



Universidad de Sevilla

Facultad de Farmacia

**“Binge drinking” y suplementos de selenio:
Efectos sobre la actividad y expresión de la
glutación peroxidasa**

Pablo Adrián Guillén Poza



Universidad de Sevilla

Facultad de Farmacia

Trabajo de Fin de Grado

Grado en Farmacia

“Binge drinking” y suplementos de selenio: Efectos sobre la actividad y expresión de la glutatión peroxidasa

Pablo Adrián Guillén Poza

Facultad de Farmacia, Julio de 2014

Departamento de Fisiología

Fátima Nogales Bueno

Trabajo experimental

RESUMEN

Desde hace unas décadas, en España, el patrón de consumo intensivo o de fin de semana, tipo “binge drinking”, se ha convertido en el predilecto por los adolescentes. Como consecuencia de este consumo, los jóvenes se ven expuestos semanalmente a altas dosis de alcohol que producen intoxicaciones etílicas, alteraciones de la conducta, episodios de violencia y estrés oxidativo.

El selenio (Se), es un mineral importante para la salud al que se le han atribuido propiedades antiinflamatorias, antivirales y antioxidantes, por formar parte de las distintas selenoproteínas. Se postula que el selenio modula el estrés oxidativo, principalmente a través de las diferentes isoformas de la glutatión peroxidasa (GPx) y de la selenoproteína P (SelP), las cuales actúan reduciendo los niveles de peróxido de hidrógeno y de hidroperóxidos de fosfolípidos de las células.

En este trabajo se han estudiado los efectos del “binge drinking” sobre los niveles de Se, la actividad de la enzima GPx, la expresión de la GPx y SelP, y si la suplementación con Se puede ser utilizada como una terapia antioxidante que promueva una mayor defensa frente al estrés oxidativo provocado por este patrón de consumo de alcohol.

PALABRAS CLAVE

“Binge drinking”, Alcohol, Selenio, Selenoproteínas, Glutatión peroxidasa

ÍNDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES DEL TEMA	4
1. “BINGE DRINKING”: GENERALIDADES	4
2. EFECTOS NEGATIVOS DEL “BINGE DRINKING”	7
3. DAÑO HEPÁTICO Y “BINGE DRINKING”	8
4. ALCOHOL Y SELENIO	9
5. SELENIO Y SELENOPROTEÍNAS.....	11
II. OBJETIVOS.....	15
III. METODOLOGÍA.....	16
1. DISEÑO EXPERIMENTAL - ANIMALES.....	16
2. TOMA DE LAS MUESTRAS DE RATAS	18
3. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS.....	18
4. DETERMINACIONES ANALÍTICAS	19
5. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN POR WESTERN BLOTTING	22
6. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO	24
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
1. CONTROL NUTRICIONAL.....	25
2. HOMEOSTASIS DEL SELENIO.....	26
3. ACTIVIDAD GLUTATIÓN PEROXIDASA.....	27
4. EXPRESIÓN DE SELENOPROTEÍNAS.....	29
V. CONCLUSIONES.....	32
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33

I. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES DEL TEMA

1. “BINGE DRINKING”: GENERALIDADES

En España, como en otros países de nuestro entorno, el alcohol es la droga psicoactiva legal más consumida. Su uso está enraizado en nuestra cultura y economía, y su consumo por parte de la población juvenil y adolescente ha adquirido unas dimensiones muy importantes, debido en gran parte, a un cambio en el patrón de consumo de alcohol (Álvarez y cols., 2008; ESTUDES, 2006/2007). Así, en las últimas décadas, estamos asistiendo a cambios muy decisivos en el hábito de consumo de alcohol, que se centran fundamentalmente en el paso desde un consumo diario a un consumo intensivo durante el fin de semana, sobre todo en los/as jóvenes, a través del denominado “binge drinking” (Merino y cols., 2003). Esta situación se ha visto favorecida por la facilidad con la que los menores de edad pueden acceder a las bebidas alcohólicas y a la alta frecuencia de consumo que presentan en muchos países europeos (Comisión de las Comunidades Europeas, 2006).

“Binge drinking” es un término anglosajón, compuesto por la palabra “binge” (exceso o atracón) y la palabra “drinking” (bebida), que hace referencia a un patrón de consumo de alcohol caracterizado por la ingesta de grandes cantidades de alcohol durante un breve periodo de tiempo. En español, la denominación que mejor se adapta a esta descripción es la de “consumo intensivo episódico” (Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, 2013).

En España, para clasificar un determinado consumo de alcohol como “binge drinking”, este debe implicar un consumo igual o superior a 60 g de alcohol puro (6 bebidas) para hombres e igual o superior a 50 g (5 bebidas) para mujeres. Esta cantidad debe consumirse en una sola ocasión y en un intervalo de tiempo de entre 4 y 6 horas. Durante este periodo de tiempo se consume alcohol de forma secuencial sin que la tasa de alcoholemia llegue a cero entre una toma y la siguiente (Álvarez y cols., 2008; Rodríguez-Martos y cols., 1999).

Para simplificar los registros de consumo se utiliza la Unidad de Bebida Estándar (UBE), la cual permite un cálculo aproximado. La UBE presenta dispersión territorial (**Tabla 1**), por lo que hay que tener en cuenta el marco geográfico sobre el que se realiza el estudio (Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, 2013).

Países	Equivalente en gramos de 1 UBE
Reino Unido	8 g
España (equivalente más extendida en Europa)	10 g
Canadá e Italia	12 g
EEUU	14 g
Japón	20 g

Tabla 1. Ejemplos de la dispersión territorial que presenta la UBE
(Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, 2013)

En España, la UBE equivale a 10 gramos de etanol puro, lo que equivale (**Tabla 2**) a una caña de cerveza o a un vaso de vino (Álvarez y cols., 2008; Rodríguez-Martos y cols., 1999).

Tipo de bebida	Volumen	Gramos de etanol puro	UBE
Cerveza	250 cc	10 g	1 UBE
Vino o cava	100 cc	10 g	1 UBE
Licor	50 cc	20 g	2 UBEs
Cubata	50 cc	20 g	2 UBEs

Tabla 2. Ejemplos de bebidas y sus equivalentes en UBEs
(Álvarez y cols., 2008; Rodríguez-Martos y cols., 1999)

En relación a la edad de inicio del “binge drinking”, esta no ha variado en los últimos años, situándose alrededor de los 13,9 años. Y además, se observa que los menores hacen más “binge drinking” a medida que aumenta su edad (**Gráfico 1**) (Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, 2013).

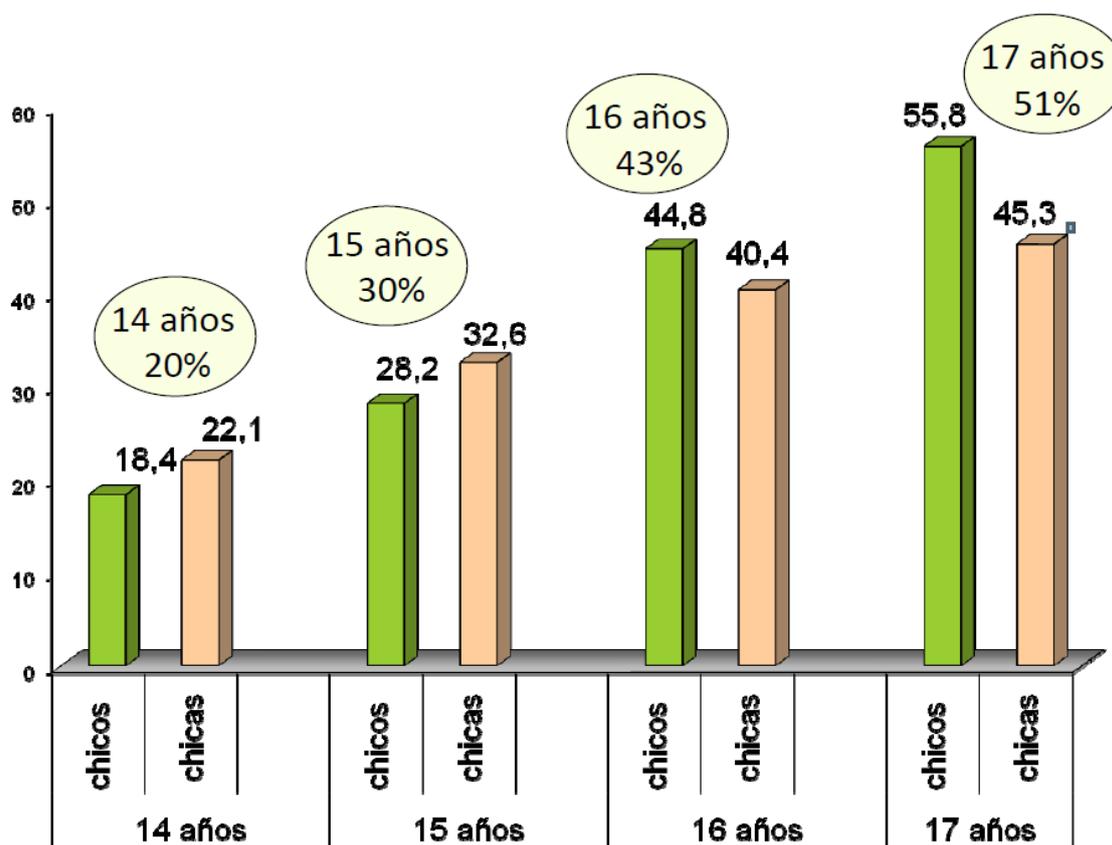


Gráfico 1. Porcentaje de “binge drinking” en menores (14- 17 años) en el último mes.

(Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, 2013).

Las motivaciones que impulsan a los adolescentes hacia el “binge drinking” aún están poco estudiadas desde un punto de vista rigurosamente psicológico. No obstante, existe una larga lista de razones por las cuales este fenómeno les resulta tan atractivo. Muchos adolescentes ven el “binge drinking” como un acto social básico, imprescindible y que simboliza la madurez. También surge un componente sexual muy importante, ya que debido a la desinhibición producida por el alcohol, las expectativas de mantener relaciones sexuales aumentan. Otro de los motivos que empuja a los adolescentes a beber es la presión social ejercida por amigos y familiares (Chainey y Stephens C, 2014).

2. EFECTOS NEGATIVOS DEL “BINGE DRINKING”

La adolescencia es una etapa crítica para el inicio del consumo de sustancias adictivas que pueden marcar, en muchos y muchas adolescentes, el acceso al mundo adulto. La imitación y el deseo de ser como los demás tienen un peso muy importante en el inicio del consumo de alcohol (Harford y cols., 2001).

Las consecuencias de la ingesta masiva de alcohol se asocian principalmente a efectos negativos agudos, como lesiones accidentales, intoxicaciones etílicas, lesiones por violencia, conductas sexuales de riesgo, problemas laborales o alteraciones cardíacas agudas (Álvarez y cols., 2008). Los efectos a largo plazo, mucho menos conocidos en este patrón de consumo, se relacionan con un incremento del riesgo de mortalidad general (Kauhanen y cols., 1997). Por otra parte, es incuestionable que la exposición temprana al alcohol es un claro predictor de una posible dependencia al alcohol en la edad adulta, multiplicando por cuatro el riesgo de desarrollar dependencia en quienes comienzan a beber antes de los 15 años, frente a los que lo hicieron a los 20 (Harford y cols., 2001).

Algunas investigaciones (National Institute of Health, 2004) sugieren que los adolescentes que beben excesivamente rara vez presentan trastornos crónicos severos del tipo cirrosis hepática, pancreatitis o gastritis. Sin embargo, experimentan efectos adversos en su hígado, huesos, crecimiento y desarrollo endocrino. El consumo excesivo de alcohol en la adolescencia disminuye los niveles de hormonas sexuales y de las hormonas de crecimiento tanto en chicos como en chicas. Estas investigaciones indican que el cerebro del adolescente pudiera ser más sensible a los efectos dañinos del alcohol que el de los adultos, al interrumpirse los procesos clave del desarrollo cerebral, describiéndose incluso lesiones cerebrales persistentes y alteraciones anatómicas en adolescentes que comenzaron a consumir precozmente (Álvarez y cols., 2008). El Informe de la Comisión Clínica del PNSD (Plan Nacional Sobre Drogas) realiza una descripción extensa de estas consecuencias (Moya y cols., 2007).

A nivel óseo se detecta que un incremento en el consumo de alcohol produce una disminución de la densidad ósea en adolescentes varones, pero no en mujeres. En hígado se observa que los niveles de enzimas hepáticas, usadas como indicadores de daño hepático, están más elevados en adolescentes con trastornos relacionados con el alcohol y en adolescentes obesos que beben cantidades más moderadas. A nivel cerebral, un historial de abuso o dependencia al alcohol en adolescentes se asocia a una reducción del volumen del hipocampo y a sutiles

anormalidades en la microestructura de la sustancia blanca del cuerpo calloso (Harford y cols., 2001).

3. DAÑO HEPÁTICO Y “BINGE DRINKING”

La repercusión del consumo crónico del alcohol sobre el hígado es bien conocida y ampliamente descrita por los investigadores. Sin embargo, los efectos nocivos del “binge drinking” a nivel hepático están siendo recientemente elucidados, existiendo estudios parciales sobre diferentes mecanismos implicados. Así, aunque el “binge drinking” está bien asociado a problemas sociales y de salud pública, todavía no se conocen bien las consecuencias que este patrón de consumo de alcohol puede desencadenar a nivel hepático.

El metabolismo oxidativo del etanol ocurre, predominantemente, en el hígado, gracias a la acción de la alcohol deshidrogenasa (ADH), el sistema microsomal oxidativo del etanol (SMOE), dependiente del citocromo P450 (CYP2E1) y la catalasa (CAT). Como consecuencia de este metabolismo se producen especies reactivas de oxígeno (ERO) que producen peroxidación de los lípidos, las proteínas y del ADN, ocasionando un daño oxidativo irreversible y alterando las funciones vitales de las células hepáticas y del organismo. Además, el metabolismo oxidativo del alcohol también desencadena una depleción de los mecanismos de defensa antioxidante, lo que compromete el funcionamiento correcto del organismo.

Diversos estudios demuestran que el “binge drinking” interfiere en el equilibrio oxidativo, produciendo una depleción del glutatión (GSH) mitocondrial, lo que además de incrementar el estrés oxidativo conduce a la degradación del DNA hepático mitocondrial (Mansouri y cols., 2001). Pero además, también se ha podido demostrar que los modelos que reproducen este tipo de ingesta alcohólica desencadenan la inducción de la isoforma CYP2E1, provocan estrés oxidativo, peroxidación lipídica y alteran el sistema de defensa antioxidante en animales adultos (Husain y Somani, 1997; Zhou y cols., 2002; Artun y cols., 2010; Kalaz y cols., 2012). Así mismo, este tipo de consumo de alcohol produce esteatosis microvesicular junto con necrosis en el hígado y originan un aumento de las transaminasas séricas (Artun y cols., 2010). En el ámbito epidemiológico, hay datos que sugieren un incremento en la incidencia de cirrosis en países con una cultura de “binge drinking” (Mathurin y Deltenre, 2009). Además, se postula que el “binge drinking” puede desencadenar apoptosis hepática a través del incremento de la expresión de Fas, un conocido receptor de muerte celular, y por el aumento de la liberación

del citocromo C (Zhou y cols., 2001; Wang y Cederbaum, 2007). Estas moléculas ponen en marcha una cascada de enzimas específicas, llamadas caspasas, que conducen a la muerte celular (Conde De la Rosa y cols., 2008).

Estudios realizados en roedores indican que episodios repetidos de “binge drinking” ocasionan un mayor daño hepático que una sola sesión de “binge drinking”. A título de ejemplo, se ha observado que los efectos perniciosos resultantes de este tipo de comportamiento en las células del endotelio sinusoidal, se amplifican después de varios episodios (McCuskey y cols., 2005).

Por tanto, ya que el hígado es el principal órgano donde el alcohol es metabolizado y puesto que el fenómeno “binge drinking” parece estar muy difundido actualmente entre los jóvenes de todo el mundo, sería interesante analizar en profundidad los diferentes mecanismos implicados en el desarrollo del daño hepático.

4. ALCOHOL Y SELENIO

Numerosos estudios demuestran que el consumo de alcohol influye sobre los niveles de selenio (agente antioxidante) en diversos órganos de animales y humanos. Así, en ratas sometidas a un consumo crónico de alcohol se verificó una disminución de los niveles de selenio en el suero y en diversos órganos como el hígado, corazón y riñón (Ojeda y cols., 2010). A su vez, en humanos se ha encontrado una reducción significativa de los niveles de selenio en el suero e hígado de pacientes alcohólicos con o sin enfermedad hepática (González-Reimers y cols., 2009; Rua y cols., 2014). Probablemente, uno de los mecanismos que explican la depleción de Se encontrada adviene de la constatación, unánimemente aceptada, de que el alcohol deteriora la función hepática. La presencia de daño hepático empeoraría la síntesis de selenoproteínas, como la glutatión peroxidasa (GPx) y la selenoproteína P (SeIP). Esta última es un importante transportador de selenio desde el hígado a otros tejidos, de manera que el consumo de alcohol acarrearía un déficit de este elemento en el organismo. Curiosamente, en estudios animales, llevados a cabo en ratas, se verificó que un déficit de este micronutriente generaba necrosis en los hepatocitos, de manera similar a lo observado en humanos con un consumo excesivo de alcohol (Simonoff y Simonoff, 1991; Navarro-Alarcón y cols., 2000).

Estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado también que el consumo crónico de alcohol altera la homeostasis de Se ya que modifica la biodisponibilidad de este micronutriente

en distintos tejidos de madres lactantes y de sus crías (Jotty y cols., 2009). Este patrón de consumo de alcohol, en esta etapa de la vida de las madres, disminuye la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx), una de las principales enzimas antioxidantes dependiente de Se, tanto en los órganos de madres como en sus crías, produciendo daño oxidativo (Zima y cols., 2001; Ojeda y cols., 2009; Ojeda y cols., 2012). Sin embargo, en estos estudios se ha podido constatar los efectos beneficiosos de la suplementación de Se durante la exposición al alcohol en la gestación y la lactancia, ya que restablece la homeostasis del Se, restaura la actividad de las enzimas antioxidantes y reduce la peroxidación de las principales biomoléculas (Jotty y cols., 2009; Ojeda y cols., 2009; Ojeda y cols., 2012). En base a estos resultados, se puede confirmar que la suplementación de Se protege del daño oxidativo que provoca el consumo de crónico de alcohol. Diversos estudios apoyan nuestros resultados. Así, recientemente, (González-Reimers y cols., 2013) han demostrado que la adición de Se a la dieta, en forma de selenometionina, previene la aparición de los primeros signos del daño hepático inducido por el alcohol en ratas Lieber-DeCarli. Del mismo modo, (Kim y cols., 2012) confirmaron que el selenio inhibe las lesiones inducidas por la administración de alcohol (80%) sobre la mucosa gástrica, ya que previene la peroxidación lipídica y activa las enzimas captadoras de radicales libres de manera dosis dependiente. Pero no solo la suplementación con Se, sino también la suplementación doble con Se/magnesio o con Se/ácido fólico es efectiva frente al estrés oxidativo producido por el alcohol (Ojeda y cols., 2009; Ojeda y cols., 2012; Markiewicz-Górka y cols., 2011). Esto es así porque el Se de la dieta eleva la actividad de las enzimas antioxidantes, sobre todo la de la enzima GPx, aumentando su expresión y la de otras selenoproteínas con función antioxidante (SeIP), de manera que reduce la peroxidación de lípidos, proteínas, del DNA de los hepatocitos y del organismo en general.

Sin embargo, poco se sabe de cómo actúa el Se tras un consumo de alcohol tipo “binge drinking”. En este contexto, (Yu y cols., 2014) han observado que la suplementación con Se refrena el daño hepático producido como consecuencia de la exposición aguda y puntual al alcohol, posiblemente por mecanismos similares a los que tienen lugar tras la ingesta crónica. Por ello, sería interesante estudiar como el consumo de alcohol tipo “binge drinking” actúa sobre los niveles del Se y las principales selenoproteínas hepáticas implicadas en la protección frente al daño oxidativo.

5. SELENIO Y SELENOPROTEÍNAS: GENERALIDADES

El selenio (Se) fue descubierto en 1817 por el químico sueco Jöns Jacob Berzelius, quien le atribuyó este nombre en honor a la diosa lunar griega, Selene. Aunque inicialmente fue considerado solo como un elemento tóxico, posteriores estudios reconocieron al selenio como un mineral asociado a importantes beneficios en la salud de mamíferos y humanos (Papp y cols., 2007; Reszka y cols., 2012).

El selenio es esencial para la vida y no existen dudas de que se necesita una adecuada cantidad de este elemento en el cuerpo para un adecuado estado de salud. El contenido de Se en el cuerpo humano varía entre 10 y 20 mg, siendo inferior al 0.01% del peso corporal total (Forceville, 2001). El Se es excretado mayoritariamente por vía renal, tanto en condiciones de una adecuada ingesta como en casos de suplementación. También se produce una excreción significativa de Se por vía fecal, y aproximadamente un 5% se elimina por vía cutánea y pulmonar (Castro, 2007).

El selenio participa en procesos tan vitales como la síntesis de ADN, ya que se necesita de su presencia en la zona catalítica de la tiorredoxina reductasa (Arnér y Holmgren, 2000). Pero la mayoría de sus funciones fisiológicas se deben a su presencia en las selenoproteínas (Papp y cols., 2007).

5.1. Selenoproteínas

El Se, en forma de selenocisteína, está presente en las selenoproteínas. La selenocisteína es la responsable de la actividad biológica de 25 selenoproteínas, entre las que se encuentra la glutatión Peroxidasa (GPx) y la selenoproteína P entre otras (Rayman, 2012). En la **Tabla 3** se recogen la ubicación y funciones de las principales isoformas de la familia GPx y de la selenoproteína P.

Selenoproteína	Ubicación	Función
GPx1	Hígado y eritrocitos	Antioxidante Cataliza la reducción de H ₂ O ₂ y otros peróxidos
GPx2	Aparato gastrointestinal	Actividad antiapoptótica Mantiene la integridad de la mucosa intestinal
GPx3	Plasma, intestino, riñón	Antioxidante en los fluidos extracelulares Cataliza la reducción de H ₂ O ₂ y otros peróxidos orgánicos
GPx4	Testículos, cerebro e hígado	Cataliza la reducción de los hidroperóxidos de fosfolípidos Antiinflamatoria/ Sistema Inmune Condensación de la cromatina de las espermátidas
Selenoproteína P	Hígado	Transporte y distribución de selenio por vía plasmática Antioxidante endotelial

Tabla 3. Isoformas de la familia glutatión Peroxidasa (GPx) y Selenoproteína P.

Al formar parte de las diferentes selenoproteínas al selenio se le han atribuido propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antivirales. Se postula que el selenio modula el estrés oxidativo, principalmente, a través de las diferentes isoformas de GPx (**Tabla 3**) y por la selenoproteína P, fundamentalmente, reduciendo los niveles de peróxido de hidrógeno y de hidroperóxidos de fosfolípidos. Por esta razón, entre otras, la deficiencia de Se ha sido relacionada con diversas alteraciones como son el cáncer, la infertilidad, el deterioro de las funciones inmunes y tiroideas, el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y de patologías neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson, e incluso en la enfermedad alcohólica (Rayman, 2000; Papp y cols., 2007; Johansson y cols., 1986).

5.2. Glutación peroxidasa 1

La GPx1 fue la primera selenoproteína identificada. La GPx1 protege a las células de los fenómenos oxidativos generados por las especies reactivas de oxígeno (ERO). Para ello, cataliza la reducción del H₂O₂ y de algunos peróxidos lipídicos, utilizando el glutatión (GSH) como reductor, transformándolos en agua y alcoholes. En este proceso el GSH es oxidado, por lo que posteriormente debe ser reducido a su estado original por acción de la enzima glutatión reductasa (GR), con el objetivo de mantener los niveles de GSH (Papp y cols., 2007; Reeves y Hoffmann, 2009).

La GPx1 es una de las selenoproteínas más sensibles a los cambios de Se en el organismo, presentando niveles drásticamente reducidos ante una disminución de este elemento (Reeves y Hoffmann, 2009).

Usando modelos de ratones knockout GPx1 se comprobó que presentaban un desarrollo normal y que no se veía comprometida su fertilidad. Este hecho sugería que la ausencia de esta selenoproteína, como sistema de defensa antioxidante, podía ser compensada por la actividad de otras proteínas. Sin embargo, cuando se sometía a estos ratones a un estrés oxidativo inducido, se observa un aumento considerable en la morbilidad y mortalidad de estos frente al grupo control, que presentaba GPx1 (Cheng y cols., 1998; de Haan y cols., 1998). Tales hallazgos indican que la GPx1 no puede ser reemplazada por cualquier otra selenoproteína en la protección frente al estrés oxidativo generalizado y que ésta presenta una función antioxidante imprescindible *in vivo* (Brigelius-Flohé y Maiorino, 2013).

5.3. Selenoproteína P

La SeIP es una proteína de gran relevancia muy abundante en el plasma, que alcanza, en ratas, una concentración de alrededor de 30 µg/mL, lo cual representa el 60% del Se plasmático (Tapiero y cols., 2003). Fue la segunda selenoproteína identificada, y al contrario que cualquier otra selenoproteína, contiene diez residuos de selenocisteína en lugar de uno (Burk y cols., 2005; Rayman, 2009).

La selenoproteína P posee dos importantes propiedades: actúa como biomarcador de la cantidad de Se corporal, ya que es la proteína transportadora mayoritaria de Se en suero, y posee capacidad antioxidante. La selenoproteína P se sintetiza, principalmente, en el hígado y transporta el Se desde el hígado (principal reservorio de Se en el organismo) hacia otros órganos. Por esta razón, diversos hallazgos sugieren que la selenoproteína P es un buen indicador del estado nutricional de Se en el organismo (Ashton y cols., 2009; Rasmussen y cols., 2009; Hurst y cols., 2010). Además, la selenoproteína P funciona como un antioxidante extracelular asociado al endotelio vascular que inhibe la actividad de radicales libres como el peroxinitrito y reduce los hidroperóxidos de fosfolípidos actuando en asociación con el GSH (Andoh, 2005).

II. OBJETIVOS

El consumo crónico de alcohol altera la homeostasis de Se, disminuyendo la concentración de este micronutriente en órganos importantes como el hígado, el riñón, el cerebro o el corazón, comprometiendo la actividad de la GPx y de las demás enzimas de defensa antioxidante en el organismo. Por otra parte, se conoce que la suplementación con Se protege frente al daño oxidativo que produce el alcohol crónico ya que restablece la actividad de las enzimas antioxidantes y previene la oxidación de lípidos y proteínas. Sin embargo, poco se sabe sobre cómo el Se actúa frente el estrés oxidativo que produce el consumo de alcohol tipo “binge drinking” en los adolescentes, y mucho menos si la suplementación con este micronutriente podría ser efectiva, neutralizando el daño oxidativo que el “binge drinking” produce a nivel hepático. Así, por todo ello, el **objetivo general** de este trabajo es:

Estudiar el efecto del “binge drinking” sobre los niveles de Se y la selenoproteína antioxidante GPx a nivel hepático y determinar si la suplementación con selenio podría ser utilizada como una terapia antioxidante que promueve una mayor defensa frente al estrés oxidativo provocado por este patrón de consumo de alcohol, modulando la presencia de las selenoproteínas GPx y SeIP.

III. METODOLOGÍA

1. DISEÑO EXPERIMENTAL - ANIMALES

Para la realización del trabajo se utilizaron animales de experimentación, concretamente ratas de la raza Wistar, distribuidos de manera aleatoria, en cuatro grupos (**Figura 1**):

- Grupo control intraperitoneal (**CI**): alimentado *ad libitum* con dieta base (0.23 ppm Se) y agua y que recibían, en los días correspondientes, una inyección intraperitoneal de solución salina.
- Grupo alcohol intraperitoneal (**AI**): alimentado *ad libitum* con dieta base (0.23 ppm Se) y agua y que recibían, en los días correspondientes, una inyección intraperitoneal de etanol (3 g/Kg).
- Grupo control intraperitoneal selenio (**CISe**): alimentado *ad libitum* con dieta base y agua suplementada con Se (0.3 ppm Se), y que recibían, en los días correspondientes, una inyección intraperitoneal de solución salina.
- Grupo alcohol intraperitoneal selenio (**AISe**): alimentado *ad libitum* con dieta base y agua suplementada con Se (0.3 ppm Se), y que recibían, en los días correspondientes, una inyección intraperitoneal de etanol (3 g/Kg).

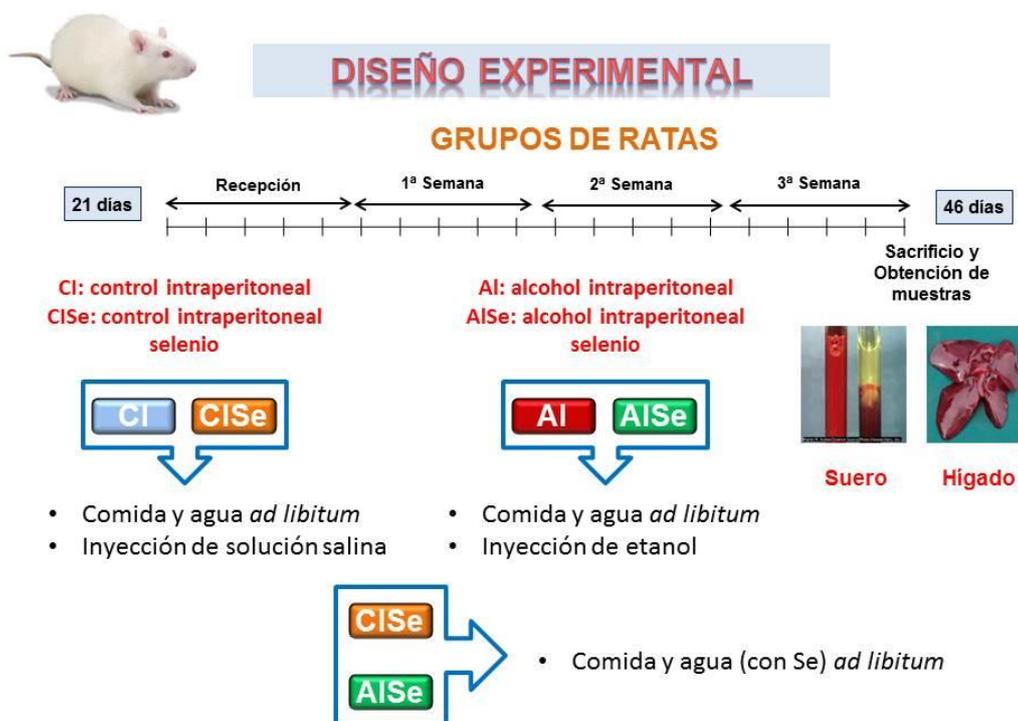


Figura 1. Condiciones experimentales y diseño de grupos.

1.1. Animales y condiciones experimentales

Se utilizaron 32 ratas adolescentes Wistar macho, de 28 a 46 días de edad. Estas ratas se alojaban en el animalario de la Facultad de Farmacia, bajo condiciones controladas de luz (ciclo de luz: 7:00 h mañana - 19:00 h tarde) y temperatura (22°C). Las ratas se dividieron por grupos y se les administró su respectivo tratamiento, durante 3 semanas, de acuerdo a los protocolos de manejo, cuidado y sacrificio de los animales, aprobado previamente por el Comité de Ética de la Universidad de Sevilla. Antes del sacrificio, las ratas permanecieron en período de ayuno durante 12 horas.

1.2. Dieta utilizada

La alimentación suministrada a los animales consistió en una dieta básica semisintética que contenía 0.23 ppm de Selenio y cubría todas las necesidades nutricionales y energéticas. Los grupos suplementados recibieron 0.3 ppm de Se (en forma de selenito sódico) en el agua de bebida.

1.3. Métodos de alcoholización

El método de alcoholización que se utilizó para los grupos AI y AISe tuvo como base la administración por vía intraperitoneal, tres días por semana y durante tres semanas, de etanol (3 g/Kg/d) en solución salina al 20% (v/v) (Callaci y cols., 2010). Por otra parte, a los grupos CI y CISe se les inyectó un volumen equivalente de solución salina durante el mismo período de tiempo.

1.4. Estudio macroscópico

El peso de los animales se controló diariamente, entre las 9:00 – 10:00 a.m. (para evitar diferencias debido al ritmo circadiano) utilizando una balanza analítica.

2. TOMA DE LAS MUESTRAS DE RATAS

Al final del periodo experimental, se procedió al sacrificio de los animales para la obtención de las muestras. Una vez anestesiado el animal con uretano al 28% p/v, se extrajo la sangre mediante punción cardiaca. Enseguida, se dejó retraer el coágulo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó a 3000 r.p.m. durante 10 minutos y con una micropipeta se extrajo el suero, que se conservó a -80°C. Simultáneamente a la obtención de la sangre y tras laparotomía media, se localizó el hígado y se procedió a su extracción, determinando su peso. El órgano se lavó con solución salina fisiológica fría. Posteriormente, se introdujo en N₂ líquido y se congeló a -80°C hasta el momento de realización de los análisis. El peso del hígado se utilizó para determinar el índice organosomático (IOS), es decir, el desarrollo de este órgano con respecto al peso de cada animal, utilizando la fórmula:

$$\text{IOS} = (\text{Peso del órgano/Peso total}) * 100.$$

3. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS: HOMOGENEIZACIÓN HEPÁTICA

Para poder determinar la actividad de la enzima antioxidante GPx, se homogeneizó una parte de los hígados de las ratas en tampón de sacarosa. El homogeneizado resultante fue centrifugado a 900 g y 4°C, durante 20 minutos. Posteriormente, se separó el sobrenadante con una micropipeta y se dividió en alícuotas que posteriormente se congelaron a -80°C hasta el momento del análisis.

Otra parte de los hígados se homogeneizó en tampón fosfato (con inhibidor de proteasas). El homogeneizado obtenido se centrifugó a 2000 g. y 4°C, durante 10 minutos y el sobrenadante final se dividió en alícuotas y se congeló a -80°C hasta llevar a cabo la determinación de proteínas totales y la inmunodetección de proteínas.

4. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

4.1. Determinación de la concentración total de proteínas

Para expresar la actividad de la GPx (mU/mg de proteína) así como para poder cuantificar las selenoproteínas por Western Blotting, determinamos las proteínas totales en los homogeneizados de hígado.

Fundamento: La determinación de proteínas se lleva a cabo según el método descrito por Lowry (Lowry y cols., 1951). En este método se hacen reaccionar las proteínas con el reactivo Folin-Ciocalteu, lo que origina un complejo coloreado. La intensidad del color depende de la cantidad de tirosina y triptófano presentes en las proteínas.

Cálculos: La concentración de proteínas totales (mg/mL) en las muestras se calcula utilizando una curva patrón de albúmina de suero bovino de concentraciones conocidas.

4.2. Determinación de selenio en suero e hígado

La determinación de selenio en suero e hígado se realizó utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica con cámara de grafito (**Figura 2**).



Figura 2. Espectrofotómetro de absorción atómica usado.

Fundamento: El método se basa en el proceso de absorción atómica, en el que los átomos presentes en la muestra absorben energía luminosa a una longitud de onda específica para cada elemento, pasando a un estado excitado y midiendo la cantidad de luz absorbida durante este proceso, que es proporcional a la cantidad de átomos presentes en la muestra. Esto permite la determinación cuantitativa del elemento estudiado.

Tratamiento de las muestras: Las muestras se descongelaron a temperatura ambiente. El hígado se sometió a 110°C durante 48 horas en una estufa para su desecación. El extracto seco obtenido se pesó y comenzó el proceso de digestión húmeda, en un baño de arena caliente. Para ello se añadió ácido nítrico, dejándolo actuar durante cerca de 72 horas, a una temperatura de 120°C. A continuación, se añadió ácido perclórico y se dejó enfriar. Finalmente, se añadió ácido clorhídrico. El suero se diluyó con ácido nítrico, añadiendo, a continuación una alícuota de 20 µl de Triton X-100.

Cálculos: La concentración de selenio en suero e hígado se calculó mediante una recta de calibrado construida a partir de una solución estándar de Se. En el caso del suero, los valores obtenidos se multiplicaron por el factor de dilución 5. Los niveles de selenio se expresan como µg Se/L para el suero y µg Se/g de tejido seco en el caso del hígado.

4.3. Determinación de la actividad glutatión peroxidasa

Fundamento: La enzima glutatión peroxidasa cataliza la reducción de los peróxidos orgánicos y del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en una reacción en que interviene el GSH. La actividad de esta enzima se determinó según el método descrito por Lawrence y Burk (Lawrence y Burk, 1976) ligeramente modificado. En este método, el glutatión oxidado (GSSG) formado por la acción de la enzima glutatión peroxidasa (GPx) se acopla a la reacción que cataliza la glutatión reductasa (GR), midiendo la disminución de absorbancia a 340 nm como consecuencia de la oxidación del NADPH (**Figura 3**).

Cálculo: La actividad de la enzima GPx se expresa en mU/mg de proteínas.

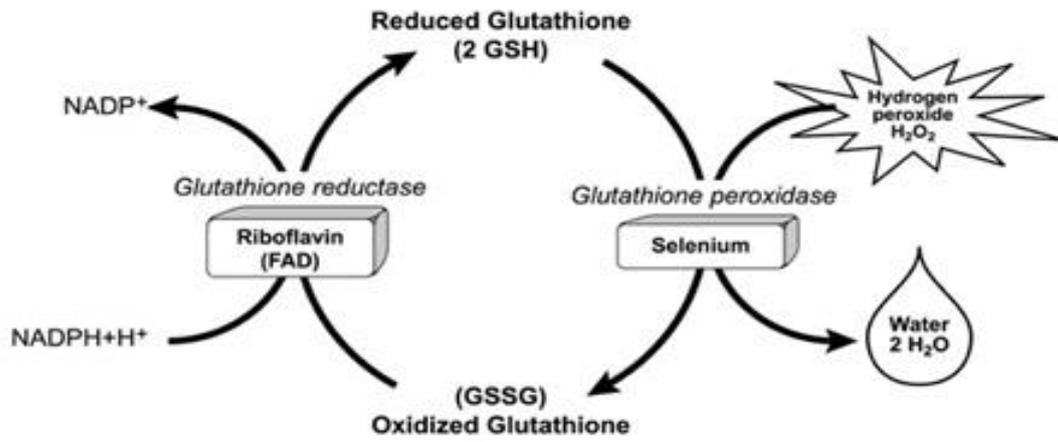


Figura 3. Reacciones mediadas por la glutatión peroxidasa (GPx) y la glutatión reductasa (GR)

5. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LAS SELENOPROTEÍNAS GPX-1 Y SELENOPROTEÍNA P POR WESTERN BLOTTING

Los niveles de expresión de la GPx-1 y SelP fueron determinados por medio de la técnica de Western Blotting (Laemmli, 1970). Esta técnica se utiliza para identificar y localizar proteínas en base a su capacidad para unirse a anticuerpos específicos. Además, proporciona información acerca del tamaño de la proteína de interés mediante la transferencia de macromoléculas biológicas desde un gel hasta una membrana y su posterior detección en la superficie de la misma.

A continuación se muestran las características de los anticuerpos y las diluciones usadas en cada determinación (**Tabla 4**).

Anticuerpo	Clasificación	Peso molecular	Dilución	Variante
GPx 1	Primario	23 kDa	1:10000	IgGpoliclonal en conejo
SelP	Primario	57 kDa	1:20000	IgGpoliclonal en conejo
Anti-rabbitIgG	Secundario		GPx1- 1:5000 SelP- 1:20000	Anti-IgG en conejo
Anti-β-Actina (Mouse IgG1)	Primario	42 kDa	1:20000	IgG1 monoclonal en ratón
Anti-Mouse IgG1	Secundario		1:8000	Anti-IgG1 monoclonal en ratón

Tabla 4. Características generales de los anticuerpos usados

Las muestras utilizadas contenían 100 µg de proteínas, que se separaron en función de su carga molecular mediante electroforesis, en gel de poliacrilamida con SDS. Para ello, las muestras se colocaron en sus respectivos pocillos, dentro de un gel concentrador, que concentra las proteínas y permiten que se alineen formando una banda. A continuación, las proteínas pasan por el gel separador que provoca su separación de acuerdo a la carga y al tamaño molecular que presentan. Para la identificación de la GPx1 se utilizó un gel separador que contenía un 12% de acrilamida, sin embargo, para la SelP se utilizó un gel separador con un 8% de acrilamida, el cual facilita la migración de las proteínas de pequeño peso molecular

(que salen con el frente de la muestra), separando preferentemente, a las proteínas con mayor masa.

Posteriormente se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (Immobilon-P Transfer Membrane, Millipore), para que, de esta manera, las proteínas quedaran accesibles y pudieran ser identificadas con sus anticuerpos específicos (**Figura 4**).

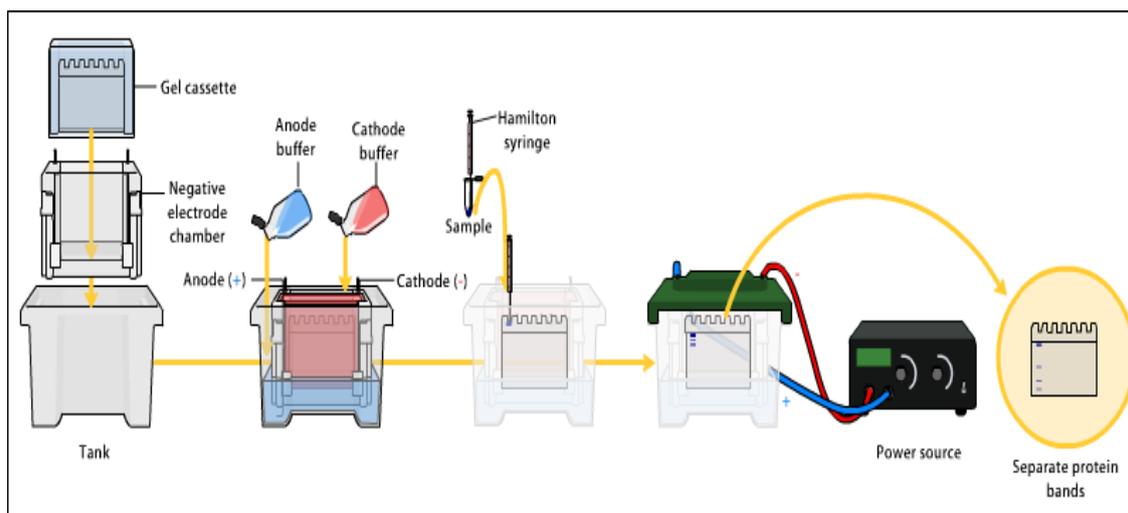


Figura 4. Resumen de la técnica de Western Blotting

La membrana así preparada se incubó durante 1 h con leche de bloqueo (3%, BioRad CA, USA) en tampón TBS (50 mM Tris-HCl1, 150 mM NaCl1, 0.1% (v/v) Tween 20, pH 7.5), para bloquear los sitios de unión inespecíficos y seguidamente, se incubó con el anticuerpo primario específico a 4°C durante toda la noche (**Tabla 4**). A la mañana siguiente, se lavó el exceso de anticuerpo y se incubó con anticuerpo secundario marcado con peroxidasa. Este anticuerpo permite la detección de la banda específica a la cual se unió el anticuerpo primario empleado, gracias a un reactivo ECL Luminol que produce quimioluminiscencia (WesternBright Quantum HRP substrate, Advansta).

La cuantificación de las proteínas se realizó midiendo la densidad óptica de las bandas con un programa informático que analiza densitometría (PCBAS 2.08e, Raytest Inc, Germany). Los resultados se expresaron como un porcentaje de unidades relativas, tomando como 100% los datos del grupo CI. El anticuerpo de la β -actina se utilizó como control de expresión de cada una de las proteínas investigadas.

6. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Los resultados se expresaron como la media \pm error estándar de la media (ESM) obtenida de al menos 8 muestras (n=8). Para comparar las distintas variables objeto de nuestro estudio, los datos se analizaron utilizando el análisis de varianza ANOVA en el programa (GraphPad InStat 3). Posteriormente, se utilizó el test de Tukey-Kramer para determinar las diferencias significativas entre las medias de los valores obtenidos para los cuatro grupos estudiados, considerándose diferencias estadísticamente significativas valores de $p < 0,05$.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. CONTROL NUTRICIONAL

Durante todo el periodo de tratamiento de los animales, se han ido realizando controles para permitir un correcto análisis de determinadas variables nutricionales (**Tabla 5**):

	CI	AI	CISE	AISe
Ingesta de selenio (µg/día)	2,7 ± 0, 22	2,5 ± 0. 16 ○○○	5,1 ± 0, 3 ●●●	4,5 ± 0, 27
Peso inicial (g)	65,47 ± 2,89	62,7 ± 2,47	65,52 ± 4,25	64,6 ± 4,78
Ganancia peso (g/día)	5,38 ± 0,19	5,03 ± 0,27	5,34 ± 0,25	5,17 ± 0,23
Índice organosomático (%)	3,26 ± 0,08	3,5306 ± 0,09	3,82± 0,14 ●	3,85 ± 0,11

Tabla 5: Variables nutricionales estudiadas. Los resultados se expresan como la media ± ESM. Significación estadística: AI vs AISe: ○○○P<0.001; CI vs CISE: ●●●P<0.001; ● P<0.05

Mediante la determinación de la ingesta de selenio, a través de la comida y el agua de bebida, corroboramos que los grupos CISE y AISe recibieron una mayor cantidad de este elemento gracias a la suplementación aportada. Como vemos en los valores referidos al peso inicial, las ratas tenían pesos similares cuando fueron recepcionadas, por lo que podemos asegurar que el experimento se inició con condiciones equivalentes para los cuatro grupos. También se observa un incremento de peso normal en todos los grupos, demostrando que han recibido una dieta adecuada a sus necesidades alimenticias y que el tratamiento con alcohol recibido, para simular el “binge drinking”, no afecta sobre la ingesta de alimento de los animales. Además, al determinar el desarrollo del hígado con respecto al peso corporal, se observa que este fue ligeramente mayor en el grupo AI, aunque no significativo, en comparación al grupo CI. Nuestros resultados concuerdan con la investigación desarrollada por (Carmiel-Haggai y cols., 2003), que utilizando ratas Fa/? Zucker, a las cuales habían administrado etanol al 35% (4 g/Kg cada 12h) durante tres días por vía gavage, no encontraron diferencias significativas en el índice organosomático de este órgano en comparación al grupo control que recibió solución salina por la misma vía.

2. HOMEOSTASIS DEL SELENIO

El selenio es esencial para la vida y se necesita una adecuada cantidad de este elemento en el cuerpo para un adecuado estado de salud (Forceville, 2001; Papp y cols., 2007; Reszka y cols., 2012). Por ello, se han medido los niveles de Se presentes tanto en hígado como en suero.

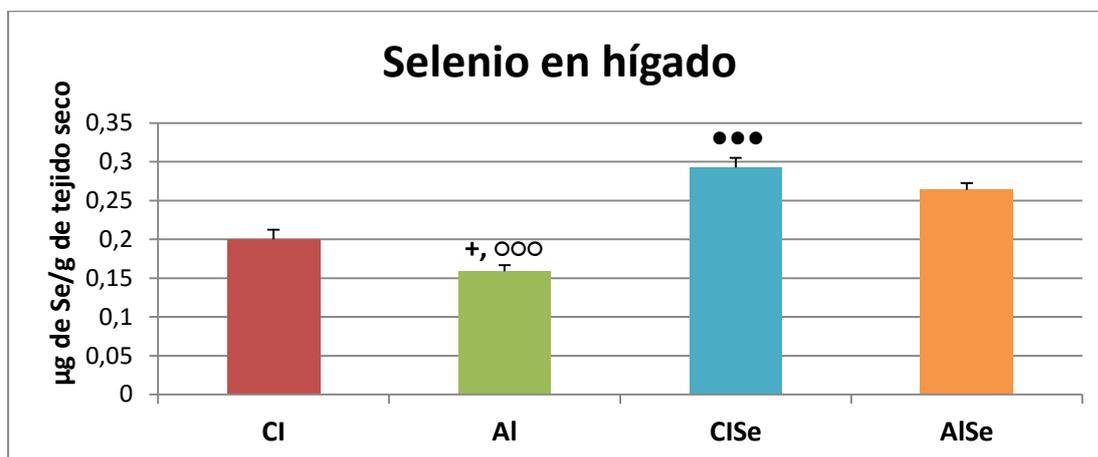


Figura 5: Niveles de selenio en hígado. Los resultados se expresan como la media \pm ESM. Significación estadística: CI vs AI: + P<0,05; CI vs CISe: ●●● P<0,001; AI vs AISe ○○○ P<0,001.

Como reflejan los resultados (**Figura 5**), el grupo AI presentó en hígado niveles de Se inferiores a los mostrados por grupo CI ($p<0,05$), corroborando que el consumo de alcohol tipo “binge drinking” disminuye los niveles de selenio, del mismo modo que lo hace el consumo crónico de alcohol en hígado, corazón y riñón (Ojeda y cols., 2010). A su vez, los grupos CISe y AISe presentaron una cantidad de Se hepático superior a los grupos sin suplementar (CI vs CISe: $p<0,001$; AI vs AISe: $p<0,001$), por lo que se puede deducir que la suplementación utilizada resulta efectiva, permitiendo un aumento de los niveles de este elemento en hígado.

Los resultados obtenidos al medir la concentración de Se en suero, expresados en μg de Se por L de suero, guardan una gran similitud con los resultados obtenidos a nivel hepático (**Figura 6**). Así, al estudiar la concentración de Se en suero del grupo AI, se observó que esta era inferior a la concentración referida al grupo CI ($p<0,05$). Este hecho reafirma nuevamente que el consumo de alcohol tipo “binge drinking” disminuye los niveles de selenio (Ojeda y cols., 2010).

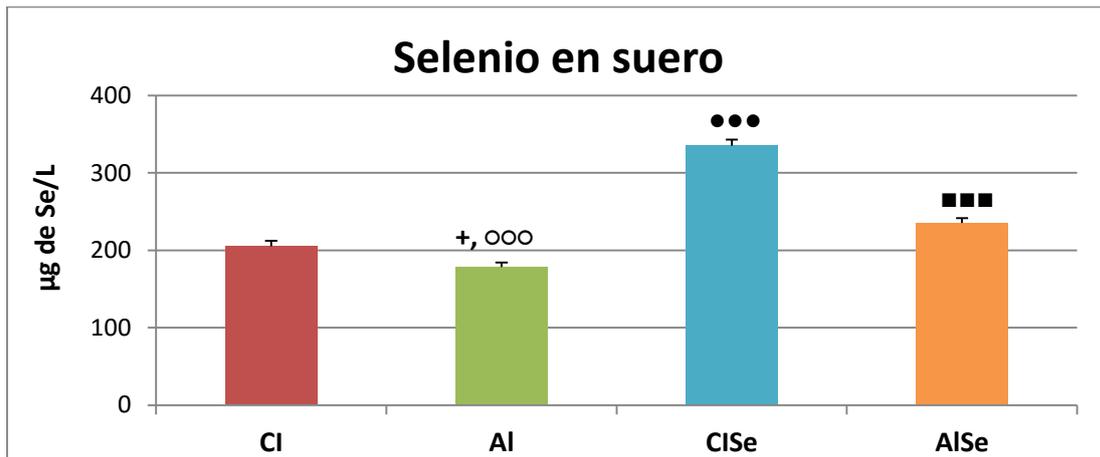


Figura 6: Niveles de selenio en suero. Los resultados se expresan como la media \pm ESM. Significación estadística: CI vs AI: + $P < 0.05$; CI vs CISe: ●●● $P < 0.001$; AI vs AISe ○○○ $P < 0.001$; CISe vs AISe ■■■ $P < 0.001$.

Por otra parte, al analizar el grupo CISe, se observó un aumento significativo de la concentración sérica de Se frente al control no suplementado ($p < 0.001$) y al grupo AISe ($p < 0.001$). A su vez, el grupo AISe mostró una concentración sérica, de este elemento, superior a la que presentó el grupo expuesto al “binge drinking” sin suplementar, aunque inferior al grupo CISe ($p < 0.001$). En base a estos resultados, se puede afirmar que el consumo de alcohol tipo “binge drinking” disminuye los niveles de Se en suero, incluso tras la suplementación, sin embargo, la adición de este micronutriente a la dieta es efectiva a nivel sérico y hepático ya que aumenta la concentración de este elemento, aumentando su disponibilidad para formar parte de las distintas selenoproteínas (Rayman, 2000; Rayman, 2012; Papp y cols., 2007; Johansson y cols., 1986).

3. ACTIVIDAD GLUTATIÓN PEROXIDASA

La actividad de la GPx1, la principal selenoproteína antioxidante del hígado (Hoffmann y cols., 2007), disminuyó significativamente en el grupo AI ($p < 0.05$) con respecto al grupo control, como consecuencia de la exposición al “binge drinking” (**Figura 7**). Sin embargo, tras la suplementación con Se, en los grupos CISe y AISe, se pudo observar un incremento significativo en comparación a los grupos sin suplementar (CI vs CISe: $p < 0.001$; AI vs AISe: $p < 0.001$). Se puede afirmar, por tanto, que la adicción de Se al agua de bebida es un buen tratamiento que promueve una mayor actividad de la GPx1 hepática.

En trabajos de (Ojeda y cols., 2009) encontraron resultados similares en crías expuestas al alcohol de manera crónica. Así, en base a estos resultados, se podría sugerir que la suplementación con Se refrena el daño hepático producido como consecuencia de este patrón de consumo de alcohol por mecanismos similares a los que tienen lugar tras la ingesta crónica (Yu y cols., 2014).

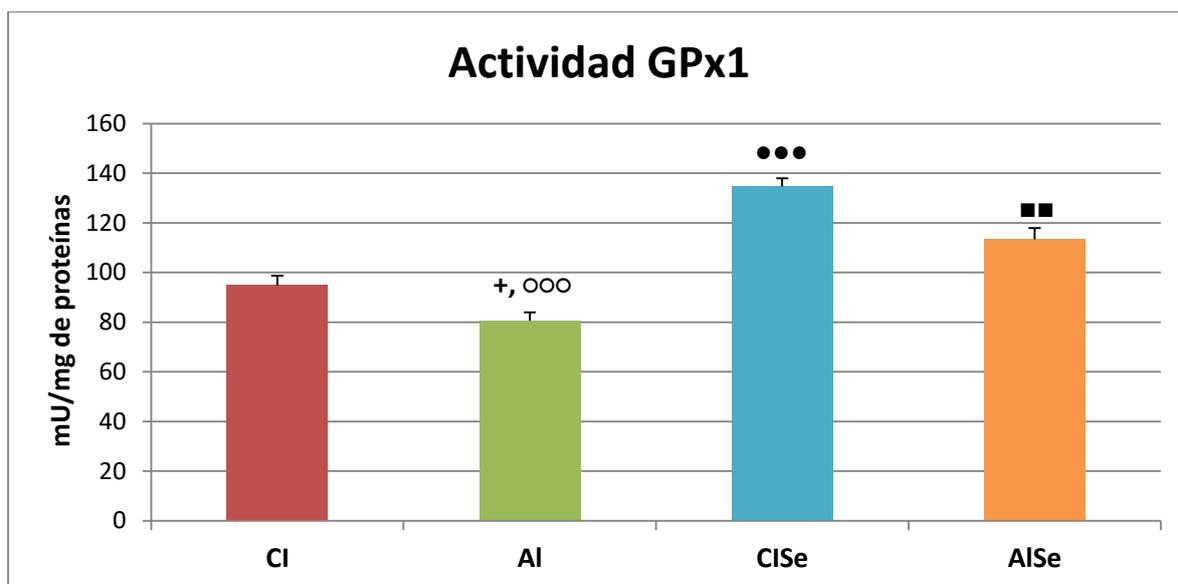


Figura 7: Actividad glutatión peroxidasa 1. Los resultados se expresan como la media \pm ESM. Significación estadística: CI vs AI: + P<0.05; CI vs CISe: ●●● P<0.001; AI vs AISe ○○○ P<0.001; CISe vs AISe ■● P<0.01.

Estos datos, además, muestran que este consumo de alcohol disminuye la actividad de la GPx1 incluso en el grupo AISe, ya que la actividad encontrada en este grupo fue mucho más reducida que en el grupo CISe ($p<0.01$). Nuestros resultados confirman que el binge drinking influye negativamente sobre la actividad de esta enzima y que el selenio hepático juega un papel sumamente importante en dicha actividad, ya que la disminución encontrada en los grupos expuestos al alcohol fue directamente proporcional. Así, la reducción encontrada en los niveles de Se hepático (**Figura 7**) se correlacionaron estrechamente con la menor actividad de la GPx observada.

4. EXPRESIÓN DE SELENOPROTEÍNAS

La proteína β -actina es empleada como control de la concentración de proteínas en los homogenizados. Como se puede observar (**Figura 8**), la concentración de proteínas es la misma en los cuatro grupos, confirmando que se han procesado correctamente las muestras. Posteriormente se analizaron más detalladamente la expresión de la GPx1 y de la SelP.

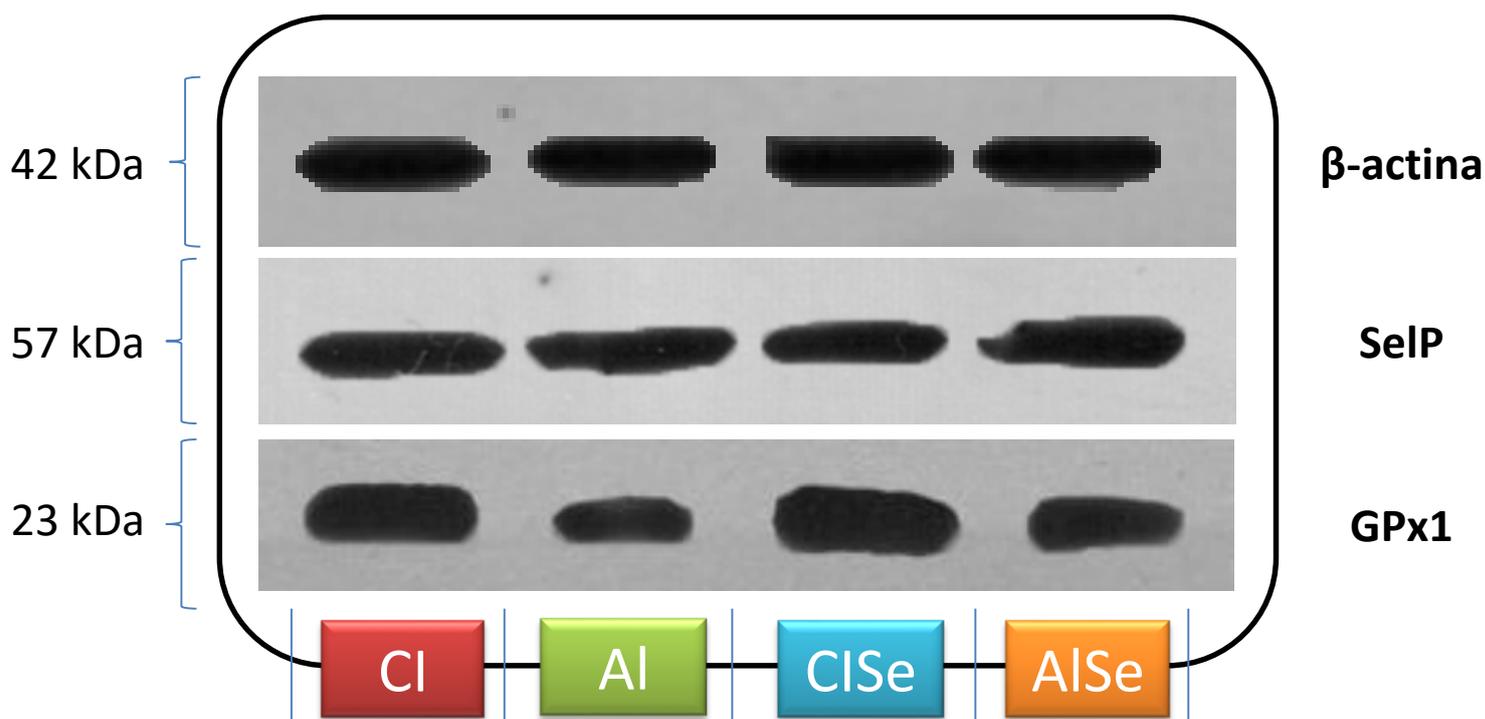


Figura 8: Expresión de β -actina, SelP y GPx1

La GPx1 es una de las selenoproteínas más sensibles a los cambios en el estado de Se, de manera que es la primera que disminuye ante una deficiencia en este micronutriente (Reeves y Hoffmann, 2009). Así, las ratas de los grupos expuestos al “binge drinking”, que presentaron niveles de Se reducidos, mostraron una disminución en la expresión de esta selenoproteína en comparación a sus respectivos controles (CI vs AI $p < 0,01$; CISe vs AISe $p < 0.01$) del mismo modo que su actividad (**Figura 9**). Diversos estudios han confirmado que una deficiencia de Se (aunque sea moderada) resulta en una disminución de la expresión de la GPx1 en hígado, e incluso, en riñón, corazón y colon (Hoffmann y cols., 2007; Jotty y cols., 2013).

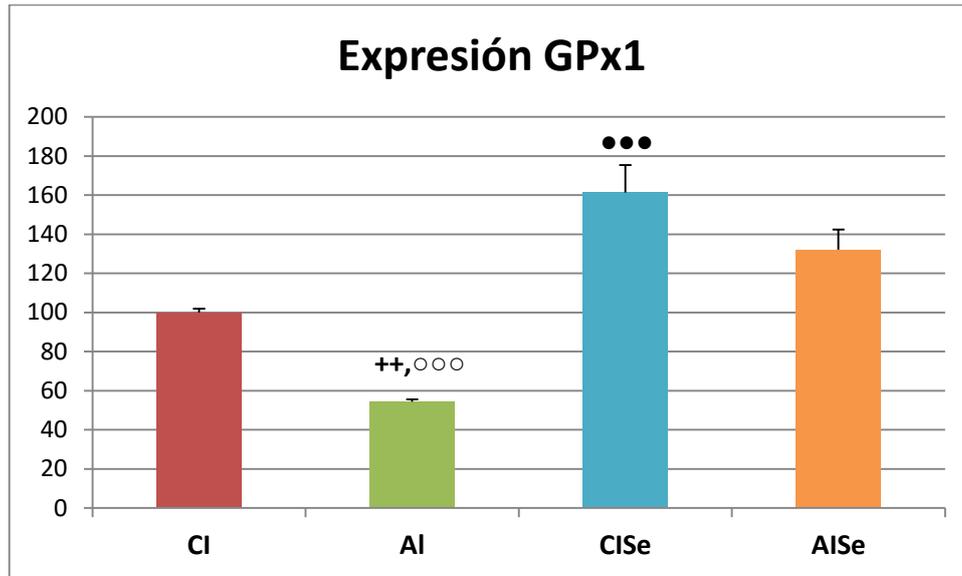


Figura 9: Expresión glutatión peroxidasa 1. Los resultados se expresan como la media \pm ESM. Significación estadística: CI vs AI: ++ $P < 0.01$; CI vs CISe: ●●● $P < 0.001$; AI vs AISe ○○○ $P < 0.001$.

Sin embargo, la suplementación de Se incrementó la expresión de la GPx1 por encima de los valores controles. Una vez más se observa una correlación entre los depósitos de Se hepáticos, la actividad y expresión de la GPx1. Jotty y cols., (2013), utilizando ratas madres expuestas al alcohol de manera crónica, observaron una disminución similar en estos tres parámetros (Jotty y cols., 2013). Por tanto, en base a estos resultados, se puede sugerir que la presencia de esta selenoproteína parece ser un buen marcador de los niveles de Se hepáticos en condiciones de deficiencia (Sunde y cols., 2009).

Posteriormente, se estudió la expresión hepática de la SeIP, la principal selenoproteína transportadora de Se en el suero (Steinbrenner y cols., 2010), ya que el hígado es la principal fuente de esta proteína y por tanto, de los niveles de Se plasmáticos (Reeves and Hoffmann, 2009). Se ha encontrado que el consumo de alcohol, tipo binge drinking, no alteró significativamente los niveles de SeIP en ninguno de los grupos estudiados. Así, se puede sugerir que el hígado mantiene la síntesis de SeIP incluso cuando los valores de Se hepáticos han disminuido (**Figura 10**). Es conocido que esta proteína se ve afectada en menor medida por el estado del Se que el resto de las selenoproteínas, por tanto, los resultados en ratas adolescentes, concuerdan con la bibliografía consultada (Tapiero y cols., 2003).

Los niveles similares de los grupos alcoholes, sin o tras la suplementación, podrían ser debidos a un intento de aportar una cantidad constante de Se al plasma, que sin embargo, no se consigue como puede observarse en la **Figura 6**, donde los niveles de Se están disminuidos. No obstante, el Se del plasma no proviene solamente de la SelP, sino también de otra selenoproteína, la GPx3. Esta selenoproteína es sintetizada por el riñón y liberada al plasma como principal enzima antioxidante, la cual junto a la SelP representa más del 97% del selenio en plasma (Brigelius-Flohé y Maiorino, 2013).

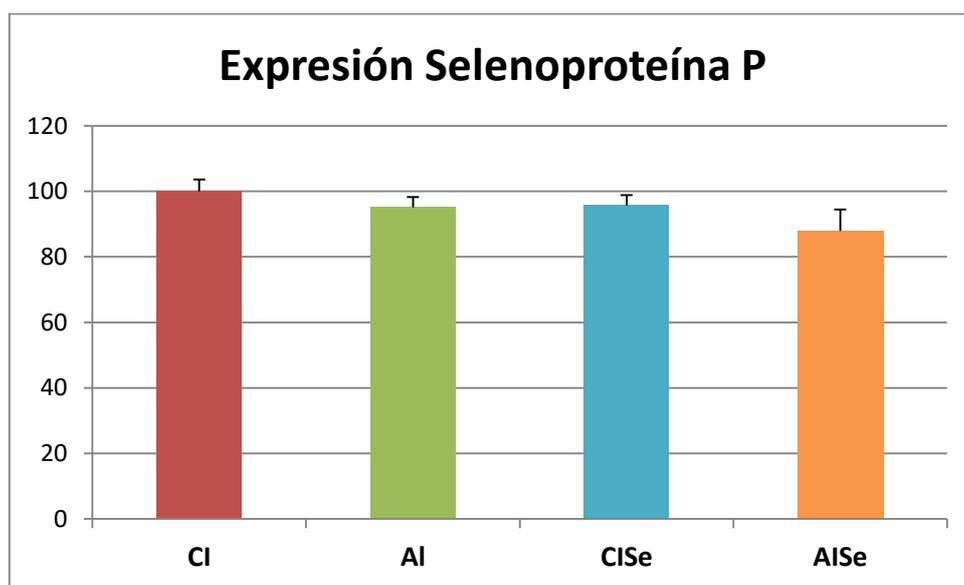


Figura 10: Expresión Selenoproteína P. Los resultados se expresan como la media \pm ESM. Significación estadística:

V. CONCLUSIONES

Conclusión primera:

El patrón de consumo de alcohol tipo “binge drinking” disminuye claramente los niveles de selenio presentes tanto en hígado como en suero, así como la expresión y la actividad de la GPx1 hepática. Este hecho repercute directamente en los sistemas de defensa antioxidante, desembocando en un menor grado de protección frente al estrés oxidativo producido por el alcohol.

Conclusión segunda:

La suplementación con Se consigue restablecer la depleción de los niveles de este elemento provocada por el alcohol. Gracias a la recuperación de los niveles de Se, la expresión de la enzima GPx1 aumenta y con ello se mejoran los sistemas de defensa antioxidante. De esta forma queda demostrada la eficacia de la suplementación de Se como terapia protectora frente al estrés oxidativo que provoca el consumo de alcohol tipo “binge drinking”.

VI. Referencias bibliográficas

A

- Álvarez, J., Cabezas, C., Colom, J., Galán, I., Gual, A., & Lizarbe, V. Prevención de los problemas derivados del alcohol. Madrid: Publicaciones del Ministerio de Sanidad y Consumo. 2008.
- Andoh, A., Hirashima, M., Maeda, H., Hata, K., Inatomi, O., Tsujikawa, T., ... & Fujiyama, Y. Serum selenoprotein-P levels in patients with inflammatory bowel disease. *Nutrition*. 2005; 21 (5): 574-579.
- Arnér, E. S., & Holmgren, A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem*. 2000; 267 (20): 6102-6109.
- Artun, B. C., Küskü-Kiraz, Z., Güllüoğlu, M., Çevikbaş, U., Kocak-Toker, N., & Uysal, M. The effect of carnosine pretreatment on oxidative stress and hepatotoxicity in binge ethanol administered rats. *Hum Exp Toxicol*. 2010; 29 (8): 659-665.
- Ashton, K. Hooper, L. Harvey, L.J. Hurst, R. Casgrain, A. Fairweather-Tait, S.J. Methods of assessment of selenium status in humans: a systematic review. *Am J Clin Nutr*. 2009; 89 (6): S2025-S2039

B

- Brigelius-Flohé, R., & Maierino, M. Glutathioneperoxidases. *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1830 (5): 3289-3303.
- Burk, R. F., & Hill, K. E. Selenoprotein P: an extracellular protein with unique physical characteristics and a role in selenium homeostasis. *Annu Rev Nutr*. 2005; 25: 215-235.

C

- Callaci, J. J., Himes, R., Lauing, K., & Roper, P. Long-term modulations in the vertebral transcriptome of adolescent-stage rats exposed to binge alcohol. *Alcohol*. 2010; 45 (4): 332-346.
- Carmiel-Haggai, M., Cederbaum, A. I., & Nieto, N. Binge ethanol exposure increases liver injury in obese rats. *Gastroenterology*. 2003; 125 (6): 1818-1833.
- Castro, W. M. Selenio en los pacientes críticos con Respuesta Inflamatoria Sistémica. *Nutr Hosp*. 2007; 22(3).
- Chainey TA, Stephens C. 'Let's get wasted': A discourse analysis of teenagers' talk about binge drinking. *J Health Psychol*; 2014.
- Cheng WH, Ho YS, Valentine BA, Ross DA, Combs GF Jr, Lei XG. Cellular glutathione peroxidase is the mediator of body selenium to protect against paraquat lethality in transgenic mice. *J Nutr*. 1998; 128 (7):1070-6.
- Comisión de las Comunidades Europeas. Una estrategia de la Unión Europea para ayudar a los Estados miembros a reducir los daños relacionados con el alcohol. Bruselas: Comunicación de la Comisión al Consejo, al Parlamento Europeo, al Comité Económico y Social Europeo y al Comité de las Regiones; 2006. SAN 220.
- Conde De la Rosa, L., Mosaghe, H., & Nieto, N. Estrés oxidativo hepatocitario y hepatopatía alcohólica. *Rev Esp Enferm Dig*. 2008; 100 (3): 156-163.

D

- deHaan JB, Bladier C, Griffiths P, Kelner M, O'Shea RD, Cheung NS, Bronson RT, Silvestro MJ, Wild S, Zheng SS, Beart PM, Hertzog PJ, Kola I. Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx1, show increased susceptibility to the oxidative stress-inducing agents paraquat and hydrogen peroxide. *J BiolChem.* 1998; 28; 273 (35): 22528-36.

F

- Forceville, X. Selenium and the " free" electron. *Intens Care Med.* 2001; 27 (1): 16-18.

G

- González-Reimers, E., Martín-González, M. C., Alemán-Valls, M. R., de la Vega-Prieto, M. J., Galindo-Martín, L., Abreu-González, P., & Santolaria-Fernández, F. Relative and combined effects of chronic alcohol consumption and HCV infection on serum zinc, copper, and selenium. *Biol Trace Elem Res.* 2009; 132(1-3): 75-84.
- González-Reimers, E., Monedero-Prieto, M. J., González-Pérez, J. M., Durán-Castellón, M. C., Galindo-Martín, L., Abreu-González, P., ... & Santolaria-Fernández, F. Relative and Combined Effects of Selenium, Protein Deficiency and Ethanol on Hepatocyte Ballooning and Liver Steatosis. *Biol Trace Elem Res.* 2013; 154 (2): 281-287.

H

- Harford, T. C., Grant, B. F., Yi, H. Y., & Chen, C. M. Patterns of DSM-IV alcohol abuse and dependence criteria among adolescents and adults: Results from the 2001 National Household Survey on Drug Abuse. *Alcohol Clin Exp Res.* 2005; 29(5): 810-828.
- Hoffmann, P. R. Mechanisms by which selenium influences immune responses. *Arch Immunol Ther Ex.* 2007; 55 (5): 289-297.
- Hurst, R., Armah, C. N., Dainty, J. R., Hart, D. J., Teucher, B., Goldson, A. J., ... & Fairweather-Tait, S. J. Establishing optimal selenium status: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 2010; 91 (4): 923-931.
- Husain, K., & Somani, S. M. Interaction of exercise and ethanol on hepatic and plasma antioxidant system in rat. *Pathophysiology.* 1997; 4 (1): 69-74.

J

- Johansson, U., Johnsson, F., Joelsson, B., Berglund, M., & Åkesson, B. Selenium status in patients with liver cirrhosis and alcoholism. *Brit J Nutr.* 1986; 55(02): 227-233.
- Jotty, K., Ojeda, M. L., Nogales, F., Murillo, M. L., & Carreras, O. Selenium dietary supplementation as a mechanism to restore hepatic selenoprotein regulation in rat pups exposed to alcohol. *Alcohol.* 2013; 47 (7): 545-552.
- Jotty, K., Ojeda, M. L., Nogales, F., Rubio, J. M., Murillo, M. L., & Carreras, O. Selenium tissue distribution changes after ethanol exposure during gestation and lactation: selenite as a therapy. *Food Chem Toxicol.* 2009; 47 (10): 2484-2489.

K

- Kalaz, E. B., Evran, B., Develi, S., Erata, G. Ö., Uysal, M., & Koçak-Toker, N. Effect of binge ethanol treatment on prooxidant–antioxidant balance in rat heart tissue. *Pathophysiology*. 2012; 19 (1): 49-53.
- Kim, J. H., Park, S. H., Nam, S. W., & Choi, Y. H. Gastroprotective effect of selenium on ethanol-induced gastric damage in rats. *Int J Mol Sci*. 2012; 13 (5): 5740-5750.
- Kauhanen, J., Kaplan, G. A., Goldberg, D. E., &Salonen, J. T. Beer bingeing and mortality: results from the Kuopio ischaemic heart disease risk factor study, a prospective population based study. *Bmj*. 1997; 315(7112): 846-851.

L

- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227 (5259): 680-685.
- Lawrence, R. A., & Burk, R. F. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Bioph Res Co*. 1976; 71 (4): 952-958.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J biol chem*. 1951; 193 (1): 265-275.

M

- Mansouri, A., Demeilliers, C., Amsellem, S., Pessayre, D., & Fromenty, B. Acute ethanol administration oxidatively damages and depletes mitochondrial DNA in mouse liver, brain, heart, and skeletal muscles: protective effects of antioxidants. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001; 298 (2): 737-743.
- Markiewicz-Górka, I., Zawadzki, M., Januszewska, L., Hombek-Urban, K., & Pawlas, K. Influence of selenium and/or magnesium on alleviation alcohol induced oxidative stress in rats, normalization function of liver and changes in serum lipid parameters. *Hum Exp Toxicol*. 2011; 30 (11): 1811-1827.
- Massey, V. L., Arteel, G. E. Acute alcohol-induced liver injury. *Front Physiol*. 2012; 3: 193-193.
- Mathurin, P., & Deltenre, P. Effect of binge drinking on the liver: an alarming public health issue? *Gut*. 2009; 58 (5): 613-617.
- Mathurin, P., Deng, Q. G., Keshavarzian, A., Choudhary, S., Holmes, E. W., & Tsukamoto, H. Exacerbation of alcoholic liver injury by enteral endotoxin in rats. *Hepatology*. 2000; 32(5): 1008-1017.
- McCuskey, R. S., Bethea, N. W., Wong, J., McCuskey, M. K., Abril, E. R., Wang, X., ... & DeLeve, L. D. Ethanol bingeing exacerbates sinusoidal endothelial and parenchymal injury elicited by acetaminophen. *J Hepatol*. 2005; 42 (3): 371-377.
- Merino, B., Lizarbe, V., Koerting, A., Diezma, J., Delicatedo, I., & Echeverría, P. Ganar Salud con la Juventud. Madrid: Servicio de Publicaciones del Ministerio de Sanidad y Consumo; 2003.
- Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Encuesta Nacional de Salud España 2011/12. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Madrid 2013. Serie Informes monográficos nº 1. Consumo de alcohol

- Moreno, C., Ramos, P., Rivera, F., Jiménez-Iglesias, A., García-Moya, I., Sanchez-Queija, I., ... & Granada, M. C. Las conductas relacionadas con la salud y el desarrollo de los adolescentes españoles. Resultados del Estudio HBSC-2010 con chicos y chicas españoles de 11 a 17 años. Madrid: Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad; 2011.
- MOYA C, Sánchez A. Comisión Clínica de la Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas. Madrid: MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO. 2007.

N

- National Institute of Health. "The Effects of Alcohol on Physiological Processes and Biological Development". Alcohol Res Health. 2004; 28 (03).
- Navarro-Alarcon, M., & López-Martinez, M. C. Essentiality of selenium in the human body: relationship with different diseases. Sci Total Environ. 2000; 249 (1): 347-371.

O

- Observatorio Español sobre Drogas. Encuesta Estatal sobre uso de drogas en estudiantes de enseñanzas secundarias (ESTUDES). Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad; 1994/2010.
- Observatorio Español sobre Drogas. Encuesta Estatal sobre uso de drogas en estudiantes de enseñanzas secundarias (ESTUDES). Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad; 2006/2007.
- Observatorio Español sobre Drogas. Encuesta Estatal sobre uso de drogas en estudiantes de enseñanzas secundarias (ESTUDES). Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad; 2012/2013.
- Oekonomaki, E., Notas, G., Mouzas, I. A., Valatas, V., Skordilis, P., Xidakis, C., & Kouroumalis, E. A. Binge drinking and nitric oxide metabolites in chronic liver disease. Alcohol Alcoholism. 2004; 39 (2): 106-109.
- Ojeda, M. L., Jotty, K., Nogales, F., Murillo, M. L., & Carreras, O. Selenium or selenium plus folic acid intake improves the detrimental effects of ethanol on pups' Selenium balance. Food Chem Toxicol. 2010; 48 (12): 3486-3491.
- Ojeda, M. L., Nogales, F., Jotty, K., Barrero, M. J., Murillo, M. L., & Carreras, O. Dietary selenium plus folic acid as an antioxidant therapy for ethanol-exposed pups. Birth Defects Res B Reprod Toxicol. 2009; 86 (6): 490-495.
- Ojeda, M. L., Nogales, F., Murillo, M. L., & Carreras, O. Selenium or Selenium Plus Folic Acid-Supplemented Diets Ameliorate Renal Oxidation in Ethanol-Exposed Pups. Alcohol Clin Exp Res. 2012; 36 (11): 1863-1872.

P

- Papp, L. V., Lu, J., Holmgren, A., & Khanna, K. K. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. Antioxid Redox Sign. 2007; 9(7): 775-806.

R

- Rasmussen, L. B., Hollenbach, B., Laurberg, P., Carlé, A., Hög, A., Jørgensen, T., ... & Schomburg, L. Serum selenium and selenoprotein P status in adult Danes—8-year followup. *J Trace Elem Med Bio.* 2009; 23 (4): 265-271.
- Rayman, M. P. Selenium and human health. *Lancet.* 2012; 379 (9822): 1256-1268.
- Rayman, M. P. Selenoproteins and human health: insights from epidemiological data. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1790(11): 1533-1540.
- Rayman, M. P. The importance of selenium to human health. *Lancet.* 2000; 356 (9225): 233-241.
- Reeves, M. A., & Hoffmann, P. R. The human selenoproteome: recent insights into functions and regulation. *Cell Mol Life Sci.* 2009; 66 (15): 2457-2478.
- Reszka, E., Jablonska, E., Gromadzinska, J., & Wasowicz, W. Relevance of selenoprotein transcripts for selenium status in humans. *Genes & nutrition.* 2012; 7 (2): 127-137.
- Rodríguez-Martos Dauer, A., Gual Solé, A., & Llopis Llácer, J. J. La unidad de bebida estándar como registro simplificado del consumo de bebidas alcohólicas y su determinación en España. *Med Clin-Barcelona.* 1999; 112(12): 446-450.
- Rua, R. M., Ojeda, M., Nogales, F., Rubio, J. M., Romero-Gómez, M., Funuyet, J., ... & Carreras, O. Serum selenium levels and oxidative balance as differential markers in hepatic damage caused by alcohol. *Life Sci.* 2014; 94 (2): 158-163.

S

- Simonoff, M., & Simonoff, G. (1991). Le sélénium et la vie. En: Simonoff M, Simonoff G (eds.). Masson. Paris. 1991
- Steinbrenner, H., Speckmann, B., Pinto, A., Winter, M., Förster, I., & Sies. Proinflammatory cytokines down-regulate intestinal selenoprotein P biosynthesis via NOS2 induction. *Free Radical Bio Med.* 2010; 49 (5): 777-785.
- Sunde, R. A., Thompson, K. M., Evenson, J. K., & Thompson, B. M. Blood glutathione peroxidase-1 mRNA levels can be used as molecular biomarkers to determine dietary selenium requirements in rats. *Exp Biol Med.* 2009; 234 (11): 1271-1279.

T

- Tapiero, H., Townsend, D. M., & Tew, K. D. The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. *Biomed Pharmacother.* 2003; 57 (3): 134-144.

W

- Wang, X., & Cederbaum, A. I. Acute ethanol pretreatment increases FAS-mediated liver injury in mice: role of oxidative stress and CYP2E1-dependent and-independent pathways. *Free Radical Bio Med.* 2007; 42 (7): 971-984.
- Waszkiewicz, N., Szajda, S. D., Zalewska, A., Konarzewska, B., Szulc, A., Kępk, A., & Zwierz, K. Binge drinking—induced liver injury. *Hepatology.* 2009; 50(5): 1676-1676.

Y

- Yu, L., Yang, S., Sun, L., Jiang, Y. F., & Zhu, L. Y. Effects of Selenium-Enriched *Agaricus blazei* Murill on Liver Metabolic Dysfunction in Mice, a Comparison with Selenium-Deficient *Agaricus blazei* Murill and Sodium Selenite. *Biol Trace Elem Res.* 2014; 1-6.

Z

- Zhou, Z., Sun, X., & Kang, Y. J. Ethanol-induced apoptosis in mouse liver: Fas-and cytochrome c-mediated caspase-3 activation pathway. *Am J Pathol.* 2001; 159 (1): 329-338.
- Zhou, Z., Sun, X., & Kang, Y. J. Metallothionein protection against alcoholic liver injury through inhibition of oxidative stress. *Exp Biol M.* 2002; 227 (3): 214-222.
- Zima, T. A. S., Fialová, L., Mestek, O., Janebová, M., Crkovská, J., Malbohan, I., ... & Popov, P. Oxidative stress, metabolism of ethanol and alcohol-related diseases. *J Biomed Sci.* 2001; 8 (1): 59-70.