97±599,10
CD3 * (cel/ml)	1045,31±532,97 ^a	1291,05±626,07 ^a	1465,34±519,65 ^b
CD4 * (cel/ml)	669,78±371,95 ^a	816,85±476,66 ^{ab}	911,44±393,40 ^b
CD8 * (cel/ml)	374,50±217,18 ^a	459,33±218,51 ^{ab}	499,86±210,19 ^b
CD19 * (cel/ml)	146,26±89,80 ^a	188,26±125,21 ^{ab}	212,76±100,39 ^b

Valores expresados como media ± desviación estándar.

* Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los puntos (a,b,c).

Test-t muestras pareadas entre: estado basal, período de abstinencia y consumo moderado de cerveza.

Tabla 33. Subpoblaciones linfocitarias en valores absolutos, en hombres, en estado basal, después de un período de abstinencia alcohólica y después de un consumo moderado de cerveza.

	Basal (n=29)	Abstinencia (n=29)	Cerveza (n=29)
CD2 (cel/ml)	1485,18±663,26	1424,76±499,88	1278,98±597,61
CD3 (cel/ml)	1159,25±547,42	1141,84±478,84	1228,51±531,72
CD4 (cel/ml)	689,23±329,34	727,07±325,44	768,50±327,34
CD8 (cel/ml)	439,43±236,66	432,91±222,37	459,24±218,38
CD19 (cel/ml)	258,64±196,18	212,79±132,75	218,41±138,07

Valores expresados como media ± desviación estándar.

No existen diferencias significativas.

Tabla 34. Porcentaje de subpoblaciones linfocitarias y cociente CD4/CD8, en mujeres, en estado basal, después de un período de abstinencia alcohólica y después de un consumo moderado de cerveza.

	Basal (n=27)	Abstinencia (n=27)	Cerveza (n=27)
CD2 * (%)	73,70±11,62 ^a	65,03±15,69 ^b	64,90±9,88 ^b
CD3 * (%)	55,91±13,84 ^a	54,77±17,09 ^a	59,67±10,89 ^b
CD4 (%)	35,20±11,16	37,09±10,60	38,07±9,25
CD8 (%)	19,41±8,15	19,56±8,06	20,30±5,83
CD19(%)	7,95±3,26	7,76±3,74	8,89±2,98
CD4/CD8	2,11±1,16	2,05±1,15	2,02±1,07

Valores expresados como media ± desviación estándar.

* Letras distintas indican diferencias significativas ($p<0,05$) entre los puntos (a,b,c).

Test-t muestras pareadas entre: estado basal, período de abstinencia y consumo moderado de cerveza

Tabla 35. Porcentaje de subpoblaciones linfocitarias y cociente CD4/CD8, en hombres, en estado basal, después de un período de abstinencia alcohólica y después de un consumo moderado de cerveza.

	Basal (n=30)	Abstinencia (n=30)	Cerveza (n=30)
CD2 * (%)	72,63±12,20 ^a	67,42±12,21 ^a	60,22±16,97 ^b
CD3 (%)	57,15±11,05	57,34±12,47	58,07±15,22
CD4 (%)	34,71±9,52	36,05±10,50	35,18±10,29
CD8 (%)	21,34±5,72	21,43±8,52	21,85±7,23
CD19 (%)	11,54±4,81	9,96±5,13	10,34±4,44
CD4/CD8	1,69±0,58	2,06±1,64	1,96±1,44

Valores expresados como media ± desviación estándar.

* Letras distintas indican diferencias significativas ($p<0,05$) entre los puntos (a,b,c).

Test-t muestras pareadas entre: estado basal, período de abstinencia y consumo moderado de cerveza.

Tabla 36. Test cutáneo, en mujeres, en estado basal, después de un período de abstinencia alcohólica y después de un consumo moderado de cerveza.

	Basal	Abstinencia	Cerveza
Número de respuestas positivas *	1,90±0,87 ^a	1,25±1,03 ^b	2,11±1,61 ^{ab}
Score (mm)	6,28±2,57	4,86±4,37	7,83±3,95

Valores expresados como media ± desviación estándar.

* Letras distintas indican diferencias significativas ($p<0,05$) entre los puntos (a,b,c).

Test-t muestras pareadas entre: estado basal, período de abstinencia y consumo moderado de cerveza.

Tabla 37. Test cutáneo, en hombres, en estado basal, después de un período de abstinencia alcohólica y después de un consumo moderado de cerveza.

	Basal	Abstinencia	Cerveza
Número de respuestas positivas * Score (mm)	3,57±1,39 ^a 10,64±6,48	2,43±0,97 ^b 7,67±3,39	3,14±0,90 ^{ab} 11,21±3,06

Valores expresados como media ± desviación estándar.

* Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los puntos (a,b,c).

Test-t muestras pareadas entre: estado basal, período de abstinencia y consumo moderado de cerveza.

Tabla 38. Clasificación por tipo de respuesta en el test cutáneo, en mujeres, en estado basal, después de un período de abstinencia alcohólica y después de un consumo moderado de cerveza.

	Basal	Abstinencia	Cerveza
Anergia (%)	0	22,22	11,11
Hipoergia (%)	40	33,33	11,11
Respuesta baja (%)	50	33,33	33,33
Respuesta normal (%)	10	11,1	44,44

Valores expresados en porcentajes.

Tabla 39. Clasificación por tipo de respuesta en el test cutáneo, en hombres, en estado basal, después de un período de abstinencia alcohólica y después de un consumo moderado de cerveza.

	Basal	Abstinencia	Cerveza
Anergia (%)	0	0	0
Hipoergia (%)	42,8	57,1	42,8
Respuesta baja (%)	42,8	42,9	57,2
Respuesta normal (%)	14,4	0	0

Valores expresados en porcentajes.

Tabla 40. Producción de citoquinas por PMBC, en mujeres, en estado basal, después de un período de abstinencia alcohólica y después de un consumo moderado de cerveza.

	Basal (n=27)	Abstinencia (n=27)	Cerveza (n=27)
IL-2 * # (pg/ml)	68,73±135,05 ^{a,1}	85,53±143,82 ^{a,1}	352,33±421,20 ^{b,2}
IFN-γ * # (pg/ml)	5975,30±16302,93 ^{a,1,2}	3084,84 ± 253,59 ^{a,2}	9659,24±13546,01 ^{b,2}
IL-4 * # (pg/ml)	22,46±25,57 ^{a,1}	19,85±27,01 ^{a,1}	67,63±57,91 ^{b,2}
IL-10 * # (pg/ml)	84,70±86,46 ^{a,1}	388,33±542,30 ^{b,2}	923,86±744,85 ^{c,3}
TNF-α * # (pg/ml)	1313,21±1994,82 ^{2a}	1197,68±1066,06 ^{ab}	1751,308±1597,72 ^b
IL-6 * # (pg/ml)	20978,66±24889,43 ^{a,1}	41162,24±57291,06 ^{a,12}	40554,87±22046,27 ^{b,2}

Valores expresados como media ± desviación estándar.

* Letras distintas indican diferencias significativas (p<0,05) entre los puntos (a,b,c).

Test-t muestras pareadas entre: estado basal, período de abstinencia y consumo moderado de cerveza

Números distintos indican diferencias significativas (p<0,05) entre los puntos (a,b,c). Test aplicado: rangos de Wilcoxon con cálculo de probabilidad exacta.

Tabla 41. Producción de citoquinas por PMBC, en hombres, en estado basal, después de un período de abstinencia alcohólica y después de un consumo moderado de cerveza.

	Basal (n=30)	Abstinencia (n=30)	Cerveza (n=30)
IL-2 * # (pg/ml)	122,21±152,56 ^{a,1}	98,69±113,19 ^{a,1}	541,27±774,818 ^{b,2}
IFN-γ * # (pg/ml)	13671,07±30351,68 ^{ab,1}	2670,36±2769,31 ^{a,2}	8878,90±7811,81 ^{b,2}
IL-4 * # (pg/ml)	29,90±35,15 ^{ab,1}	24,46±27,74 ^{a,1}	43,30±32,83 ^{b,2}
IL-10 * # (pg/ml)	110,083±100,972 ^{a,1}	243,10±294,08 ^{b,2}	801,526±957,72 ^{c,3}
TNF-α * # (pg/ml)	1324,65±900,18	1266,73±1044,92	1391,14±721,80
IL-6 * # (pg/ml)	20546,29±21519,52	26335,26±19995,10	25256,27±15457,54

Valores expresados como media ± desviación estándar.

* Letras distintas indican diferencias significativas (p<0,05) entre los puntos (a,b,c).

Test-t muestras pareadas entre: estado basal, período de abstinencia y consumo moderado de cerveza

Números distintos indican diferencias significativas (p<0,05) entre los puntos (a,b,c). Test aplicado: rangos de Wilcoxon con cálculo de probabilidad exacta.

Tabla 42. Valores máximos y mínimos de la producción de citoquinas por PBMC, en mujeres, en estado basal, después de un período de abstinencia alcohólica y después de un consumo moderado de cerveza.

	Basal (n=22)		Abstinencia (n=22)		Cerveza (n=22)	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
IL-2 * # (pg/ml)	00,0	687,3	2,40	550,9	39,30	1631
IFN-γ * # (pg/ml)	19,40	83978	3,30	38673	50,00	1381
IL-4 * # (pg/ml)	1,90	116,4	1,20	115,6	15,40	225,6
IL-10 * # (pg/ml)	00,0	327,2	2,30	1907	57,50	3500
TNF-α * # (pg/ml)	22,00	7782	26,90	3562	92,60	7549
IL-6 * # (pg/ml)	14,60	99035	73,60	303363	10115	123668

Tabla 43. Valores máximos y mínimos de la producción de citoquinas por PBMC, en hombres, en estado basal, después de un período de abstinencia alcohólica y después de un consumo moderado de cerveza.

	Basal (n=27)		Abstinencia (n=27)		Cerveza (n=27)	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
IL-2 * # (pg/ml)	0,00	583,7	0,00	451,1	5,70	3797
IFN- γ * # (pg/ml)	19,10	154340	36,20	8650	335,6	35844
IL-4 * # (pg/ml)	4,70	184,6	0,00	121,7	3,3	119,2
IL-10 * # (pg/ml)	6,60	369,9	0,00	1433	51,00	4285
TNF- α * (pg/ml)	190,7	3099	23,60	4126	173,1	3570
IL-6 * # (pg/ml)	12,10	94226	1,90	77832	4767	59988

Tabla 44. Inmunoglobulinas séricas, en mujeres, en estado basal, después de un período de abstinencia alcohólica y después de un consumo moderado de cerveza.

	Basal (n=27)	Abstinencia (n=27)	Cerveza (n=27)
Ig G (mg/dl)*	1071,81 \pm 202,56 ^a	1039,66 \pm 184,87 ^b	1130,85 \pm 203,03 ^c
Ig A (mg/dl)*	201,03 \pm 70,93 ^a	207,77 \pm 75,91 ^b	214,59 \pm 77,58 ^c
Ig M (mg/dl)*	156,14 \pm 61,90 ^a	148,48 \pm 60,79 ^b	157,81 \pm 60,08 ^a

Valores expresados como media \pm desviación estándar.

* Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los puntos (a,b,c).

Test-t muestras pareadas entre: estado basal, período de abstinencia y consumo moderado de cerveza.

Tabla 45. Inmunoglobulinas séricas, en hombres, en estado basal, después de un período de abstinencia alcohólica y después de un consumo moderado de cerveza.

	Basal (n=27)	Abstinencia (n=27)	Cerveza (n=27)
Ig G (mg/dl)*	966,23 \pm 181,32 ^a	957,73 \pm 193,29 ^a	1027,00 \pm 217,40 ^b
Ig A (mg/dl)*	204,20 \pm 84,30 ^a	206,03 \pm 85,81 ^a	215,36 \pm 82,91 ^b
Ig M (mg/dl)*	136,50 \pm 68,73 ^{ab}	123,93 \pm 53,65 ^a	136,56 \pm 63,41 ^b

Valores expresados como media \pm desviación estándar.

* Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los puntos (a,b,c).

Test-t muestras pareadas entre: estado basal, período de abstinencia y consumo moderado de cerveza.

6.2. ESTUDIOS EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Tabla 46. *Parámetros dietéticos en ratas control, con consumo moderado de cerveza, con cerveza sin alcohol o con consumo moderado de etanol.*

	Control (n=10)	Cerveza (n=10)	Cerveza sin alcohol (n=10)	Etanol (n=10)
Ingesta de dieta (g)*	22,39±4,74 ^a	17,85±2,77 ^{bc}	18,33±2,42 ^{bc}	18,78±1,62 ^{ac}
Sustancia fresca (ssf) (g)*	22,39±4,74 ^a	17,85±2,77 ^{bc}	18,33±2,42 ^{bc}	18,78±1,62 ^{ac}
Sustancia seca (sss) (g)*	20,80±4,80 ^a	17,03±2,65 ^b	18,06±2,37 ^{ac}	17,36±1,79 ^{ab}
Ingesta de bebida (ml)*	22,98±3,70 ^a	33,19±4,45 ^b	57,55±29,53 ^c	18,45±1,70 ^a

Valores expresados como media ± desviación estándar.

* Valores de varianza (ANOVA) de una vía, factor fijo (grupo), corregido por la dieta y la bebida (covariantes).

Letras distintas indican diferencias significativas entre los grupos de control, con consumo moderado de cerveza, cerveza sin alcohol y etanol.

Test de pares de Bonferroni entre grupos ($p=0,05$).

Tabla 47. *Parámetros ponderales en ratas control, con consumo moderado de cerveza, con cerveza sin alcohol o con consumo moderado de etanol.*

	Control (n=10)	Cerveza (n=10)	Cerveza sin alcohol (n=10)	Etanol (n=10)
Peso inicial	280,26±8,52	272,47±20,16	272,78±11,90	272,95±11,57
Peso final	397,78±17,38	387,25±47,80	369,71±34,53	381,81±16,48
Ganancia de peso (g/día)	117,52±17,02	114,78±34,63	96,93±26,68	108,86±13,01
Incremento de peso	4,197±0,61	4,099±1,24	3,461±0,95	3,887±0,46
Porcentaje de incremento de peso (%)	329,1±46,21	315,79±111,54	265,93±77,23	296,99±36,67
Eficacia alimentaria *	0,207±0,037 ^{ab}	0,238±0,044 ^a	0,19±0,037 ^b	0,22±0,034 ^{ab}
Peso de timo (g)	0,590±0,080	0,612±0,156	0,553±0,086	0,605±0,087
Peso de bazo (g)	0,776±0,12	0,751±0,13	0,751±0,077	0,777±0,08
Índice timo-somático	0,149±0,021	0,160±0,039	0,151±0,026	0,158±0,020
Índice espleno-somático	0,195±0,031	0,194±0,026	0,204±0,022	0,204±0,022
Números de placas de Peyer	22,50±2,95	19,30±3,77	21,00±3,80	20,50±3,37

Valores expresados como media ± desviación estándar.

* Valores de varianza (ANOVA) de una vía, factor fijo (grupo), corregido por la dieta y la bebida (covariantes).

Letras distintas indican diferencias significativas entre los grupos de control, con consumo moderado de cerveza, cerveza sin alcohol y etanol.

Test de pares de Bonferroni entre grupos ($p<0,05$).

Tabla 48. Estudio en timo: subpoblaciones linfocitarias, y cociente CD4/CD8, en ratas control, con consumo moderado de cerveza, con cerveza sin alcohol o con consumo moderado de etanol.

	Control (n=10)	Cerveza (n=10)	Cerveza sin alcohol (n=10)	Etanol (n=10)
CD4+CD8+ (%)	80,61±4,64	82,93±3,92	78,86±4,01	79,17±5,41
CD4+CD8- (%)	10,18±1,39	9,71±2,49	11,09±3,32	11,31±2,60
CD4-CD8+ (%)	5,23±1,10	4,73±1,20	5,76±2,23	6,48±2,32
CD4/CD8	1,97±0,44	2,11±0,61	2,04±0,69	1,96±0,94

Valores expresados como media ± desviación estándar.

Tabla 49. Estudio en bazo: subpoblaciones linfocitarias, y cocientes CD4/CD8 y CD2/CD45RA en ratas control, con consumo moderado de cerveza, con cerveza sin alcohol o con consumo moderado de etanol.

	Control (n=10)	Cerveza (n=10)	Cerveza sin alcohol (n=10)	Etanol (n=10)
CD2 (%)	44,13±10,05	45,87±4,71	45,00±4,50	45,57±6,32
CD3 (%)	43,73±7,82	38,10±6,33	39,96±4,42	31,94±5,60
CD4 (%)	27,48±5,58	28,43±3,17	29,22±4,47	26,29±5,89
CD8 (%)	16,51±3,72	15,57±2,39	14,79±2,23	17,75±3,69
CD45RA (%)	38,94±6,45	38,64±6,10	40,59±6,50	37,95±4,87
CD4/CD8	1,753±0,536	1,862±0,336	2,017±0,333	1,546±0,465
CD2/CD45RA	1,181±0,411	1,225±0,295	1,145±0,267	1,233±0,300

Valores expresados como media ± desviación estándar.

Tabla 50. Estudio en placas de peyer: subpoblaciones linfocitarias, y cocientes CD4/CD8 y CD2/CD45RA en ratas control, con consumo moderado de cerveza, con cerveza sin alcohol o con consumo moderado de etanol.

	Control (n=10)	Cerveza (n=10)	Cerveza sin alcohol (n=10)	Etanol (n=10)
CD2 (%)	51,53±19,78	54,77±22,17	54,57±22,82	55,67±26,08
CD3 (%)	53,49±15,43	47,35±16,96	50,86±16,95	51,93±23,67
CD4 (%)	17,69±6,06	16,72±5,02	16,31±4,69	15,69±4,42
CD8 (%)	3,06±2,30	2,26±1,43	3,61±5,39	4,43±3,94
CD45RA (%)	42,00±12,37	40,28±12,48	43,20±11,48	36,00±10,05
CD161 (%)	6,43±5,38	6,59±4,58	5,21±4,15	5,78±3,27
CD4/CD8	11,04±8,74	11,08±7,97	8,59±5,13	6,45±5,48
CD2/CD45RA	1,51±1,28	1,66±1,16	1,47±0,84	1,84±1,36

Valores expresados como media ± desviación estándar.

Tabla 51. Estudio en sangre periférica: subpoblaciones linfocitarias, y cocientes CD4/CD8 y CD2/CD45RA en ratas control, con consumo moderado de cerveza, con cerveza sin alcohol o con consumo moderado de etanol.

	Control (n=10)	Cerveza (n=10)	Cerveza sin alcohol (n=10)	Etanol (n=10)
CD2 (%)	47,10±7,83	46,13±5,97	47,37±5,67	48,64±8,73
CD3 (%)	35,11±10,62	29,79±8,51	29,91±10,05	36,49±11,53
CD4 (%)	33,08±6,08	31,31±4,50	36,66±3,74	36,76±6,62
CD8 (%)	11,64±6,02	10,36±4,17	11,44±3,10	11,33±4,28
CD45RA (%)	27,24±5,71	27,40±6,15	26,07±8,48	25,70±7,00
CD161 (%)	4,19±2,14	5,34±0,87	4,93±1,57	4,40±2,09
CD4/CD8	3,51±1,88	3,48±1,67	3,37±0,80	3,41±0,83
CD2/CD45RA	1,79±0,43	1,75±0,43	1,95±0,55	2,01±0,64

Valores expresados como media ± desviación estándar.

Tabla 52. Capacidad fagocítica de ratas control, con consumo moderado de cerveza, con cerveza sin alcohol o con consumo moderado de etanol.

	Control (n=10)	Cerveza (n=10)	Cerveza sin alcohol (n=10)	Etanol (n=10)
Fago control (%)	0,30±0,29	0,32±0,39	0,11±0,14	0,22±0,15
Fago coli (%)	43,88±12,37	56,37±15,85	52,04±32,18	39,27±25,38

Valores expresados como media ± desviación estándar.

Tabla 53. Citoquinas en ratas control, con consumo moderado de cerveza, con cerveza sin alcohol o con consumo moderado de etanol.

	Control (n=10)	Cerveza (n=10)	Cerveza sin alcohol (n=10)	Etanol (n=10)
IL-2 (pg/ml)	121,90±77,59	192,90±206,43	185,18±118,50	143,07±73,83
TNF-α (pg/ml)	385,98±156,09	358,13±283,86	352,70±217,44	455,83±270,78

Valores expresados como media ± desviación estándar.

Tabla 54. Valores máximos y mínimos de citoquinas en ratas control, con consumo moderado de cerveza, con cerveza sin alcohol o con consumo moderado de etanol.

	Control (n=10)		Cerveza (n=10)		Cerveza sin alcohol (n=10)		Etanol (n=10)	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
IL-2 (pg/ml)	75,96	334,97	53,70	765,4	43,06	453,0	53,70	293,0
TNF-α (pg/ml)	214,0	659,2	103,4	879,6	130,9	795,1	158,4	1156